CILENE REBOUÇAS DE LIMA

PROTEOGLICANOS DE ESTROMA MAMÁRIO E FIBROADENOMA HUMANOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES HORMONAIS

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Doutor em Ciências

SÃO PAULO
2009

CILENE REBOUÇAS DE LIMA

PROTEOGLICANOS DE ESTROMA MAMÁRIO E FIBROADENOMA HUMANOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES HORMONAIS

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Doutor em Ciências

SÃO PAULO
2009

Lima, Cilene Rebouças de

Proteoglicanos de estroma mamário e fibroadenoma humanos em diferentes condições hormonais.

Proteoglycans of human mammary stroma and fibroadenoma under different hormonal conditions.

São Paulo, 2009. P 247.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina.

1. Proteoglicanos; 2. Fibroadenoma; 3. Tecido mamário; 4. Ciclo menstrual.

Tese preparada no Departamento de Bioquímica durante o curso de Pós-Graduação em Biologia Molecular e apresentada à Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências

Orientadora: Profª. Drª. Yara M. Michelacci

VIVER, UM ESPETÁCULO!

VIVER é um espetáculo imperdível...
Você pode ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não se esqueça de que sua vida é a maior empresa do mundo.
Só você pode evitar que ela vá à falência.
Lembre-se sempre de que SER FELIZ não é ter um céu sem tempestades, caminhos sem acidentes, trabalhos sem fadigas, relacionamentos sem decepções.
SER FELIZ é encontrar força no perdão, esperança nas batalhas, segurança no palco do medo, amor nos desencontros.
SER FELIZ não é apenas valorizar o sorriso, mas refletir sobre a tristeza.
Não é apenas comemorar o sucesso, mas aprender lições nos fracassos.
Não é apenas ter júbilo nos aplausos, mas encontrar alegria no anonimato.
SER FELIZ é reconhecer que vale apena viver a vida, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.
SER FELIZ não é uma fatalidade do destino, mas uma conquista de quem sabe viajar para dentro do seu próprio ser.
SER FELIZ é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história.
É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma. É agradecer a cada manhã pelo milagre da vida.
SER FELIZ é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo.
É ter coragem para ouvir um "não". É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta. É beijar os filhos, curtir os pais e ter momentos poéticos com os amigos, mesmo que eles nos magoem.
SER FELIZ é deixar viver a criança livre, alegre e simples que mora dentro de cada um de nós.
É ter maturidade para falar "eu errei".
É ter ousadia para dizer "me perdoe".
É ter sensibilidade para expressar "eu preciso de você".
É ter capacidade de dizer "eu te amo".
Faça da sua vida um canteiro de oportunidades.
Que nas suas primaveras você seja amante da alegria.
Que nos seus invernos você seja amigo da sabedoria.
E, quando você errar o caminho, comece tudo de novo.
Pois assim você será cada vez mais apaixonado pela vida e descobrirá que SER FELIZ não é ter uma vida perfeita, mas é usar as lágrimas para irrigar a tolerância, usar as perdas para refinar a paciência, usar as falhas para esculpir a serenidade, usar a dor para lapidar o prazer, usar os obstáculos para abrir as janelas da inteligência.
Jamais desista de si mesmo.
Jamais desista das pessoas que você ama.
Jamais desista de SER FELIZ, pois a vida é um espetáculo imperdível...

Augusto Cury

Agradeço muito a Deus por estar sempre presente em minha vida, dando-me sempre força e orientação em todos os momentos. Por me ajudar sempre a aprender algo positivo em meio às dificuldades, a amadurecer com os erros e acertos decorrentes de minhas próprias escolhas.

Minha imensurável e indescritível gratidão à minha mãe por ser um grande exemplo de Vida, Força, Dedicação, Otimismo, Bondade, Simplicidade e Sabedoria. Meu eterno agradecimento a Deus por ter me dado este presente e pela oportunidade de tê-la em minha vida em todos os momentos. Obrigado Mãe, pelo amor Incondicional, Dedicação, Formação, Educação, Esforço, que me ajudaram e continuam ajudando a caminhar com Firmeza e Determinação.

Meu eterno e carinhoso agradecimento ao meu Pai, por ter me dado tantas oportunidades de crescimento durante todos estes anos de minha vida. Obrigada pelo seu amor e esforço desde o início, pois foram imprescindíveis para a minha formação e educação. Sou grata a vocês dois por me ensinarem o valor da Honestidade, Dignidade, e Caráter. Graças a vocês sou uma pessoa Forte e Otimista que aprendeu muito a valorizar a vida.

Viver é colecionar experiências... Aprender com elas é uma questão de escolha. Podemos apenas perder anos de nossa vida reclamando de modo prepotente e orgulhoso ou buscar com sabedoria e humildade, compreender o que há por trás de cada situação. Agradeço ao meu Irmãozinho pelo seu modo característico de demonstrar carinho e amor. Por também me ajudar a aprender com lições que temos apenas na escola da vida.

"O mais importante da vida não é a situação em que estamos, mas a direção para a qual nos movemos".
Oliver Wendell Holmes

Esta é uma das lições mais importantes, entre muitas outras que aprendi com a Senhora, Dra. Yara. M. Michelacci. Meu carinhoso, imensurável e muito especial agradecimento por estar presente em minha vida durante todos estes anos, dando-me dia-a-dia oportunidades de crescimento profissional e pessoal. Minha enorme admiração pelo seu Comportamento Profissional Exemplar e Ético, sua Dedicação, Amor, Compromisso, Empenho nas situações diárias. Obrigada também, de coração, pelo seu carinho, amizade, preocupação e paciência.

Amigos verdadeiros estão presentes em nossas vidas em todos os momentos, compartilhando minutos preciosos da nossa existência. Alguns são com anjos que parecem adivinhar acontecimentos... São capazes de ler nossos pensamentos e olhares, e estão sempre prontos a ajudar da melhor maneira, a ouvir e a incentivar, principalmente nos momentos mais difíceis. Eles têm sempre palavras de conforto e não nos deixam desanimar. Não tenho palavras para descrever o quanto sou grata a Deus por ter pessoas assim em minha vida. Cada um com uma característica.
Amigasssssssss.....muitoooo obrigada por tudo!!!!

AGRADECIMENTOS

"Sonhe o que quer que você queira sonhar...Vá aonde você quiser...Procure aquilo que deseja...Porque sua vida é aquilo que você faz dela!
Entre o passado, onde estão nossas recordações e o futuro, onde estão nossas esperanças, fica o presente, onde está o nosso dever...
Viva a vida plenamente, e sempre SORRIA, apesar dos momentos de dificuldade...
É possível mudar nossas vidas e as atitudes daqueles que nos cercam simplesmente mudando a nós mesmos, lembrando sempre que conhecimento não significa sabedoria..."

A.D.

Ao **Prof. Dr. Carl Peter von Dietrich** que nós deixou grande exemplo de conduta científica, profissionalismo e competência. Por todo o trabalho e esforço que nos proporcionou, juntamente com outros professores, a oportunidade de estar neste laboratório.

À **Profª Drª Helena B. Nader** pela determinação e dedicação exemplar à ciência, profissionalismo e competência.

Às professoras **Lúcia O. Sampaio**, **Marimélia A. Porcionatto** e **Ivarne Luis dos Santos Tersoriol**, pela competência e profissionalismo.

Às professoras **Leny Toma**, **Maria Aparecida Pinhal, Gisele** e **João R. M. Martins** pela competência, profissionalismo, exemplar dedicação à profissão, atenção e palavras de incentivo.

Ao **Prof. Dr. Afonso C. P. Nazário** pela oportunidade, atenção e amizade. E à **Jose Arimatéa S. Junior** pela colaboração e amizade.

À **Paulo Michelacci** pela amizade e ótima convivência.

Ao grande amigo **Jair A. K. Aguiar,** que tanto me ensinou durante todos estes anos. Obrigada pela paciência, pelas conversas, pelos conselhos, por estar presente em momentos de alegria e de dificuldades. Meu eterno carinho.

Ao **Giovanne B. Peres** pela amizade, atenção e ótima convivência.

À **Fernanda Borges** por todos estes anos de convivência, amizade e trabalho.

À **Profª Raquel Y. A. Baccarin, Thaís S. L. Machado, Camila M. Gadela e Karla Resende** pela amizade, trabalho e convivência, apesar do pouco tempo.

À Elsa Yoko Kobayashi por toda atenção, esforço, dedicação e paciência. Por estar sempre pronta a ajudar. Pelas palavras de auxílio e preocupação. Agradeço com muito carinho por todos estes anos de convivência. Aprendi muito com você.

À **Aline Mendes** pela disposição, profissionalismo, apoio técnico e atenção. Também sempre pronta a ajudar. Obrigada pela amizade crescente ao longo destes anos.

À **Valquíria Medeiros e a Carolina Córdula** pela amizade, carinho, conversas e incentivo. Obrigada pela ótima convivência.

Agradecimento carinhoso à Eloah R. Suarez, **Clarice S. T. Origassa**, **Carol Bonaldi**, **Thérèrse T. Rachell**, **Thais Peretti**, **Ana Paula C. Marolla** e

Angela S. Nohara ("Angel") pela amizade, ótima convivência. Obrigada por todo carinho e atenção. Agradecimento especial à Clarice pelos "S.O.S.s".

À **Ana Paula B. Araujo,** pela amizade e disposição – sempre pronta a ajudar. *À* **Carolina M. Vicente**, **Caroline M. Moreira**, **Carolina B. Ariza**, **Patricia S. Braghiroli**, **Thais Filippo**, **Ritchelli Ricci, Maria Emília O. B. Ribeiro**, **Vivien J. Coulson-Thomas, Renata O. Aquino** e **Yvette M. Coulson-Thomas** pelo convívio e amizade.

À **Isabel A. N. Santos**, **Ricardo C. Jorge, Rodrigo I. Bouças**, **Thaís Jarrouge**, **Renan P. Cavalheiro, Juliana L. Dreyfuss**, **Edgar J. Paredes-Gamero**, **Daniela B. Martinatti**, **Itatiana F. Rodart**, **Juliana Dominato**, **Fábio D. Nascimento**, **Gioconda E. D. D. Moura**, **Tarsis G. Ferreira**, **Gabriel L. A. Cunha** pela convivência, apoio e amizade.

Agradecimento carinhoso a **Carol** e a **Beth** do Confocal por todo o auxílio, amizade e disposição. Muito obrigada pelo trabalho intenso e esforço em me ajudar.

À **Everaldina N. Fernandes e Juraci B. Meli** pelo grande carinho e amizade de todos os dias, pelo ótimo e alegre convívio, além do material de trabalho sempre pronto para uso e os cafezinhos e chás indispensáveis durante todos estes anos, bem como a organização do laboratório.

Às nossas mais novas companheiras de trabalho, **Francilina A. Almeida** e **Rosana D. Souza** pelo ótimo convívio. Pelo trabalho realizado com muita eficiência e disposição, mantendo o material de trabalho sempre pronto para uso bem como a organização do laboratório.

À Clélia de T. C. Borsi e Patrícia C. Precioso, pelo auxílio, organização e orientação. Obrigado pelas informações, pela ajuda constante e importante nas atividades e por todos estes anos de convivência.

À **todos** que, direta ou indiretamente, me auxiliaram na concretização deste trabalho e no crescimento tanto profissional quanto pessoal.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelos recursos fornecidos para a execução deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

INTRODUÇÃO 01

1 PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS 02

1.1 CONCEITOS GERAIS E ESTRUTURAIS 02

2 CLASSIFICAÇÃO, DISTRIBUIÇÃO E FUNÇÕES BIOLÓGICAS DOS PROTEOGLICANOS 10

2.1 PROTEOGLICANOS CELULARES 12

2.1.1 PROTEOGLICANOS DE GRÂNULOS CITOPLASMÁTICOS 12

2.1.2 PROTEOGLICANOS DE SUPERFÍCIE CELULAR 13

2.1.2.1 PROTEOGLICANOS TRANSMEMBRÂNICOS 14

2.1.2.2 PROTEOGLICANOS LIGADOS POR ÂNCORA DE GPI 18

2.2 PROTEOGLICANOS DE MATRIZ EXTRACELULAR 20

2.2.1 PROTEOGLICANOS DE MEMBRANA BASAL 20

2.2.2 PROTEOGLICANOS DE MATRIZ INTERSTICIAL 24

2.2.2.1 PROTEOGLICANOS DE BAIXO PESO MOLECULAR 24

2.2.2.2 PROTEOGLICANOS DE ALTO PESO MOLECULAR 29

2.2.2.3 OUTROS PROTEOGLICANOS DE MATRIZ INTERSTICIAL 34

3 BIOSSÍNTESE E DEGRADAÇÃO DE PROTEOGLICANOS 34

4 NEOPLASIAS 35

4.1 FIBROADENOMA 41

4.2 CICLO MENSTRUAL E HORMÔNIOS ESTERÓIDES FEMININOS 43

4.3 EFEITO DOS HORMÔNIOS SOBRE TECIDO MAMÁRIO NORMAL, FIBROADENOMA E CÂNCER DE MAMA 47

4.4 PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS NO FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL 52

OBJETIVO 54

MATERIAIS 56

1 AMOSTRAS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO HUMANO NORMAL ADJACENTE 57

2 GLICOSAMINOGLICANOS PADRÕES 57

3 ANTICOPORPOS E MARCADORES FLUORESCENTES 58

3.1 ANTICORPOS PRIMÁRIOS 58

3.2 ANTICORPOS SECUNDÁRIOS 58

3.3 MARCADORES FLUORESCENTES 59

4 MEIO DE CULTURA 59

5 RADIOISÓTOPO 59

6 ENZIMAS 60

7 OUTRAS DROGAS E MATERIAIS 60

8 EQUIPAMENTOS 61

MÉTODOS 63

1 MARCAÇÃO METABÓLICA DOS PROTEOGLICANOS DE FIBROADRENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL HUMANOS COM ^{35}S-SULFATO 64

2 EXTRAÇÃO DE PROTEOGLICANOS 64

3 EXTRAÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS 65

4 CARACTERIZAÇÃO DE PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS 65

4.1 ELETROFORESE 66

4.1.1 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 66

4.1.1.1 TAMPÃO 1,3 DIAMINOPROPANO ACETATO (PDA) 66

4.1.1.2 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 66

4.1.2 IMMUNOBLOTTING....67

4.1.3 DEGRADAÇÕES ENZIMÁTICAS....68

4.1.4 ANÁLISE DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EM PAPEL....69

4.1.5 PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS MARCADOS COM ^{35}S-SULFATO....70

4.1.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA....70

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA....71

RESULTADOS....72

1 PACIENTES E TUMORES....73

2 PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE....76

2.1 PROTEOGLICANOS PRESENTES NO FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE....76

2.2 GLICOSAMINOGLICANOS PRESENTES EM FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL....83

2.3 ESTRUTURA DOS GLICOSAMINOGLICANOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE....93

2.4 PROTEOGLICANOS DE MATRIZ – DECORIM E VERSICAM – EM FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL....95

3 MARCAÇÃO METABÓLICA DE PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL....97

3.1 SÍNTESE DE PROTEOGLICANOS NO FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE....97

3.2 ANÁLISE DOS ^{35}S-GLICOSAMINOGLICANOS PRESENTES NOS ^{35}S-PROTEOGLICANOS SINTETIZADOS NO FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL EM CONDIÇÕES DE CULTURA DE TECIDOS....105

3.3 ANÁLISE DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO ^{35}S-DERMATAM SULFATO PRESENTE NOS ^{35}S-PROTEOGLICANOS SINTETIZADOS NO FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL EM CONDIÇÕES DE CULTURA DE TECIDOS 111

3.4 DISTRIBUIÇÃO DOS ^{35}S-PROTEOGLICANOS E ^{35}S-GLICOSAMINOGLICANOS SINTETIZADOS NO FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL EM CONDIÇÕES DE CULTURA DE TECIDOS 117

3.5 ^{35}S-PROTEOGLICANOS E ^{35}S-GLICOSAMINOGLICANOS EXTRAÍDOS DOS FRAGMENTOS TECIDUAIS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL 124

3.6 ^{35}S- PROTEOGLICANOS DE MATRIZ – DECORIM E VERSICAM – EM FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL 128

4 IMUNOLOCALIZAÇÃO DOS PROTEOGLICANOS – DECORIM E VERSICAM – DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL 131

DISCUSSÃO 144

ABSTRACT / RESUMO 157

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 160

APÊNDICE 184

ANEXOS 189

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: MONOSSACARÍDEOS PRESENTES NOS GLICOSAMINOGLICANOS E POSIÇÕES A QUE PODEM SE LIGAR OS GRUPAMENTOS SULFATO.....03

FIGURA 2: PRINCIPAIS UNIDADES DISSACARÍDICAS DOS GLICOSAMINOGLICANOS.....05

FIGURA 3: REGIÃO DE LIGAÇÃO DOS GLICOSAMINOGLICANOS AO ESQUELETO PROTÉICO.....09

FIGURA 4: ESTRUTURA DO ESQUELETO PROTÉICO DOS PROTEOGLICANOS DA FAMÍLIA SERGLICIM 12

FIGURA 5: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS PROTEOGLICANOS DE SUPERFÍCIE CELULAR 14

FIGURA 6: ESQUEMA DA ESTRUTURA DO ESQUELETO PROTÉICO DOS SINDECANS 16

FIGURA 7: ESQUEMA DOS DOMÍNIOS COMUNS PRESENTES NOS MEMBROS DA FAMÍLIA DOS GLIPICANS 19

FIGURA 8: ESTRUTURA DO ESQUELETO PROTÉICO DE PERLECANS DE DIFERENTES ORIGENS 21

FIGURA 9: ESTRUTURA DO ESQUELETO PROTÉICO DE PROTEOGLICANOS DE MEMBRANA BASAL: PERLECAM, AGRIM E BAMACAM 23

FIGURA 10: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE ALGUNS PROTEOGLICANOS DE BAIXO PESO MOLECULAR.....28

FIGURA 11: ESTRUTURA DOS PROTEOGLICANOS DE ALTO PESO MOLECULAR, HIALECTANS OU LEC-HABP 30

FIGURA 12: MOLÉCULAS DE AGRECAM E DE PROTEÍNA DE LIGAÇÃO FORMANDO AGREGADOS COM ÁCIDO HIALURÔNICO 32

FIGURA 13: FLUXOGRAMA MOSTRANDO UM ESQUEMA SIMPLIFICADO DA BASE MOLECULAR DO CÂNCER 37

FIGURA 14: FIBROADENOMA.....42

FIGURA 15: FORMAÇÃO DE 17-β-ESTRADIOL E PROGESTERONA 44

FIGURA 16: CICLO MENSTRUAL HUMANO 45

FIGURA 17: ESTRUTURA DE ALGUNS HORMÔNIOS ESTERÓIDES 46

FIGURA 18: ESQUEMA GERAL DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO NA SUPERFAMÍLIA DE RECEPTORES NUCLEARES 47

FIGURA 19: MODELO DE ATIVAÇÃO GÊNICA HORMÔNIO-DEPENDENTE PELA HOMODIMERIZAÇÃO DE RECEPTOR NUCLEAR 49

FIGURA 20: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS EXTRAÍDOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE. 77

FIGURA 21: RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DE PROTEOGLICANOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL 78

FIGURA 22: DADOS INDIVIDUAIS DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEOGLICANOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. 79

FIGURA 23: CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS EXTRAÍDOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL 80

FIGURA 24: ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS CONCENTRAÇÕES DE PROTEOGLICANOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. 81

FIGURA 25: DADOS INDIVIDUAIS DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEOGLICANOS DE TECIDO MAMÁRIO NORMAL E FIBROADENOMA DURANTE O CICLO MENSTRUAL 82

FIGURA 26: ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS CONCENTRAÇÕES DE PROTEOGLICANOS NO TECIDO MAMÁRIO NORMAL E FIBROADENOMA DURANTE O CICLO MENSTRUAL 83

FIGURA 27: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE EM TAMPÃO PDA DOS GLICOSAMINOGLICANOS LIBERADOS POR PROTEÓLISE DOS PROTEOGLICANOS EXTRAÍDOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL 84

FIGURA 28: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE EM TAMPÃO PDA DOS GLICOSAMINOGLICANOS LIBERADOS POR PROTEÓLISE DOS PROTEOGLICANOS EXTRAÍDOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE APÓS DEGRADAÇÃO COM GLICOSAMINOGLICANO LIASES ESPECÍFICAS 85

FIGURA 29: CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE DERMATAM SULFATO (RICO EM ÁCIDO β-D-GLUCURÔNICO E EM ÁCIDO α-L-IDURÔNICO) E HEPARAM SULFATO OBTIDO POR PROTEÓLISE DOS PROTEOGLICANOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE. 87

FIGURA 30: ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS CONCENTRAÇÕES DE DERMATAM SULFATO (RICO EM ÁCIDO β-D-GLUCURÔNICO E EM ÁCIDO α-L-IDURÔNICO) E HEPARAM SULFATO DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL 88

FIGURA 31: DADOS INDIVIDUAIS DA CONCENTRAÇÃO DE DERMATAM SULFATO (RICO EM ÁCIDO β-D-GLUCURÔNICO E EM ÁCIDO α-L-IDURÔNICO) E HEPARAM SULFATO NO TECIDO MAMÁRIO NORMAL E FIBROADENOMA DURANTE O CICLO MENSTRUAL 89

FIGURA 32: ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS CONCENTRAÇÕES DE DERMATAM SULFATO (RICO EM ÁCIDO β-D-GLUCURÔNICO E EM ÁCIDO α-L-IDURÔNICO) E HEPARAM SULFATO DE TECIDO MAMÁRIO NORMAL E FIBROADENOMA DURANTE O CICLO MENSTRUAL 90

FIGURA 33: PROPORÇÃO DE DERMATAM SULFATO E HEPARAM SULFATO DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL 91

FIGURA 34: PROPORÇÃO DE DERMATAM SULFATO (RICO EM ÁCIDO β-D-GLUCURÔNICO E EM ÁCIDO α-L-IDURÔNICO) DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL 92

FIGURA 35: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE EM TAMPÃO PDA DE PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS PRESENTES NOS POOLS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL 93

FIGURA 36: CROMATOGRAFIA DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DE DERMATAM SULFATO DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. 94

FIGURA 37: IMMUNOBLOTTING DE PROTEOGLICANOS – DECORIM E VERSICAM – DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL 96

FIGURA 38: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE E RADIOAUTOGRAMA DOS ^{35}S-PROTEOGLICANOS E ^{35}S-GLICOSAMINOGLICANOS EXTRAÍDOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE 98

FIGURA 39: DADOS INDIVIDUAIS DA INCORPORAÇÃO TOTAL DE ^{35}S-SULFATO NO FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL 100

FIGURA 40: CONCENTRAÇÃO MÉDIA DA INCORPORAÇÃO TOTAL DE ^{35}S-SULFATO NO FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL 101

FIGURA 41: ANÁLISE ESTATÍSTICA DA INCORPORAÇÃO TOTAL DE ^{35}S-SULFATO NO FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL 102

FIGURA 42: CORRELAÇÃO ENTRE A RAZÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS TOTAIS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE E DIFERENTES FATORES 103

FIGURA 43: DADOS INDIVIDUAIS DA INCORPORAÇÃO TOTAL DE ^{35}S-SULFATO NO TECIDO MAMÁRIO NORMAL E FIBROADENOMA DURANTE O CICLO MENSTRUAL 104

FIGURA 44: ANÁLISE ESTATÍSTICA DA INCORPORAÇÃO TOTAL DE ^{35}S-SULFATO NO TECIDO MAMÁRIO NORMAL E FIBROADENOMA DURANTE O CICLO MENSTRUAL. 104

FIGURA 45: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE EM TAMPÃO PDA E RADIOAUTOGRAMA DOS ^{35}S-GLICOSAMINOGLICANOS LIBERADOS POR PROTEÓLISE DOS ^{35}S-PROTEOGLICANOS EXTRAÍDOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE 106

FIGURA 46: CONCENTRAÇÃO MÉDIA TOTAL DOS ^{35}S-GLICOSAMINOGLICANOS EXTRAÍDOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL 107

FIGURA 47: ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS CONCENTRAÇÕES TOTAIS DOS ^{35}S-GLICOSAMINOGLICANOS EXTRAÍDOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL 108

FIGURA 48: DADOS INDIVIDUAIS DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DE CADA ^{35}S-GLICOSAMINOGLICANO DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE DURANTE O CICLO MENSTRUAL..... 109

FIGURA 49: ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DE CADA ^{35}S-GLICOSAMINOGLICANO DE TECIDO MAMÁRIO NORMAL E FIBROADENOMA DURANTE O CICLO MENSTRUAL 110

FIGURA 50: PROPORÇÃO DE ^{35}S-GLICOSAMINOGLICANOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL 111

FIGURA 51: CROMATOGRAFIA DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DOS ^{35}S-GALACOSAMINOGLICANOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL 112

FIGURA 52: COMPOSIÇÃO TOTAL EM DISSACARÍDEOS DOS ^{35}S-GALACTOSAMINOGLICANOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL..... 113

FIGURA 53: ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-DISSACARÍDEOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL 115

FIGURA 54: ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-DISSACARÍDEOS DE TECIDO MAMÁRIO NORMAL E FIBROADENOMA DURANTE O CICLO MENSTRUAL 116

FIGURA 55: DADOS QUANTITATIVOS INDIVIDUAIS DA DISTRIBUIÇÃO DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS NO MEIO DE CULTURA E EXTRAÍDOS DE FRAGMENTOS TECIDUAIS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL 117

FIGURA 56: CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS DO MEIO DE CULTURA E EXTRAÍDOS DOS FRAGMENTOS TECIDUAIS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL..... 118

FIGURA 57: ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS DO MEIO DE CULTURA E EXTRAÍDOS DE FRAGMENTOS TECIDUAIS DE FIBROADENOMA E DE TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL 119

FIGURA 58: ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS DO MEIO DE CULTURA E EXTRAÍDOS DE FRAGMENTOS TECIDUAIS DE TECIDO MAMÁRIO NORMAL E FIBROADENOMA DURANTE O CICLO MENSTRUAL 120

FIGURA 59: DISTRIBUIÇÃO DE ^{35}S-GLICOSAMINOGLICANOS OBTIDOS DO MEIO DE CULTURA E EXTRAÍDOS DOS FRAGMENTOS TECIDUAIS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL 121

FIGURA 60: ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-GLICOSAMINOGLICANOS DO FRAGMENTO TECIDUAL X MEIO DE CULTURA DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NA FASE PROLIFERATIVA DO CICLO MENSTRUAL 122

FIGURA 61: ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-GLICOSAMINOGLICANOS DO FRAGMENTO TECIDUAL X MEIO DE CULTURA DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NA FASE LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL 123

FIGURA 62: DADOS QUANTITATIVOS INDIVIDUAIS DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS E ^{35}S-GLICOSAMINOGLICANOS EXTRAÍDOS DE FRAGMENTOS TECIDUAIS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL 124

FIGURA 63: RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS DE FRAGMENTOS TECIDUAIS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL 125

FIGURA 64: CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS E ^{35}S-GLICOSAMINOGLICANOS EXTRAÍDOS DE FRAGMENTOS TECIDUAIS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL 126

FIGURA 65: DISTRIBUIÇÃO DE ^{35}S-DERMATAM SULFATO (RICO EM ÁCIDO β-D-GLUCURÔNICO E EM ÁCIDO α-L-IDURÔNICO) E ^{35}S-HEPARAM SULFATO OBTIDOS DE FRAGMENTOS TECIDUAIS DE FIBROADENOMA E TECIDO

MAMÁRIO NORMAL NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL 127

FIGURA 66: IMMUNOBLOTTING DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS – DECORIM E VERSICAM – DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE 128

FIGURA 67: ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (GRADIENTE DE 3-20%) E IMMUNOBLOTTING DOS ^{35}S-PROTEOGLICANOS – DECORIM E VERSICAM – DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE 130

FIGURA 68: MICROSCOPIA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DE PROTEOGLICANOS – DECORIM E VERSICAM – DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NA FASE PROLIFERATIVA DO CICLO MENSTRUAL 134

FIGURA 69: MICROSCOPIA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DE PROTEOGLICANOS – DECORIM E VERSICAM – DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NA FASE LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL 136

FIGURA 70: MICROSCOPIA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DE PROTEOGLICANOS – DECORIM E VERSICAM – DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL 138

FIGURA 71: ANÁLISE DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE DECORIM E ACTINA NO FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL 140

FIGURA 72: ANÁLISE DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE VERSICAM E ACTINA NO FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL 142

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1: CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DOS GLICOSAMINOGLICANOS.....04

TABELA 2: CLASSIFICAÇÃO DOS PROTEOGLICANOS. 11

TABELA 3: CLASSES DE PROTEOGLICANOS DE BAIXO PESO MOLECULAR.. 25

TABELA 4: COMPARAÇÕES ENTRE TUMORES BENIGNOS E MALIGNOS…39

TABELA 5: SEQUÊNCIAS CONSENSO DO DNA DE HREs (ELEMENTOS DE RESPOSTA AOS HORMÔNIOS).....48

TABELA 6: DADOS INDIVIDUAIS DAS PACIENTES REFERENTES AO CICLO MESNTRUAL.. 73

TABELA 7: DADOS DOS TUMORES BENIGNOS DIAGNOSTICADOS NAS PACIENTES..... 75

TABELA 8: VALORES MÉDIOS DO RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DE PROTEOGLICANOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. 78

TABELA 9: CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS EXTRAÍDOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. 80

TABELA 10: CONCENTRAÇÃO MÉDIA DA INCORPORAÇÃO TOTAL DE ^{35}S-SULFATO NO FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL.....101

TABELA 11: VALORES MÉDIOS DO RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS DE FRAGMENTOS TECIDUAIS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL.... 125

ABREVIATURAS

µ:	micro
Ac:	acetato ou acetil
AH:	ácido hialurônico
AS:	ácido siálico
Asp:	asparagina
AU ou UA:	ácido urônico
BSA:	soro albumina bovina
C4S:	condroitim 4- sulfato
C6S:	condroitim 6- sulfato
CNEN:	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CETAVLON:	brometo de cetiltrimetilamônio
CS:	condroitim sulfato
Da:	Dalton
DAB:	3,3'-diaminobenzamidina
DAPI:	4'6-Diamino-2-fenilindol
DS:	dermatam sulfato
EDA:	etilenodiaminometileno-acetato ou 1,2diaminoetano-acetato
Fuc:	fucose
g:	gravidade
G1, G2, G3:	domínios globulares do esqueleto protéico de proteoglicanos
GAG:	glicosaminoglicano
GAGs:	glicosaminoglicanos
Gal:	galactose
GalNAc:	N-acetilgalactosamina
GlcNAc:	N- acetilglucosamina
GuaHCl:	hidrocloreto de guanidina
GPI:	glicosilfosfatidilinositol
h(s):	hora(s)
Hep:	heparina
Hex ou HX:	hexosamina
HS:	heparam sulfato
kDa:	kilodaltons
KS:	queratam sulfato
LEC-HABP:	l*ectin homology hyaluronic acid binding protein*
M:	mistura padrão de GAGs
Man:	manose
N-CAM:	neural cell adhesion molecule
NGal:	N-acetilgalactosamina
N-Glu:	N-acetilglucosamina
Ng-CAM:	neuron glial cell adhesion molecule
PAGE:	eletroforese em gel de poliacrilamida
PAPs:	fosfoadenosil fosfato
PBS:	salina tamponada com fosfato
PDA:	tampão 1,3-diaminopropano-acetato 0,05 M, pH 9
PG:	proteoglicano
PGs:	proteoglicanos

PL:	proteína de ligação
PM:	peso molecular
rpm:	rotações por minuto
SDS:	dodecil sulfato de sódio
Ser:	serina
TEMED:	N,N,N',N'- tetrametilmetilenodiamina
Thr:	treonina
U.V.:	ultra-violeta
UDP:	uridina difosfato
V:	volts
Xil:	xilose
Δ:	presença de insaturação
ΔDi 4S:	2-acetoamido-2-deoxi-3-*O*-(ácido β-4,5-enepiranosil urônico)-4-*O*-sulfo-D-galactose
ΔDi 6S:	2-acetoamido-2-deoxi-3-*O*-(ácido β-4,5-enepiranosil urônico)-6-*O*-sulfo-D-galactose

INTRODUÇÃO

1 PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS

1.1 CONCEITOS GERAIS E ESTRUTURAIS

Proteoglicanos (PGs) são macromoléculas complexas formadas por um esqueleto protéico ao qual se ligam, covalentemente, uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs) (WIGHT et. al., 1991; JACKSON et. al.,1991; KJELLÉN & LINDAHL, 1991).

Glicosaminoglicanos, por sua vez, são polímeros lineares formados por unidades dissacarídicas repetitivas em que um dos açúcares é uma hexosamina (α-D-glucosamina, β-D-glucosamina ou β-D-galactosamina) e o outro é um açúcar não-nitrogenado, que pode ser um ácido urônico (ácido β-D-glucurônico ou α-L-idurônico) ou um açúcar neutro (β-D-galactose), unidos por ligações glicosídicas.

Estes compostos apresentam alta densidade de carga aniônica devido aos grupamentos carboxila dos resíduos de ácido urônico e/ou à presença de grupamentos sulfato em diferentes números e posições (JACKSON et. al., 1991; KJELLÉN & LINDAHL, 1991). A Figura 1 apresenta os principais monossacarídeos que estão presentes nos glicosaminoglicanos.

Os glicosaminoglicanos mais comuns encontrados em tecidos de mamíferos são:

- Condroitim sulfato (CS) e dermatam sulfato (DS) – também denominados galactosaminoglicanos devido à presença de N-acetilgalactosamina;
- Heparam sulfato (HS), queratam sulfato (KS), heparina (HEP) e ácido hialurônico (AH) – também denominados glucosaminoglicanos devido à presença de glucosamina;

A distinção entre esses heteropolissacarídeos pode ser feita de acordo com os seguintes parâmetros:

- Tipo de hexosamina;
- Tipo de açúcar não-nitrogenado;
- Tipo de ligações glicosídicas inter- e intradissacarídicas;
- Posição dos grupamentos sulfato e grau de sulfatação.

A Tabela 1 mostra a composição desses glicosaminoglicanos, e as unidades dissacarídicas que os compõem são apresentadas na Figura 2.

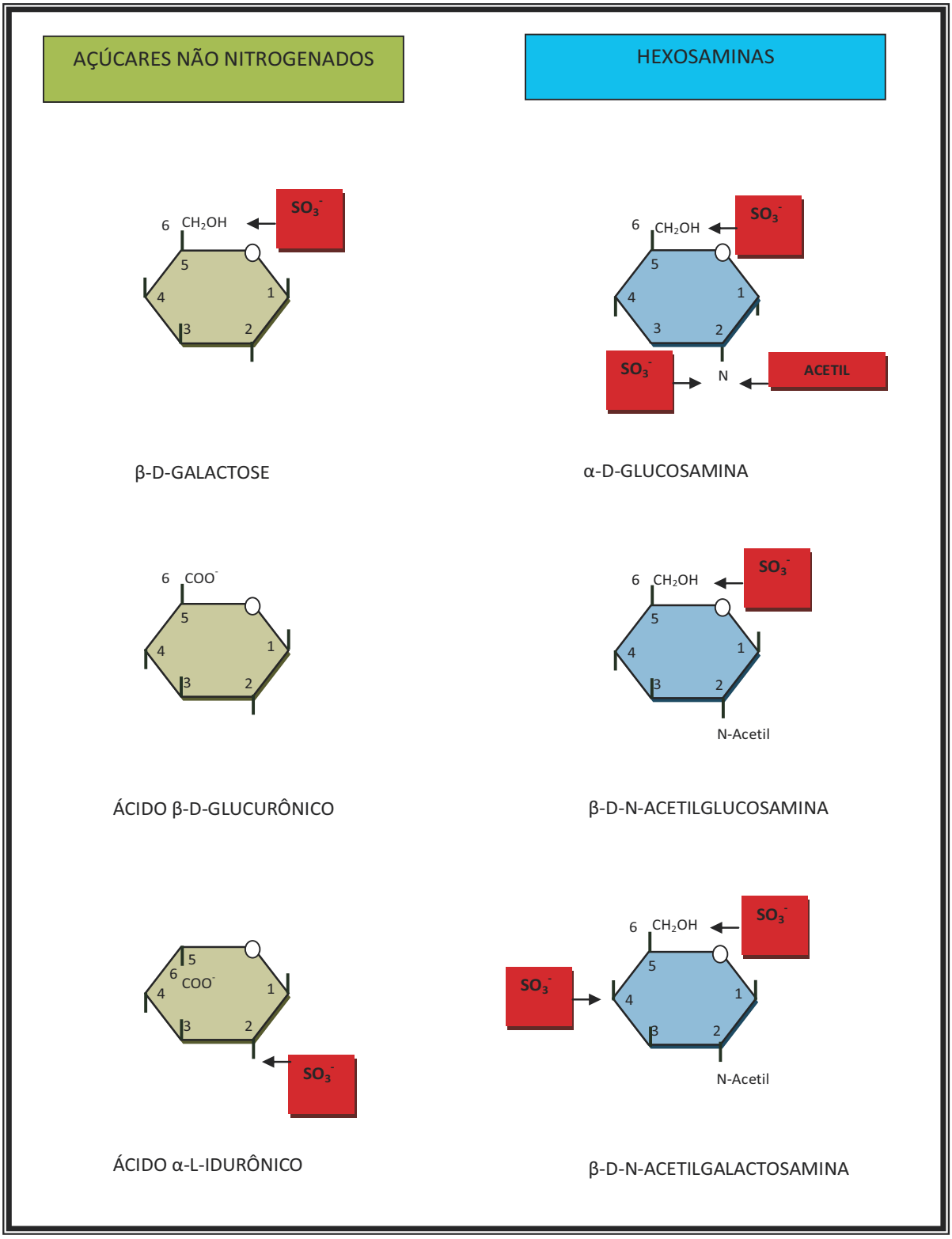


FIGURA 1: MONOSSACARÍDEOS PRESENTES NOS GLICOSAMINOGLICANOS E POSIÇÕES A QUE PODEM SE LIGAR OS GRUPAMENTOS SULFATO.

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DOS GLICOSAMINOGLICANOS

GAGs (Jeanloz, 1960)	P.M.[1]	Açúcar não nitrogenado	Posição do sulfato	Ligação	Hexosamina	Ligação	Posição do sulfato
Ácido hialurônico	5-50 x10^5	Ácido β-D-glucurônico	-	β(1-3)	β-D-N-acetilglucosamina	β(1-4)	-
Condroitim 4-sulfato	2-5 x10^4	Ácido β-D-glucurônico	-	β(1-3)	β-D-N-acetilgalactosamina	β(1-4)	4
Condroitim 6-sulfato	2-7 x10^4	Ácido β-D-glucurônico	-	β(1-3)	β-D-N-acetilgalactosamina	β(1-4)	6
Dermatam sulfato	2-5 x10^4	Ácido α-L-idurônico Ácido β-D-glucurônico	- -	α(1-3) β(1-3)	β-D-N-acetilgalactosamina	β(1-4)	4
Heparam sulfato	1-6 x10^4	Ácido α-L-idurônico Ácido β-D-glucurônico	-/2 -	α(1-4) β(1-4)	α-D-N-acetilglucosamina α-D-glucosamina	α(1-4) α(1-4)	-/6 2/6
Queratam sulfato	1-3 x10^4	β-D-galactose	-/6	β(1-4)	β-D-N-acetilglucosamina	β(1-3)	6
Heparina	0,5-5 x10^4	Ácido α-L-idurônico Ácido β-D-glucurônico	-/2 -	α(1-4) β(1-4)	α-D-glucosamina	α(1-4)	2/6

Estudos mais detalhados demonstraram que a estrutura dos glicosaminoglicanos é muito mais complexa do que se imaginava. Com exceção do ácido hialurônico, único não sulfatado e formado apenas por um tipo de unidade dissacarídica, todos os outros apresentam micro-heterogeneidade estrutural, isto é,

são constituídos por dois ou mais tipos de unidades dissacarídicas (KJELLÉN & LINDAHL, 1991).

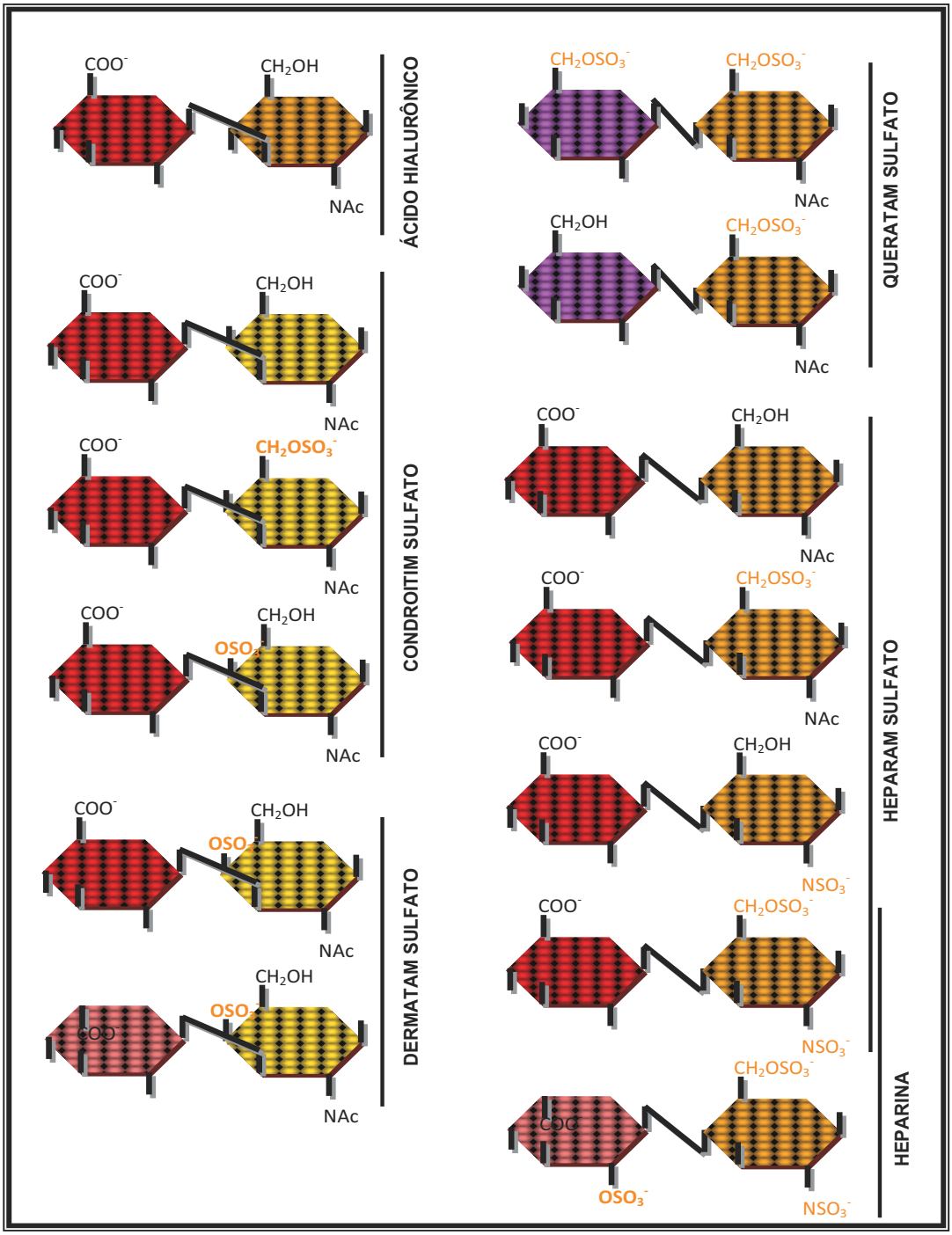


FIGURA 2: PRINCIPAIS UNIDADES DISSACARÍDICAS DOS GLICOSAMINOGLICANOS.

Ácido hialurônico, também conhecido como hialuronam, é o glicosaminoglicano estruturalmente mais simples, constituído pela alternância de N-acetilglucosamina e ácido β-D-glucurônico. Diferentemente dos outros, este é o único que não ocorre nos tecidos covalentemente ligado a um esqueleto protéico. No entanto, pode apresentar em um único polímero cerca de 25000 unidades dissacarídicas e até 25 μm de comprimento, com pesos moleculares de até 10^6 Da (WIGHT et. al., 1991). Em soluções fisiológicas, o ácido hialurônico, que é um poliânion, assume uma conformação um tanto rígida e espacialmente contorcida, o que contribui para a ocupação de grandes áreas. Além disso, podem associar-se por interações não covalentes com outras moléculas específicas e esta interação pode contribuir para a organização e manutenção da matriz onde reside (WIGHT et. al., 1991; IOZZO, 2000).

O condroitim sulfato, por sua vez, é constituído de N-acetilgalactosamina e ácido β-D-glucurônico, com grupamentos sulfato esterificados em C4 e/ou C6 na N-acetilgalactosamina. De acordo com a predominância de um destes dissacarídeos na cadeia, o polímero pode ser denominado condroitim 4-sulfato (antigamente conhecido também por condroitim sulfato A) ou condroitim 6-sulfato (condroitim sulfato C) (MICHELACCI & DIETRICH, 1976; MICHELACCI & DIETRICH, 1986). Para aumentar o grau de complexidade, sabe-se que nem todos os dissacarídeos são sulfatados e, em alguns casos, há relatos de dissacarídeos dissulfatados com um grupamento sulfato extra ligado a N-acetilgalactosamina ou ao ácido urônico (FRANSSON & HAVSMARK, 1970).

O dermatam sulfato (condroitim sulfato B) também é constituído por unidades dissacarídicas que contêm N-acetilgalactosamina com sulfatação em C4, como o condroitim sulfato, porém apresenta ácido α-L-idurônico (FRANSSON & HAVSMARK, 1970), embora ácido β-D-glucurônico também esteja presente, em maior ou menor proporção (POBLACIÓN & MICHELACCI, 1986). Dissacarídeos dissulfatados também foram identificados (POBLACIÓN & MICHELACCI, 1986).

Já o queratam sulfato apresenta em sua estrutura N-acetilglucosamina e galactose. Este dissacarídeo pode ser mono- ou dissulfatado, com os grupamentos sulfato ligados à posição C6 da N-acetilglucosamina e, algumas vezes, à posição C6 da galactose (BROWN et. al., 1994). Demonstrou-se que os dissacarídeos

dissulfatados concentram-se em regiões próximas à extremidade não-redutora dos polímeros (OEBEN et. al., 1987).

O heparam sulfato é considerado o glicosaminoglicano mais complexo. Isto porque suas unidades dissacarídicas contêm glucosamina e ácido β-D-glucurônico ou ácido α-L-idurônico, com diferentes graus de sulfatação, o que resulta na formação de quatro diferentes tipos de unidades dissacarídicas: dissacarídeo 2,6-dissulfatado, dissacarídeo N-acetilado 6-sulfatado, dissacarídeo N-sulfatado e dissacarídeo N-acetilado (DIETRICH et. al., 1998). Há ainda alguns tipos de heparam sulfato com unidades dissacarídicas trissulfatadas, que são típicas da heparina, onde há um grupamento sulfato extra no resíduo de ácido urônico (NADER et. al., 1987). A estrutura do heparam sulfato é tecido-específica (DIETRICH et. al., 1983) e as diferentes unidades dissacarídicas são dispostas de maneira ordenada nas moléculas (TERSARIOL et. al., 1994; TURNBULL & GALLAGHER, 1991), sugerindo etapas biossintéticas bem controladas.

A heparina apresenta em sua estrutura unidades de β-D-glucosamina e ácidos β-D-glucurônico ou α-L-idurônico. Apresenta a maior densidade de cargas aniônicas de todos os glicosaminoglicanos sulfatados. Sua unidade estrutural básica é um hexassacarídeo octassulfatado, constituído por dois dissacarídeos trissulfatados e um dissulfatado (SILVA & DIETRICH, 1975). Os resíduos de ácido urônico são α-L-idurônico (70 a 80%) e β-D-glucurônico (20 a 30%) (LINDAHL & AXELSSON, 1971), sendo que 70 a 80% dos resíduos de ácido α-L-idurônico estão sulfatados na posição C2, enquanto que, o ácido β-D-glucurônico raramente apresenta-se sulfatado (SILVA & DIETRICH, 1975). A hexosamina é α-D-glucosamina, sulfatada em N2 e C6.

Estes compostos já foram identificados em todo o reino animal, desde espongiários até mamíferos (CÁSSARO & DIETRICH, 1977; CHAVANTE et. al., 2000; DIETRICH et. al., 1989; MEDEIROS et. al., 2000; PAVÃO et. al., 1995).

Como descrito anteriormente, exceto ácido hialurônico, os demais glicosaminoglicanos ocorrem nos tecidos covalentemente ligados a um esqueleto protéico, formando os proteoglicanos, que por sua vez, podem ainda conter oligossacarídeos *N*-e/ou *O*-ligados (LOHMANDER et. al., 1980; NILSSON et. al., 1982; THONAR & SWEET, 1979). O número de cadeias de glicosaminoglicanos ligadas ao esqueleto protéico pode variar entre 1 e 100 unidades (KJELLÉN &

LINDAHL, 1991; IOZZO, 1998). Seus pesos moleculares podem ter entre 5 e 100 kDa, com comprimentos de 10 a 200 nm.

A região de ligação é formada por um tetrassacarídeo glucuronil-galactosil-galactosil-xilose (GlcUA-Gal-Gal-Xil), cuja extremidade redutora liga-se à hidroxila de um resíduo de serina da proteína por uma ligação *O*-glicosídica. A extremidade não-redutora do tetrassacarídeo liga-se à cadeia de glicosaminoglicano. Essa região de ligação foi descrita para heparina (LINDAHL, 1966a; 1966b), condroitim sulfato (SCHWARTZ & RÓDEN, 1975), dermatam sulfato (FRANSSON, 1968) e heparam sulfato (FRANSSON et. al., 1985). Estudos posteriores demonstraram que há uma fosforilação na posição C2 da xilose tanto nas cadeias de condroitim sulfato (OEGEMA et. al., 1984) como nas cadeias de heparam sulfato (FRANSSON et. al., 1985), sugerindo que este grupamento fosfato seja um sinal para o reconhecimento de enzimas biossintéticas ou deslocamento do proteoglicano no Complexo de Golgi (FRANSSON et. al., 1985), de modo análogo ao que ocorre com os oligossacarídeos *N*-ligados, onde a fosforilação em C6 da manose é o sinal para o reconhecimento das glicoproteínas lisossomais (KORNFELD, 1982; 1987).

Quanto ao queratam sulfato, dois tipos são diferenciados, com base na estrutura da região de ligação e localização tecidual: queratam sulfato I, presente em córnea (BLOCHBERGER et. al., 1992), ligado ao esqueleto protéico por um oligossacarídeo N-ligado ao grupamento amida de um resíduo de asparagina (BAKER et. al., 1975), e com estrutura típica de oligossacarídeos *N*-ligados de glicoproteínas, e o queratam sulfato II, presente em cartilagem e núcleo pulposo, que se liga ao esqueleto protéico por um oligossacarídeo tipo *O*-ligado a um resíduo de serina ou treonina (BRAY et. al., 1967).

As regiões de ligação entre glicosaminoglicanos e o esqueleto protéico são apresentadas na Figura 3.

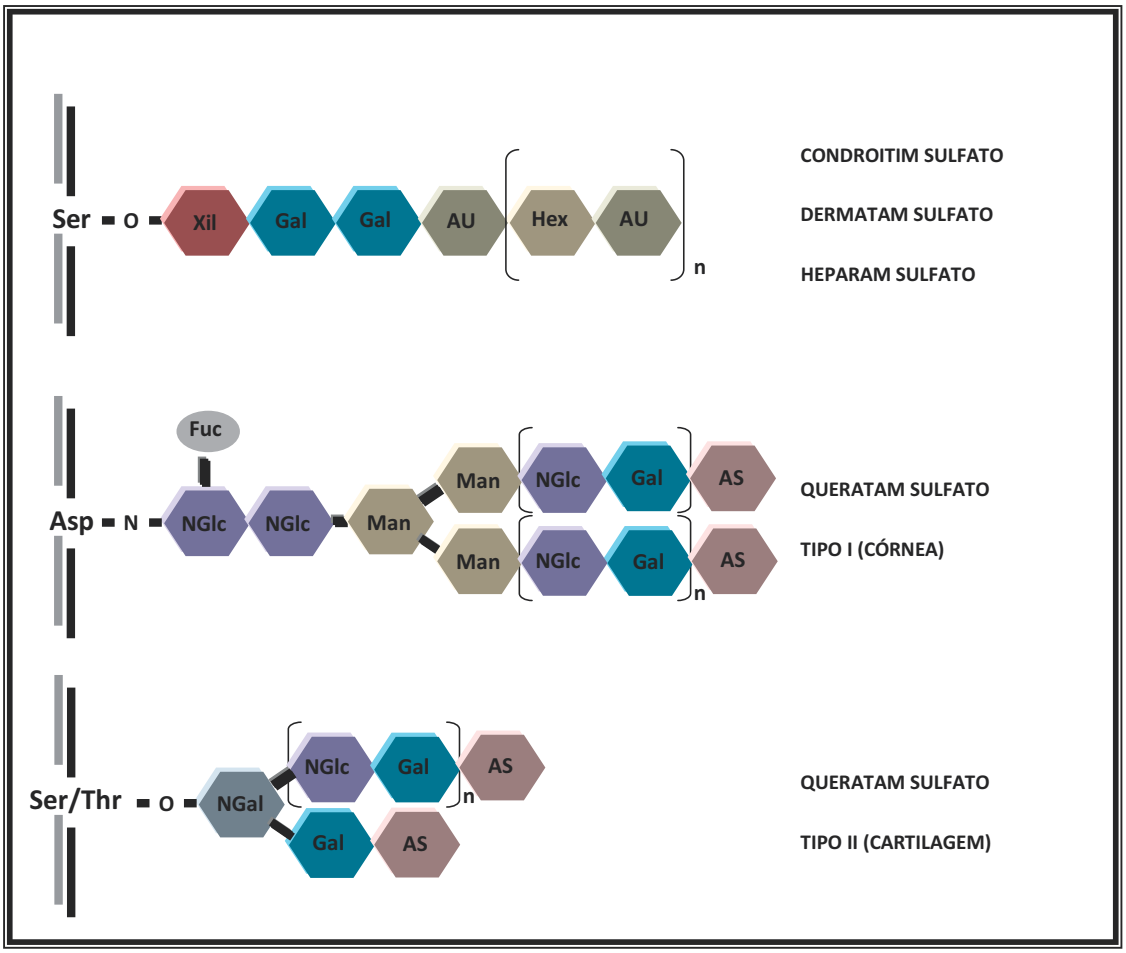


FIGURA 3: REGIÃO DE LIGAÇÃO DOS GLICOSAMINOGLICANOS AO ESQUELETO PROTÉICO.

Xil: xilose; Gal: galactose; AU: ácido urônico; Hex: hexosamina; NGal: N-acetilgalactosamina; NGlc: N-acetilglucosamina; AS: ácido siálico; Man: manose; Ser: serina; Asp: asparagina; Thr: treonina; Fuc: fucose.

2 CLASSIFICAÇÃO, DISTRIBUIÇÃO E FUNÇÕES BIOLÓGICAS DOS PROTEOGLICANOS

Os proteoglicanos estão presentes em todos os tecidos animais e são sintetizados por todos os tipos celulares. Demonstrou-se que tanto a distribuição (CÁSSARO & DIETRICH, 1977; DIETRICH et. al., 1976) quanto os papéis biológicos são muito diversificados. Incluem desde suporte mecânico até efeitos intrínsecos e altamente específicos em vários processos celulares como adesão, motilidade e controle de proliferação celular (DIETRICH, 1982; DIETRICH et. al., 1984).

A princípio, os proteoglicanos foram classificados segundo as cadeias de glicosaminoglicanos presentes. No entanto, o mesmo glicosaminoglicano pode estar ligado a mais de um tipo de esqueleto protéico. Por outro lado, o mesmo esqueleto protéico pode estar glicosilado com mais de um tipo de glicosaminoglicano, dificultando a classificação (KJELLÉN & LINDAHL, 1991).

Atualmente, a forma mais comumente utilizada para classificar os proteoglicanos baseia-se em sua localização e na estrutura do esqueleto protéico, determinada graças ao avanço das técnicas de Biologia Molecular.

Os proteoglicanos estão presentes em:

- Células:
  - Grânulos citoplasmáticos
  - Superfície celular
- Matriz extracelular:
  - Membrana basal
  - Matriz intersticial

A Tabela 2 apresenta a classificação dos proteoglicanos melhor estudados até o momento.

TABELA 2 – CLASSIFICAÇÃO DOS PROTEOGLICANOS

LOCALIZAÇÃO			CLASSIFICAÇÃO	NOME	PTN (~kDa)	GAGs	CÉLULAS E TECIDOS
PROTEOGLICANOS CELULARES	GRÂNULOS CITOPLASMÁTICOS		Família do Serglicim	Serglicim	14-17	CS/DS /Hep	Mastócitos Série leucocitária
			PG facultativo	Cromograninas	110	CS	Grânulos cromafins
	SUPERFÍCIE CELULAR	ANCORADOS POR GPI	Família do Glipicam	Glipicam 1	67	HS	Hepatócitos, Fibroblastos Neurais, Cardíacas (fase embrionária)
				Glipicam 2 (Cerebroglicam)	60	HS	Neurais (fase embrionária)
				Glipicam 3 (OCI-5)	60	HS	Células intestinais
				Glipicam 4 (k-Glipicam)	60	HS	Neurais e epiteliais
				Glipicam 5 (GPC-5)	60	HS	Neurais
				Glipicam 6	60	HS	Intestinais, hepáticas, renais
		TRANSMEMBRÂNICOS	Família do Sindecam	Sindecam 1	309-313	CS/HS	Células epiteliais
				Sindecam 2 (Fibroglicam)	201- 211	HS	Fibroblastos e hepatócitos
				Sindecam 3 (N-Sindecam)	442	CS/HS	Endotélio, muscular lisa, vascular e nervosa
				Sindecam 4 (Riodocam ou Anfiglicam)	197-202	HS	Endotélio, muscular lisa vascular, adipócitos, fibroblastos, hepatócitos
			Outros PGs	Betaglicam	140	CS/HS	Fibroblasto
				CD 44	25-39	CS/HS	Linfócito e epitélio
				Trombomodulina	57	CS/DS	Endotélio e muscular
				NG2	252	CS	Neurais e mesênquima
				Neuroglicam C	120	CS	Neurônios em desenvolvimento
PROTEOGLICANOS DE MATRIZ EXTRACELULAR	MATRIZ EXTRACELULAR	MB		Perlecam	400-450	HS	Membranas basais
				Agrim	200	HS	Membranas basais
				Bamacam	138	CS	Membranas basais
		MATRIZ INTERSTICIAL	SLRPs (*Small leucine rich Proiten*) – Baixo peso molecular	Decorim	40	CS/DS	Tecido conjuntivo
				Biglicam	40	CS DS	Tecido conjuntivo
				Fibromodulim	42	KS	Tecido conjuntivo
				Lumicam	38	KS	Córnea
				Queratocam	38	KS	Córnea e tecido conjuntivo
				PRELP	44	KS	Cartilagem articular e fibroblasto
				Osteoaderim	42	KS	Tecido ósseo
				Epificam (PG-Lb)	35	CS/DS	Tecido ósseo
				Mimecam (osteoglicim)	35	KS	Tecido ósseo e córnea
			LEC-HAPB ou Hialectans – Alto peso molecular	Agrecam	220-250	CS/KS	Cartilagem
				Versicam	265-370	CS/DS	Fibroblasto
				Neurocam	136	CS	Cérebro de rato
				Brevicam	100	CS	Cérebro bovino
			Outros PGs	Apicam	100-110	CS	Astrócitos
				Colágeno tipo IX (α2)		CS	Cartilagem e humor vítreo

LEC-HAPB: Lectina/EGF/proteína regulatória do complemento-proteína que se liga ao ácido hialurônico

MB: membrana basal

Proteoglicano facultativo: esqueleto protéico que pode estar ou não substituídos com cadeias de glicosaminoglicanos

2.1 PROTEOGLICANOS CELULARES

2.1.1 PROTEOGLICANOS DE GRÂNULOS CITOPLASMÁTICOS

Os proteoglicanos que se localizam em grânulos citoplasmáticos são glicoconjugados celulares de baixo peso molecular. Os membros dessa família melhor caracterizados são o serglicim e a cromogranina A.

O serglicim é caracterizado por apresentar um esqueleto protéico rico em Ser-Gly, com 24 sequências repetitivas deste dipeptídeo. Acredita-se que esta sequência corresponda ao sítio de glicosilação para cadeias de condroitim sulfato, dermatam sulfato ou heparina, dependendo do tipo celular (Figura 4). Cerca de dez a quinze cadeias de glicosaminoglicanos estão distribuídas no esqueleto protéico com peso molecular que varia de 14 a 17 kDa (STEVENS et. al., 1989). Apenas mastócitos sintetizam proteoglicanos glicosilados com heparina (NADER & DIETRICH, 1989).

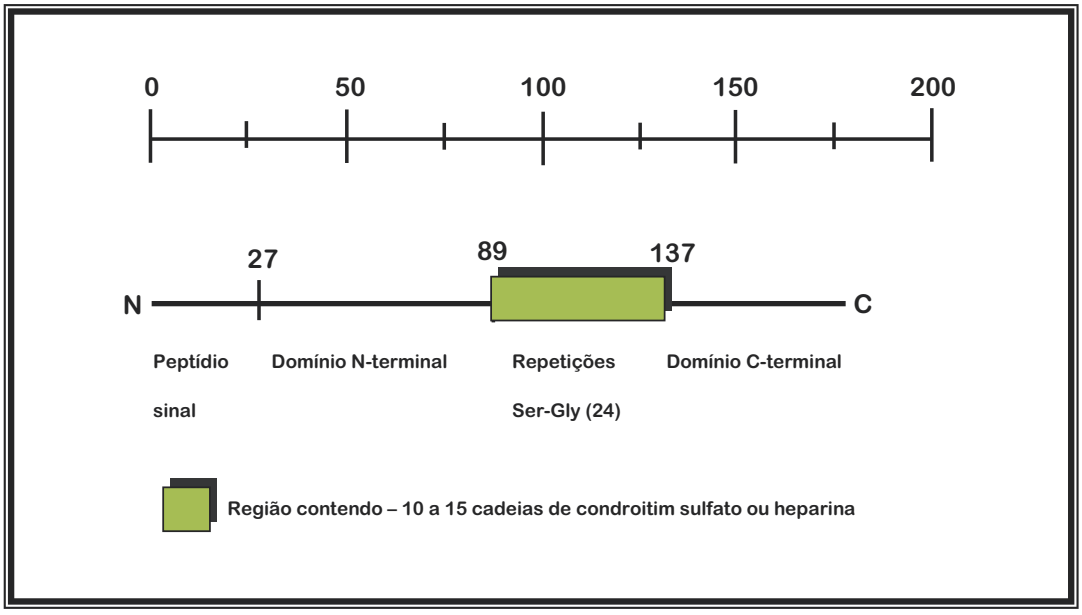


FIGURA 4: ESTRUTURA DO ESQUELETO PROTÉICO DOS PROTEOGLICANOS DA FAMÍLIA SERGLICIM.

Estes proteoglicanos já foram identificados em grânulos secretórios de mastócitos, linfócitos T citotóxicos, *natural killer*, monócitos, macrófagos, basófilos,

eosinófilos, neutrófilos e plaquetas (ANGERTH et. al., 1990; AVRAHAM et. al., 1988; NADER, 1991; ROTHENBERG et. al., 1988; TANTRAVAHI et. al., 1986; IOZZO, 1998). Acredita-se que estes têm importante função no empacotamento e ativação de serino-proteases básicas e histamina. Há, ainda, evidências de que a heparina funcione em mecanismos de defesa do organismo, regulando reações inflamatórias (SANTOS et. al., 1996; STRAUS et. al., 1982).

O outro proteoglicano presente em grânulos é a cromogranina A, caracterizado como um proteoglicano facultativo de condroitim sulfato com peso molecular de 110 kDa, que foi isolado de grânulos cromafins. Estes grânulos são organelas das células da medula adrenal, que armazenam catecolaminas e peptídeos e de células de feocromocitoma (PC12) (GOWDA et. al., 1990).

2.1.2 PROTEOGLICANOS DE SUPERFÍCIE CELULAR

Há uma grande variedade de proteoglicanos na superfície celular, que estão divididos em três grupos de acordo com o tipo de interação com a membrana plasmática (Figura 5):

- **PGs transmembrânicos**, que são caracterizados pela presença de um domínio hidrofóbico em seu esqueleto protéico e atravessam a membrana (KJELLÉN et. al., 1981);
- **PGs ligados covalentemente a uma âncora lipídica de glicosilfosfatidilinositol** (GPI) da camada externa da membrana (CAREY & EVANS, 1989);
- **PGs que interagem não-covalentemente**, por meio do esqueleto protéico ou das cadeias de glicosaminoglicanos, com receptores da membrana (KJELLÉN et. al., 1980).

As cadeias de glicosaminoglicanos ficam sempre no lado não-citosólico da membrana.

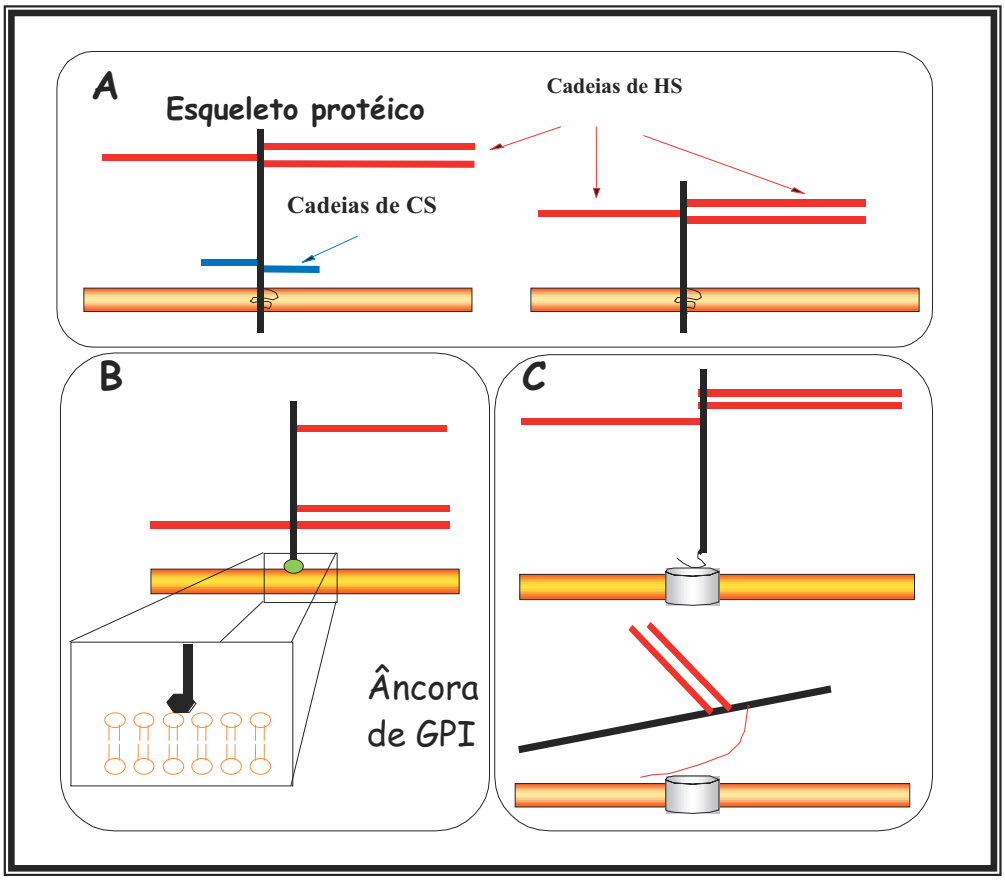


FIGURA 5: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS PROTEOGLICANOS DE SUPERFÍCIE CELULAR. (A): Proteoglicanos transmembrânicos; (B): Proteoglicanos ligados covalentemente a uma âncora de GPI; (C): Proteoglicanos que podem interagir não-covalentemente com cadeias de glicosaminoglicanos ou pelo esqueleto protéico, com receptores da membrana.

2.1.2.1 PROTEOGLICANOS TRANSMEMBRÂNICOS

Os proteoglicanos transmembrânicos incluem a família dos sindecans, betaglicam, CD44, trombomodulina, NG2 e neuroglicam C.

Os proteoglicanos da família dos sindecans apresentam principalmente cadeias de heparam sulfato ligadas ao esqueleto protéico. A presença deste glicosaminoglicano foi inicialmente identificada na superfície celular (KRAEMER et. al., 1971). Sua estrutura consiste de um esqueleto protéico que contém um domínio extracelular, ou ectodomínio N-terminal, com sequências consenso Ser-Gly (onde

ocorre a glicosilação de cadeias de glicosaminoglicanos e localiza-se um peptídeo sinal necessário para a externalização desta região após a síntese intracelular), um domínio hidrofóbico transmembrânico e um domínio citoplasmático C-terminal curto. Estes dois últimos apresentam um alto grau de conservação nos diferentes membros da família, bem como em diferentes espécies, o que não ocorre com o domínio extracelular.

Atualmente, a família dos sindecans é classificada em duas subfamílias de acordo com as sequências consenso, os sítios de glicosilação de glicosaminoglicanos e o tamanho do esqueleto protéico: (1) sindecans 1 e 3; (2) sindecans 2 e 4. Estes, por sua vez, apresentam distribuição tecido-específicos e, de acordo com seus possíveis papéis biológicos, também recebem outras denominações (BERNFIELD et. al., 1992; KOJIMA et. al., 1992; DAVID et. al., 1992) (Figura 6). São eles:

- Sindecam-1 (ou simplesmente sindecam), que está localizado na superfície basolateral das células epiteliais e células do tecido epitelial estratificado;
- Sindecam-2 (ou fibroglicam) encontrado em coração, cérebro, rim, fígado e baço, além de hepatócitos e fibroblastos em cultura;
- Sindecam-3 (ou N-sindecam) expresso em coração, endotélio e células da musculatura lisa vascular, epitélio estratificado e ainda em células nervosas;
- Sindecam-4 (ruidocam ou anfiglicam) encontrado em endotélio e musculatura lisa vascular, fibroblastos, adipócitos e hepatócitos em cultura.

Inúmeras funções biológicas têm sido atribuídas aos proteoglicanos da família dos sindecans: participação na organização do citoesqueleto (CAREY et. al., 1994), envolvimento nas interações célula-célula (WOODS & COUCHMAN, 1994), polarização de células epiteliais (SVENNEVIG et. al., 1995), auxílio na ligação do fator de crescimento FGF-II (YAYON et. al., 1991), participação no processo de invasão de certos parasitas (SHIEH et. al., 1992; VAN PUTTEN & PAUL, 1995), importante participação na ancoragem das células aos componentes da matriz extracelular e consequentemente, manutenção do tecido epitelial, incluindo colágenos tipo I, III e V (KODA et. al., 1985), fibronectina (SAUNDERS et. al., 1988), trombospondina (SUN et. al., 1989) e tenascina (SALMIVIRTA et. al., 1991) e ainda,

moduladores da atividade de algumas proteases e seus inibidores, como por exemplo, no metabolismo de lipoproteínas (FUKI et. al., 1997; WILSIE et. al., 2005).

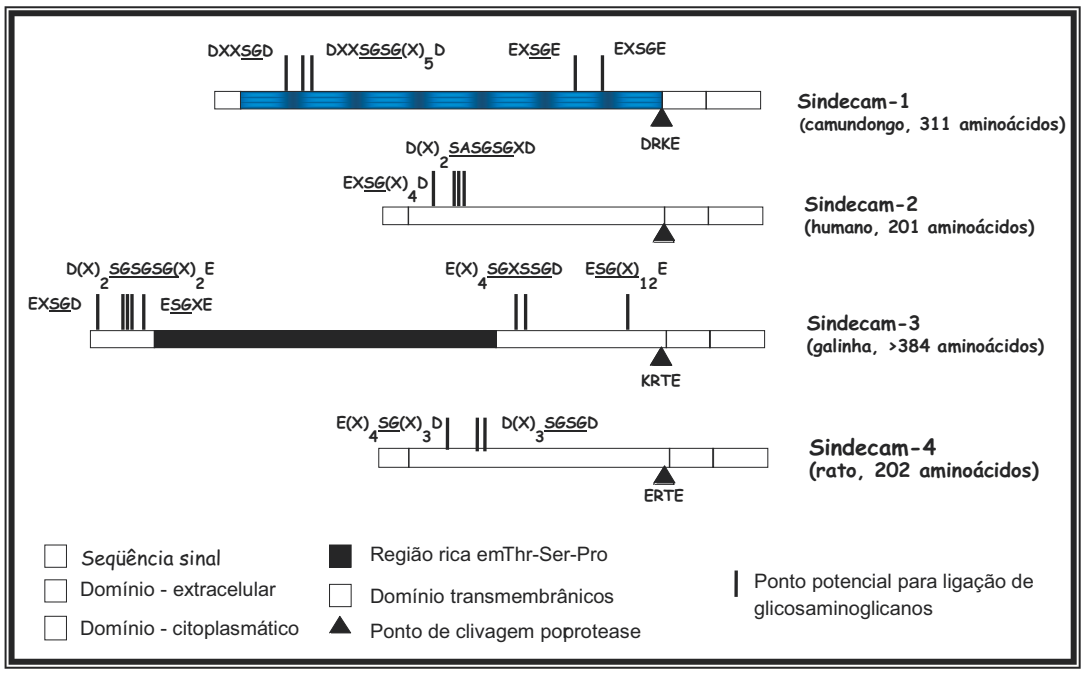


FIGURA 6: ESQUEMA DA ESTRUTURA DO ESQUELETO PROTÉICO DOS SINDECANS.

O betaglicam, proteoglicano que contém cadeias de heparam sulfato e condroitim sulfato ligadas ao esqueleto protéico, com peso molecular que varia de 110 a 140 kDa, é um receptor tipo III para o fator de crescimento TGFβ (T*ransforming Growth Factor-β*). É um proteoglicano facultativo e não precisa de suas cadeias de glicosaminoglicanos para funcionar como receptor (CHEIFETZ & MASSAGUÉ, 1989; BOYD et. al., 1990). A partir da determinação do seu cDNA, verificou-se a presença de 853 aminoácidos distribuídos em um grande domínio N-terminal extracelular com pelo menos um sítio de glicosilação, um domínio transmembrânico hidrofóbico e um domínio citoplasmático de 41 a 43 aminoácidos (WANG et. al., 1991).

O CD44 é também um proteoglicano facultativo que pode ter cadeias de condroitim sulfato e/ou uma cadeia de heparam sulfato covalentemente ligadas ao esqueleto protéico (DAVID, 1992). Semelhante ao sindecam, CD44 tem domínio intracelular C-terminal curto e altamente conservado e longo domínio extracelular (JALKANEN et. al., 1987). Pertence a uma família polimórfica de glicoproteínas

integrais de membrana que desempenha função de receptor de ácido hialurônico na maioria das células (revisão DAY & PRESTWICH, 2002) e também de componentes da matriz extracelular e de linfócitos. Atua ainda como molécula de adesão e migração em vários processos fisiológicos e fisiopatológicos, como exemplo em metástase tumoral (COUCHMAN & WOODS, 1993; MARTIN et. al., 2003; PONTA et. al., 2003).

A trombomodulina é um proteoglicano integral de membrana que apresenta uma única cadeia de condroitim sulfato (ou dermatam sulfato) ligada ao esqueleto protéico. É encontrada na superfície luminal do endotélio vascular e também na camada celular localizada abaixo das células musculares. Atua como cofator da trombina na ativação da proteína C que, quando ativada, cliva os fatores Va e VIIIa, impedindo a formação do fator Xa, levando à inibição da coagulação. Sua cadeia de glicosaminoglicano não é necessária para a ligação de trombina e ativação da proteína C, mas é essencial para inibir as atividades pró-coagulantes da trombina, quando ligada a trombomodulina (BOURIN & LINDAHL, 1993).

Há ainda o NG2, proteoglicano que apresenta duas ou três cadeias de condroitim sulfato ligadas covalentemente à proteína. Está presente em células neurais e mesênquima. Apresenta um longo esqueleto protéico (cerca de 2325 aminoácidos) com peso molecular de aproximadamente 252 kDa, no qual há nove sequências Ser-Gly que podem ser glicosiladas. Liga-se ao colágeno tipo IV e está relacionado a processos de adesão celular (NISHIYAMA et. al., 1991; STALLCUP, 1981).

E por fim, o neuroglicam C que é um proteoglicano de condroitim sulfato de 150 kDa e esqueleto protéico de 120 kDa. Neste há cerca de 539 aminoácidos divididos em um domínio extracelular (onde há uma sequência sinal terminal, uma região de glicosilação, uma região de ligação para EGF), domínio transmembrânico e citoplasmático (YASUDA et. al., 1998). Estudos de imuno-histoquímica revelaram que esse proteoglicano está presente em neurônios em desenvolvimento, participando da diferenciação, adesão e sinaptogênese (WATANABE et. al., 1995; AONO et. al., 2000).

2.1.2.2 PROTEOGLICANOS LIGADOS POR ÂNCORAS DE GPI

Os proteoglicanos ligados covalentemente a uma âncora lipídica de GPI (glicosilfosfatidilinositol) são representados pela família dos glipicans.

A família dos glipicans é constituída por proteoglicanos que apresentam cadeias de heparam sulfato ligadas a um esqueleto protéico, que contém cerca de 500 aminoácidos, cujo peso molecular varia de 55 a 70 kDa. Os domínios presentes e comuns a todos os membros desta família são apresentados na Figura 7. Na região N-terminal há um peptídeo sinal e na região C-terminal outro peptídeo importante para a glipiação (ligação covalente a âncora de GPI). Todos os membros desta família apresentam de dois a cinco sítios de glicosilação e significativa conservação das sequências polipeptídicas, com destaque para 14 resíduos de cisteína, os quais formam pontes dissulfeto, que contribuem para a conservação da estrutura tridimensional (COUCHMAN & WOODS, 1993).

Atualmente são encontrados seis tipos diferentes em vertebrados. O glipicam-1 foi localizado em hepatócitos, fibroblastos, células de Schwann, células de coração na fase embrionária (COUCHMAN & WOODS, 1993). Já o glipicam-2 ou cerebroglicam é expresso somente durante o desenvolvimento, no sistema nervoso (STIPP et. al., 1994). O glipicam-3 (OCI-5) também é um proteoglicano de heparam sulfato ancorado à membrana por GPI em células intestinais, que tem sua expressão regulada durante o desenvolvimento (FILMUS et. al., 1995). Há ainda, o glipicam-4 ou k-glipicam, presente em células epiteliais tubulares de rins e neuroepiteliais em processo de desenvolvimento e o glipicam-5, que também é expresso no sistema nervoso durante o desenvolvimento embrionário e rins (SAUDERS et. al., 1997). O membro mais recente desta família é o glipicam-6 identificado em tecido mesenquimal durante o desenvolvimento embrionário de ratos e células musculares lisas (VEUGELERS et. al., 1999).

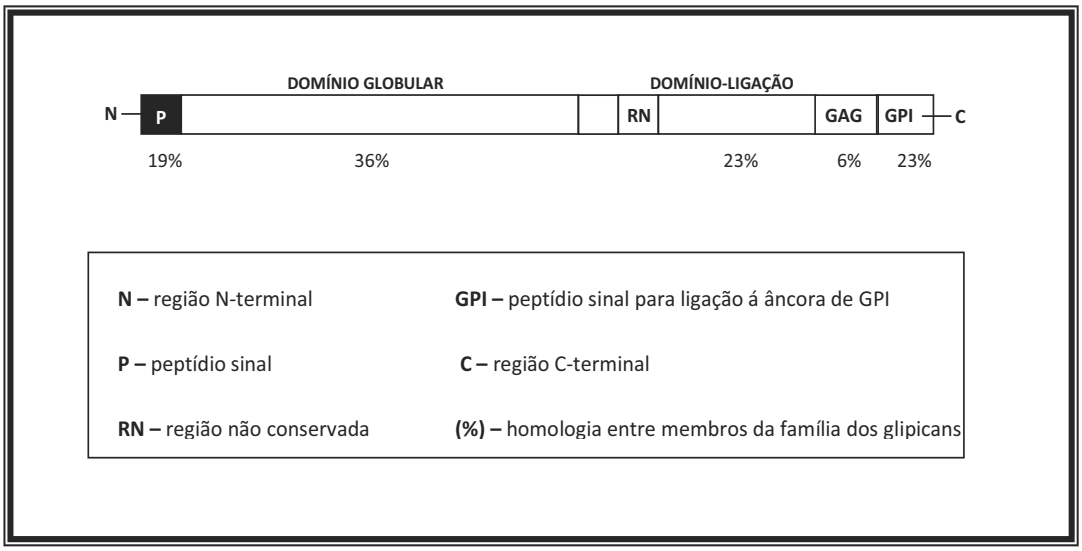


FIGURA 7: ESQUEMA DOS DOMÍNIOS COMUNS PRESENTES NOS MEMBROS DA FAMÍLIA DOS GLIPICANS.

A atividade de proteoglicanos de heparam sulfato está relacionada à regulação da resposta celular. Agem como correceptores de fatores de crescimento, contribuindo para ativação das vias de sinalização celular (ROUSLAHTI & YAMAGUCHI, 1991), como exemplo o glipicam-4, que modula sinalização de FGF (*Fibroblast Growth Factor*) de células neurais precursoras e suprime o efeito mitogênico do mesmo em células corticais precursoras em *Xenopus leavis* (HAGIHARA et. al., 2000). Também regula a ação de HGF *(Hepatocite Growth Factor)* no desenvolvimento e morfogênese do tecido epitelial renal (KARIHALOO et. al., 2004). Dietrich (1984) atribuiu ao heparam sulfato uma função de reconhecimento célula-célula e controle do ciclo celular. Outros estudos demonstraram ainda, que o glipicam também interage com moléculas que estão envolvidas com adesão e migração celular (CAREY et. al., 1993).

2.2 PROTEOGLICANOS DE MATRIZ EXTRACELULAR

Como citado inicialmente, os proteoglicanos também estão presentes na matriz extracelular e são divididos em dois grupos: proteoglicanos de membrana basal e proteoglicanos de matriz intersticial. Estes últimos, por sua vez, são classificados em dois subgrupos: proteoglicanos de baixo peso molecular ou da família das proteínas ricas em leucinas e proteoglicanos de alto peso molecular, da família LEC-HABP. Há, ainda, proteoglicanos que não se encaixam em nenhum desses grupos.

2.2.1 PROTEOGLICANOS DE MEMBRANA BASAL

A membrana basal é uma matriz extracelular especializada que se localiza entre o epitélio (ou o endotélio) e o tecido conjuntivo. Bioquimicamente complexa e heterogênea, é formada pela associação de uma lâmina basal, que por sua vez, é constituída por colágeno tipo IV, laminina e proteoglicanos, com um conjunto de fibras reticulares, complexos de proteína e glicoproteínas. Nesta estrutura, os proteoglicanos melhor caracterizados são o perlecam, o agrim e o bamacam.

Perlecam, proteoglicano identificado inicialmente em tumor EHS (*Engelbreth-Holm-Swarm*) e cujo nome foi atribuído por apresentar-se com formato de “colar de pérolas” à microscopia eletrônica de sombreamento entre os componentes da matriz extracelular (OLSEN, 1999), constitui uma família de proteoglicanos de heparam sulfato, localizada especificamente na membrana basal. É um dos primeiros constituintes desta estrutura a ser expresso durante o desenvolvimento embrionário. Proteoglicano de alto peso molecular (400–450 kDa), o perlecam é constituído de um esqueleto protéico com cinco domínios distintos homólogos a outras proteínas de matriz extracelular e de superfície celular, bem como moléculas de adesão (HAYASHI et. al., 1992) e fatores de crescimento (AVIEZER et. al., 1994). No domínio N-terminal, três ou quatro cadeias de heparam sulfato (40-60 kDa) estão covalentemente ligadas (NOONAM et. al.,1991; IOZZO et. al., 1998).

Vários tipos de células, entre as quais se incluem epiteliais, endoteliais, fibroblastos de pulmão e células tumorais são capazes de sintetizar perlecam. Inúmeros trabalhos evidenciam uma relação importante deste proteoglicano com a diferenciação celular e morfogênese tecidual durante a embriogênese (IOZZO et. al., 1994). Um órgão muito rico em perlecam é o rim, especialmente o glomérulo renal, por ser rico em membrana basal (membrana basal glomerular). A Figura 8 mostra um esquema da estrutura do esqueleto protéico dos PGs da família perlecam.

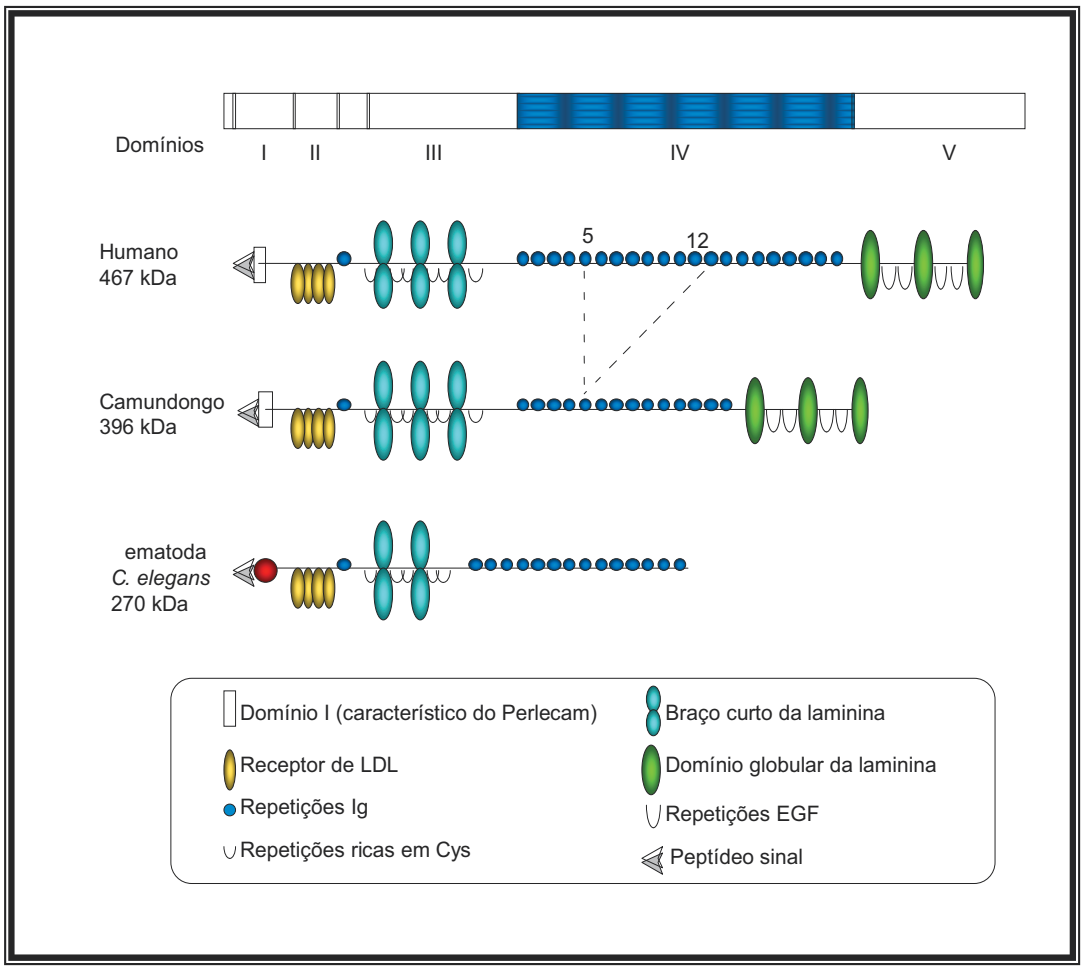


FIGURA 8: ESTRUTURA DO ESQUELETO PROTÉICO DE PERLECANS DE DIFERENTES ORIGENS.

Outro proteoglicano de heparam sulfato pertencente a este grupo é o agrim, que tem função importante na agregação de receptores de acetilcolina nas junções neuromusculares, onde é expresso durante a embriogênese (TSEN et. al., 1995; RUEGG et. al., 1996; DENZER et. al., 1996). Também está presente nas membranas basais dos túbulos renais (HAGEN et. al., 1993). Além disso, foi atribuída a este proteoglicano uma importante função na manutenção da impermeabilidade microvascular cerebral (BARBER et. al., 1997).

Similar ao perlecam, o agrim também é constituído por um esqueleto protéico com vários domínios, cujo peso molecular é de aproximadamente 225 kDa, que pode estar glicosilado por 2 ou 3 cadeias de heparam sulfato. O domínio I permite a ligação de laminina-1; o domínio II caracteriza-se por apresentar repetições tipo folistatina e pela presença de dois módulos, tipo EGF, semelhantes aos encontrados na laminina e pode funcionar como inibidor de proteases ou ligar fatores de crescimento; o domínio III é muito glicosilado e apresenta dois sítios de ligação para glicosaminoglicanos e vários para oligossacarídeos *O*-ligados; o domínio IV tem grande semelhança com o perlecam (IOZZO,1998) (Figura 9).

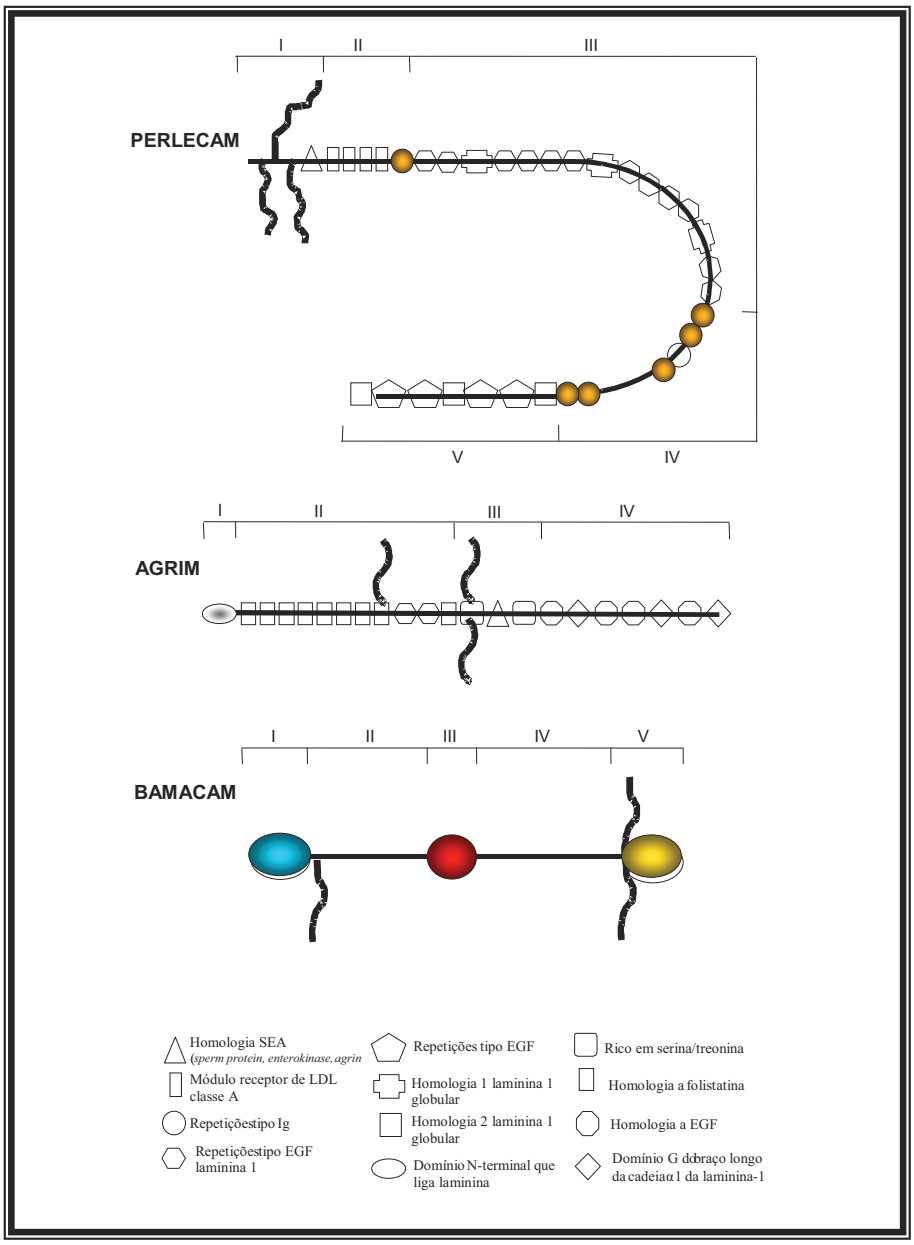


FIGURA 9: ESTRUTURA DO ESQUELETO PROTÉICO DE PROTEOGLICANOS DE MEMBRANA BASAL: PERLECAM, AGRIM E BAMACAM.

O último proteoglicano presente nas membranas basais, especificamente na lâmina basal, é o bamacam. Diferentemente dos outros dois proteoglicanos, este contém cadeias de condroitim sulfato covalentemente ligadas ao esqueleto protéico (WU & COUCHMAN, 1997) com peso molecular é de 135 kDa. A proteína é organizada em domínios (5), onde apenas os domínios II e V podem ser glicosilados

por condroitim sulfato (Figura 9). Bamacam foi identificado na membrana basal embrionária localizada entre o endoderma parietal e o trofoblasto (IOZZO & CLARK, 1986), em matriz do tumor EHS e vários outros tecidos (WU & COUCHMAN, 1997).

2.2.2 PROTEOGLICANOS DE MATRIZ INTERSTICIAL

Conforme já mencionamos, na matriz intersticial são encontradas duas famílias principais de proteoglicanos com estruturas diferentes: a primeira é representada pelos proteoglicanos de baixo peso molecular, também denominada SLRP (*Small Leucine-Rich Protein*), e a segunda é constituída de proteoglicanos de alto peso molecular da família LEC-HABP. Há, ainda, outros proteoglicanos que não se enquadram nas classes citadas.

2.2.2.1 PROTEOGLICANOS DE BAIXO PESO MOLECULAR

A Figura 10 apresenta de forma esquemática alguns proteoglicanos de baixo peso molecular.

Membros deste grupo de proteoglicanos foram identificados pela primeira vez em tecido ósseo (FISHER et. al., 1983) e subsequentemente na matriz extracelular de praticamente todos os tecidos estudados posteriormente. Representam um grupo de moléculas com motivos estruturais similares, nos quais há regiões ricas em resíduos de leucina flanqueados nos dois lados por pequenas sequências ricas em cisteína. Além disso, há também grande variação no domínio N-terminal, onde podem estar ligadas cadeias de glicosaminoglicanos ou resíduos sulfatados de tirosina, seguidos de agrupamentos de quatro cisteínas. Pontes dissulfeto são encontradas na região C-terminal. Estas características comuns induzem à idéia de que estes proteoglicanos apresentam funções similares. No entanto, suas sequências protéicas sugerem que a evolução destes diferentes proteoglicanos tenha ocorrido a partir de diferentes genes ao longo do tempo.

Baseado no esqueleto protéico e na organização genômica, os nove membros deste grupo foram são classificados em três classes. A Tabela 3 apresenta as características dos proteoglicanos dessa família.

Na classe I estão presentes decorim e biglicam, os quais apresentam a maior homologia entre si, com cerca de 57%. Já fibromodulim, lumicam, queratocam, PRELP e osteoaderim pertencem à classe II. Nesta classe, estes proteoglicanos estão ainda divididos em duas subfamílias, de acordo com o grau de homologia: fibromodulim e lumicam (48% idênticos) e queratocam e PRELP (55% idênticos). Todos apresentam sequência consenso CX_3CXCX_9C e, no domínio rico em cisteína da extremidade N-terminal, contêm cadeias de queratam sulfato. A classe III inclui epificam (PG-Lb) e mimecam (osteoglicam), que têm sequências ricas em cisteína N-terminal próprias (CX_2CXCX_6C) e apresentam somente seis repetições ricas em leucina.

O domínio central comum, que compreende até 80% da proteína, é composto de cerca de 10 repetições (exceto para a classe III, que contém seis repetições) de uma sequência de 24 aminoácidos com resíduos de asparagina (N) e leucina (L) em posições conservadas ($LX_2LX_2LX_2NXL/I$) (IOZZO, 1998; REED & IOZZO, 2003).

TABELA 3 – CLASSES DE PROTEOGLICANOS DE BAIXO PESO MOLECULAR

CLASSES	PGs	Cromossomo-humano	Proteína (~kDa)	Glicosaminoglicanos (tipo e número)
I	Decorim	12q23	40	Dermatam sulfato/ condroitim sulfato (1)
	Biglicam	Xq28	40	Dermatam sulfato/ condroitim sulfato (2)
II	Fibromodulim Lumicam	1q32 12q21	42 38	Queratam sulfato (2-3) Queratam sulfato (3-4)
	Queratocam PRELP	1q32	38 44	Queratam sulfato (4-5) Queratam sulfato (2-3) **
	Osteoaderim		42	Queratam sulfato (2-3) **
III	Epificam (PG-Lb)	12q21	35	Dermatam sulfato/ condroitim sulfato (2-3)
	Mimecam (Osteoglicim)		35	Queratam sulfato (2-3)

*PRELP: proline/arginine rich end leucine repeat protein; ** Pontos possíveis de glicosilação com cadeias de KS*

O decorim é o proteoglicano melhor caracterizado deste grupo. Apresenta um esqueleto protéico de ~40 kDa, com estrutura globular (MORGELIN et. al., 1989), dividido em 4 domínios: domínio I, N-terminal no qual há um peptídeo sinal e pró-peptídeo; domínio II, que contém resíduos de cisteína e sítios de glicosilação, que podem conter uma cadeia de condroitim ou dermatam sulfato; domínio III caracterizado pela presença de uma região rica em leucina e o domínio IV formado por um grande *"loop"* com 2 resíduos de cisteína.

Este proteoglicano de baixo peso molecular está presente em uma grande variedade de tecidos conjuntivos, "decorando" fibrilas de colágeno. Daí o seu nome. Já foi descrito em cartilagem humana (SAMPAIO et. al., 1988), útero de rata e humano (KOKENYESI & WOESSNER, 1989; BERTO et. al., 2003), músculo esquelético (ANDRADE & BRANDAM, 1991), miométrio e leiomioma (BERTO et. al., 2003), córnea humana (SORIANO et. al., 2000), entre outros. Liga-se com fibras de colágenos tipos I, II, III, IV, VI, XII e XIV (KRESSE et. al., 1993; MORGELIN et. al., 1989; SCOTT & ORFORD, 1981; BIDANSET, et. al., 1992; HEDBOM & HEINEGARD, 1993) e outras moléculas, como fibronectina (SCHIMIDT et. al., 1987) e trombospondina (WINNERMÖLLER et. al., 1992), interferindo nos processos de interação célula-célula, com componentes do sistema complemento C1q, nos processos inflamatórios (KRUMDIECK et. al., 1992) e com fatores de crescimento EGF (IOZZO et. al., 1999) e TGF-β (HILDEBRAND et. al., 1994), tendo atividade importante na proliferação celular e no controle do ciclo celular (YAMAGUCHI et. al., 1990).

Semelhante ao decorim, o biglicam também é um proteoglicano que contém cadeias de condroitim sulfato ou dermatam sulfato (MORGELIN et. al., 1989) ligados a um esqueleto protéico globular de 40 kDa. Porém, há algumas diferenças importantes entre eles: estruturalmente, o biglicam possui dois sítios de glicosilação (característica que deu origem ao seu nome), não se liga ao colágeno e sua distribuição nos tecidos é distinta do decorim (BIANCO et. al., 1990; ROSENBERG et. al., 1985; FISHER et. al., 1983). Está presente também em cartilagem, osso, endotélio e musculatura lisa (STÖCKER et. al., 1991; ROUGHLEY et. al., 1996).

Fibromodulim, lumicam, queratocam, PRELP, osteoaderim e mimecam são proteoglicanos de queratam sulfato (BLOCHBERGER et. al., 1992; OLBERG et. al., 1989), que podem estar ou não glicosilados.

O fibromodulim, cujo esqueleto protéico de 42 kDa glicosilado por duas a três cadeias de queratam sulfato, apresenta-se associado às fibras de colágeno e regula a fibrilogênese, função que gerou seu nome (OLDBERG et. al.,1989). Liga-se em sítios diferentes do decorim no colágeno tipos I e II. Foi identificado em condrócitos de coelho (PLASS et. al., 1990) e condrócitos de cartilagem articular bovina (PLASS et. al., 1989).

Já o lumicam, inicialmente identificado em córnea bovina, caracterizado e clonado a partir de mRNA de córnea de galinha (BLOCHBERGER et. al., 1992), contém três a quatro cadeias de queratam sulfato ligados ao esqueleto protéico. O esqueleto protéico deste proteoglicano é expresso em outros tecidos, mas apenas na córnea é glicosilado com cadeias de queratam sulfato.

A córnea é uma estrutura transparente, constituída principalmente por tecido conjuntivo denso e recoberta por uma camada externa de epitélio estratificado. Fibras de colágeno tipos I e VI, e quantidades menores de colágeno tipos III e V estão presentes (MICHELACCI, 2003). A transparência da córnea é atribuída à disposição organizada dessas fibrilas de colágeno de diâmetros e distâncias interfibrilares uniformes. Várias evidências indicam que os proteoglicanos de córnea desempenham um papel importante na manutenção dessa transparência (CINTRON et. al., 1978; SORIANO et. al., 2001), pois interagem com bandas específicas das fibrilas de colágeno contribuindo para a organização. Qualquer defeito na sulfatação ou na formação das cadeias de glicosaminoglicanos presentes provoca alteração na organização destas fibrilas, levando a opacificação da córnea (GREILING, 1994).

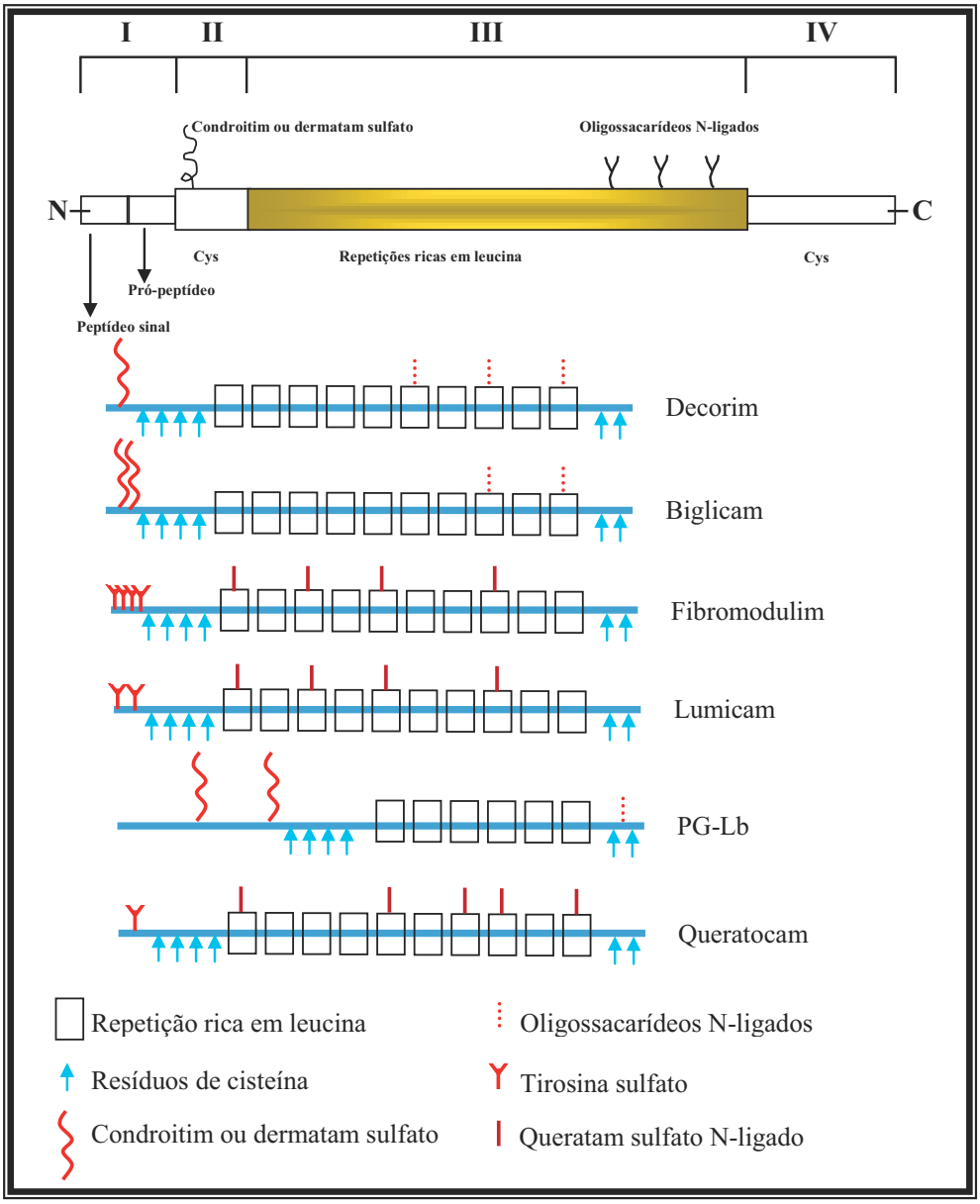


FIGURA 10: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE ALGUNS PROTEOGLICANOS DE BAIXO PESO MOLECULAR.

O queratocam também foi isolado inicialmente de córnea (FUNDERBURGH et. al., 1991). Por *Northern blotting* e imunofluorescência, foi demonstrado que este proteoglicano localiza-se preferencialmente na córnea e esclera. Porém foi

identificado em pele, ligamentos, cartilagem, artérias e músculo estriado (CORPUS et.al., 1996).

Osteoaderim e o osteoglicim foram identificados em ossos. Osteoaderim está envolvido na adesão célula-matriz e ligação de osteoblastos às integrinas α e β (WENDEL et. al., 1998). Apresenta região N-terminal rica em tirosina, na qual algumas destas unidades apresentam-se sulfatadas, característica típica desta família (SOMMARIN et. al., 1998). Já o osteoglicim, que é o menor proteoglicano do grupo dos *SLRP*s e foi isolado e caracterizado de osso bovino, parece induzir a formação dos ossos e está restrito à linhagem de células ósseas. Em humanos, este proteoglicano foi identificado com o nome de mimecam. Sua distribuição é similar à do lumicam, muito abundante em ligamentos, e ausente em músculos e miocárdio (FUNDERBURGH et. al., 1997).

Epificam ou PG-Lb, proteoglicano de condroitim sulfato/dermatam sulfato, foi isolado inicialmente de membros de galinha. Apesar de sua função realmente não ter sido esclarecida, este proteoglicano está associado com mudanças específicas da matriz extracelular durante o desenvolvimento dos membros. Foi denominado epificam por ter sido identificado nas epífises durante o desenvolvimento do esqueleto bovino (JOHNSON et. al., 1997).

2.2.2.2 PROTEOGLICANOS DE ALTO PESO MOLECULAR

A clonagem molecular permitiu a identificação de mais uma família de proteoglicanos que compartilham semelhanças estruturais e funcionais, tanto em nível genômico como protéico. Pertencem a esta família agrecam, versicam, neurocam e brevicam. Todos apresentam um domínio N-terminal que permite interação com ácido hialurônico, um domínio central que contém cadeias de glicosaminoglicanos, e um domínio C-terminal tipo lectina. Outras denominações dos proteoglicanos de alto peso molecular estão relacionadas com esses domínios: família LEC-HABP (*lectin-hyaluronic acid binding protein*) ou família “hialectam” (*hyaluronic and lectin-binding proteoglycan*) (Figura 11).

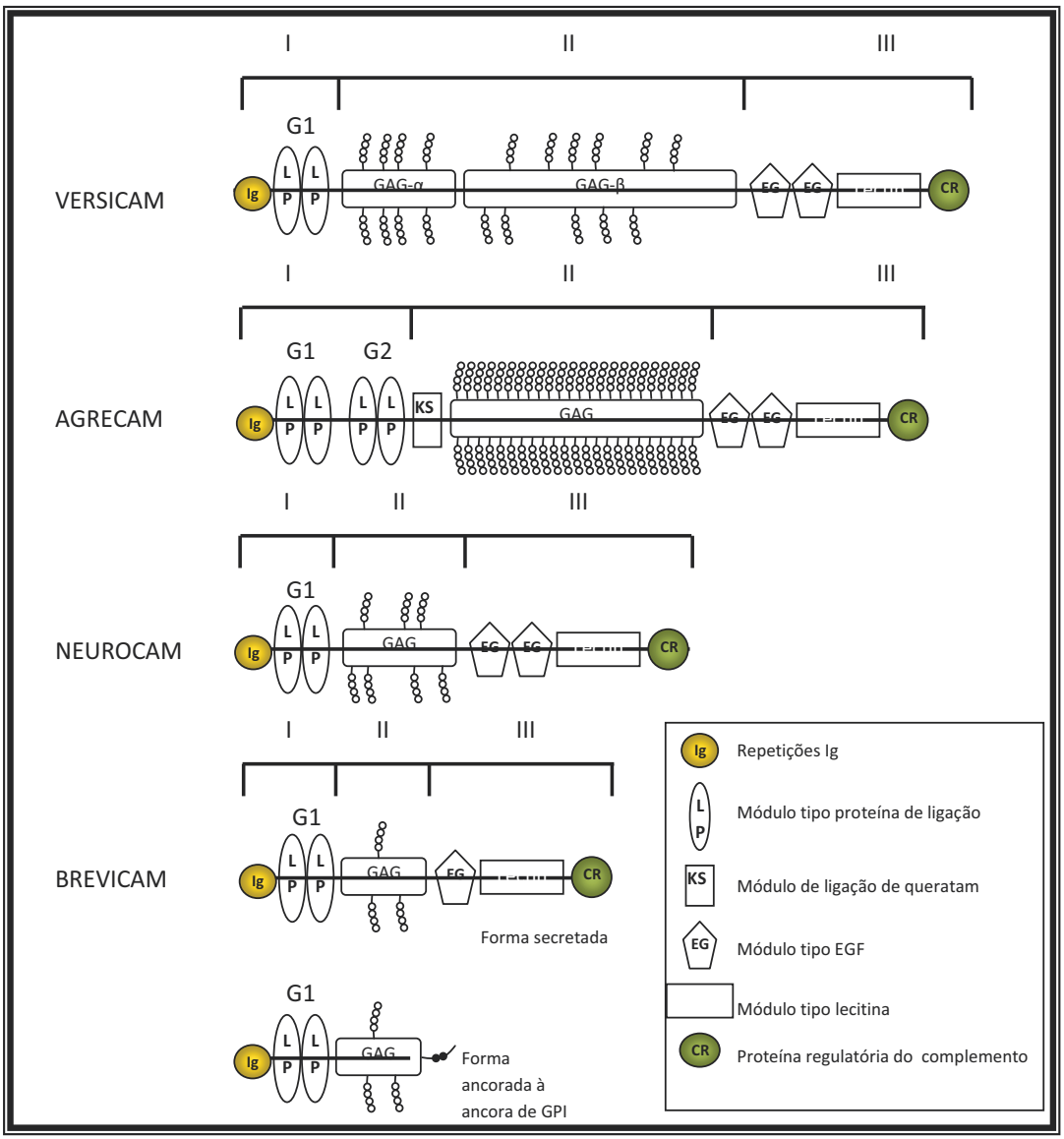


FIGURA 11: ESTRUTURA DOS PROTEOGLICANOS DE ALTO PESO MOLECULAR, HIALECTANS OU LEC-HABP.

O agrecam, proteoglicano de alto peso molecular primeiro caracterizado, é um proteoglicano que predomina na matriz extracelular da cartilagem. Apresenta esqueleto protéico de peso molecular entre 220-250 kDa, com domínios bem

definidos: dois domínios globulares – G1 e G2 – na extremidade N-terminal, um longo domínio ao qual se liga um grande número de cadeias de condroitim sulfato e queratam sulfato, e um domínio globular G3 na extremidade C-terminal. G2 é exclusivo do agrecam. Além das cadeias de glicosaminoglicanos, a proteína é glicosilada por oligossacarídeos *N*- e *O*-ligados (WIGHT et. al., 1991; HARDINGHAM et. al., 1992). Agrecam tem a capacidade de agregar-se com ácido hialurônico por ligações não-covalentes e específicas entre o domínio G1 e ácido hialurônico. Tal ligação é estabilizada por uma glicoproteína que apresenta homologia com o domínio G1, chamada proteína de ligação ou *link protein*. A formação desse complexo é muito estável, permitindo a interação de muitas moléculas de agrecam com a mesma molécula de ácido hialurônico e formando agregados enormes (FRANZEN et. al., 1981), que chegam a apresentar mais de 15 μm de comprimento e peso molecular de 1-5 $X10^6$ Da (Figura 12). Esses agregados são imobilizados na malha de colágeno tipo II da matriz da cartilagem e, devido a sua alta densidade de cargas negativas, têm a capacidade de atrair água para o tecido. Quando a cartilagem é submetida à pressão, a água se desloca, sendo atraída de volta quando a pressão diminui, causando mínima deformação e amortecendo o impacto sobre os ossos (SCOTT, 1992; WIGHT et. al., 1991). No domínio G3, há subdomínios com homologia a EGF, lectina C e elemento regulatório do sistema complemento B (BRISSETT et. al., 1998).

O agrecam desempenha papel significativo no desenvolvimento e na manutenção das cartilagens. Sabe-se que este proteoglicano corresponde a mais de 10% do peso seco de cartilagem hialina. No processo de ossificação endocondral, a cartilagem fornece o modelo para a formação do osso. O agrecam, com sua alta densidade de cargas negativas, mantém o estado hidratado e expande o volume do tecido na cartilagem.

Existe uma relação direta entre a estrutura do agrecam e a ocorrência de processos de crescimento e ossificação no tecido. Em cartilagem articular adulta humana normal, o condroitim é quase totalmente 6-sulfato (condroitim 6-sulfato), e o queratam sulfato corresponde à cerca de 25% do total de glicosaminoglicanos (MOURÃO et. al., 1979). Em contraste, em cartilagem articular de recém-nascidos, o condroitim sulfato é híbrido, formado por unidades dissacarídicas 4- e 6-sulfatadas, e a concentração de queratam sulfato é muito menor. A razão entre dissacarídeos 4- e

6-sulfatados é tanto maior quanto mais próximo da zona de crescimento ósseo nas cartilagens jovens (MICHELACCI et. al., 1979, 1981). Essas características estruturais voltam a aparecer em doenças onde ocorrem processos de crescimento e ossificação na cartilagem: osteoartrite, condroma e condrossarcoma (MICHELACCI et. al., 1979; 1981; MOURÃO et. al., 1979).

Durante o processo de calcificação, cálcio liga-se as cadeias de condroitim sulfato no agrecam (POOLE et. al., 1989).

Em tendões, este proteoglicano é expresso em quantidades relativamente altas nas regiões sujeitas à compressão e nas regiões que geram tensão (VOGEL et. al., 1994). Enquanto o agrecam isolado da região de compressão é similar ao da cartilagem que contém condroitim e queratam sulfato, o da região de tensão não apresenta cadeias de queratam sulfato (VOGEL et. al., 1996). Foi ainda identificado em notocorda, interagindo com colágenos II e IX e no cérebro em desenvolvimento, sendo sintetizados por neurônios (SCHWARTZ et. al., 1996).

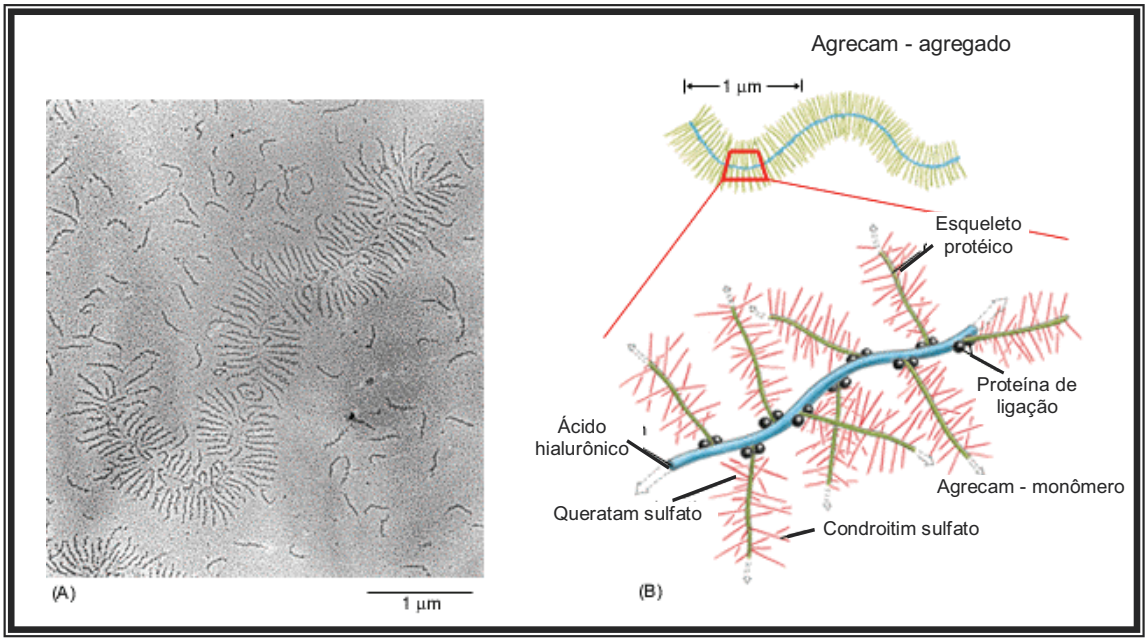


FIGURA 12: MOLÉCULAS DE AGRECAM E DE PROTEÍNA DE LIGAÇÃO FORMANDO AGREGADOS COM ÁCIDO HIALURÔNICO. © 1994 by Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and James D. Watson. Molecular Biology of the Cell. Figura18-38, disponível no *site* http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books.

O versicam, outro importante membro da família dos hialectans, é um proteoglicano grande de condroitim sulfato que apresenta os mesmos domínios do agrecam, exceto G2, também tem a propriedade de interagir com ácido hialurônico, porém possui um número menor de cadeias de condroitim sulfato ligadas ao esqueleto protéico (Figura 11). Foi isolado de fibroblastos humanos, contendo 12-15 cadeias de condroitim sulfato (ZIMMERMAN & ROUSLAHTI, 1989), podendo ser encontrado também em outras células e tecidos como vasos sanguíneos e células de músculo liso arterial (BODE-LESNIEWSKA et. al., 1996). Está presente em menores quantidades em cartilagem fibrosa e elástica, em tendões de músculo esquelético, derme e camada basal da epiderme, no sistema nervoso periférico e central e ainda na superfície luminal de glândulas epiteliais (BODE-LESNIEWSKA et. al., 1996; ZIMMERMANN et. al., 1994).

Versicam está envolvido nas interações célula-célula e célula-matriz, bem como processos de adesão, migração e proliferação celular (YAMAGATA et. al., 1989; YANG et. al., 1999). Também está envolvido no desenvolvimento de doenças como aterosclerose (GUTIERREZ et. al., 1997; WIGHT, 1997) e tumores malignos, nos quais há significante aumento de proteoglicanos de condroitim sulfato, bem como em tumores benignos (IOZZO, 1988; NARA et. al., 1997).

Versicam foi identificado pela primeira vez em cultura de fibroblastos (ZIMMERMAN & ROUSLAHTI, 1989). Um proteoglicano homólogo, chamado PG-M foi isolado de brotos dos membros de embrião de galinha (SHINOMURA et. al., 1993). “Splicing” alternativo de versicam gera pelo menos quatro isoformas V0, V1, V2 e V3 (ITO et. al., 1995), sendo que V3 não é glicosilado com cadeias de condroitim sulfato.

Versicam é um importante mediador da transição mesênquima-epitélio (SHENG et. al., 2006).

Os dois últimos membros dessa família são neurocam e brevicam, ambos isolados de cérebro (Figura 11). Neurocam, proteoglicano de condroitim sulfato que apresenta esqueleto protéico de 136 kDa, apresenta os mesmos domínios com homologia para EGF, lectina, capacidade para interagir com ácido hialurônico como o agrecam e versicam e também com outras moléculas de adesão como N-CAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*) e NG-CAM (*Neuron Glial Cell Adhesion Molecule*) de forma específica e com alta afinidade. Esse proteoglicano parece ter um papel

regulatório sobre a adesão neuronal e o crescimento de neuritos durante o desenvolvimento (FRIEDLANDER et. al., 1994), uma vez que a associação ao NG-CAM é capaz de inibir a adesão neuronal e a extensão de neuritos. Estudos mais recentes mostraram sua presença durante o desenvolvimento da retina (INATANI et. al., 1999). O brevicam foi isolado de cérebro bovino e também é um proteoglicano de condroitim sulfato. A região central de ligação de glicosaminoglicanos é menor que nos outros proteoglicanos desse grupo e, por isso, recebeu esse nome. Também tem sítios homólogos para EGF, lectina tipo C como todos os outros deste grupo. Esse proteoglicano também ocorre numa forma ligada à membrana por uma âncora de GPI (SEIDENBECHER et. al., 1995).

2.2.2.3 OUTROS PROTEOGLICANOS DE MATRIZ INTERSTICIAL

Há ainda alguns proteoglicanos de matriz intersticial que não se enquadram em nenhum dos grupos apresentados acima. O apicam e a cadeia α_2 do colágeno tipo IX são exemplos.

O apicam é um proteoglicano de condroitim sulfato que se encontra nos depósitos amilóides do cérebro de pacientes com a doença de Alzheimer. É produzido em grande quantidade por astrócitos (SHIOI et. al., 1992).

A cadeia α_2 do colágeno tipo IX é um proteoglicano facultativo. Há evidências experimentais indicando que esse composto desempenha um papel importante na estabilização das fibras de colágeno tipo II e na manutenção da viscosidade do humor vítreo, devido novamente a sua propriedade de interagir com as fibrilas de colágeno tipo II (McCORMICK et. al., 1987).

3 BIOSSÍNTESE E DEGRADAÇÃO DE PROTEOGLICANOS

Todos os proteoglicanos são sintetizados na via secretória das células. Os mRNAs que codificam os esqueletos protéicos são traduzidos no retículo

endoplasmático rugoso e glicosilados no próprio retículo e no Complexo de Golgi. São levados aos seus destinos por transporte vesicular.

Já o ácido hialurônico é sintetizado pelas ácido hialurônico sintetases (HAS), localizadas na membrana plasmática. O polímero, que não é sintetizado sobre o esqueleto proteico, é concomitante secretado para a matriz extracelular.

A degradação desses compostos é principalmente lisossomal. Inicia-se pela ação de proteases e endoglicosidases, seguida da ação sequencial de glicosidases e sulfatases. Os aminoácidos, monossacarídeos e sulfato são reaproveitados pelas células.

Em alguns casos, a degradação inicia-se pela ação de metaloproteases neutras, que agem na superfície articular e na matriz extracelular, liberando fragmentos parcialmente degradados, que são internalizados e completamente digeridos nos lisossomos ou perdidos e eliminados na urina. Estima-se que apenas cerca de 10% dos proteoglicanos metabolizados por dia sejam eliminados na urina.

A urina humana normal contém glicosaminoglicanos (10-20mg/l), sendo os principais condroitim sulfato (~70%), dermatam sulfato (~10%) e heparam sulfato (~20%). Estas concentrações estão alteradas em muitas doenças (MICHELACCI et. al., 1989; CADAVAL et. al., 2000; PEREIRA et. al., 2004; LIMA et. al., 2005).

4 NEOPLASIAS

O termo neoplasia, de origem grega “neo = novo” e “plasis = crescimento”, pode ser conceituada como uma proliferação celular anormal, descontrolada e autônoma, no qual as células reduzem ou perdem a capacidade de se diferenciar, em consequência de alterações nos genes que regulam o crescimento e diferenciação celular (FILHO et. al., 2004).

As células neoplásicas que permanecem agrupadas em uma massa única formam um “tumor benigno”. Já aquelas capazes de invadir tecidos vizinhos, penetrar e sobreviver na corrente sanguínea ou linfática constituem “tumor maligno” ou “câncer”.

As células tumorais se originam de células normais que sofrem mutações, espontânea ou induzida pela ação de um ou mais agentes cancerígenos, os quais

provocam alterações no DNA. Ao receberem a agressão de um agente tumorigênico, células que estão percorrendo o ciclo celular ou que são capazes de nele entrar dão origem a clones de células transformadas, que adquirem a capacidade de realizar divisões celulares indefinidamente. Essas alterações genéticas podem ser induzidas pela ação de determinados agentes ambientais, como substâncias químicas, radiação ou vírus, ou herdada de linhagem germinativa, que geram modificações importantes na expressão de certos genes, especialmente os que regulam a proliferação e a diferenciação celular (COTRAN et. al., 2000).

Constituem os principais alvos das lesões genéticas quatro classes de genes reguladores normais: (1) proto-oncogenes promotores da proliferação celular, os quais estimulam a multiplicação e diferenciação celular a partir dos produtos expressos, como fatores de crescimento, seus receptores, moléculas transdutoras de sinais, fatores de transcrição e moléculas envolvidas diretamente no ciclo celular, como exemplo as ciclinas; (2) genes supressores da proliferação celular, que controlam a proliferação dentro dos limites fisiológicos para cada tecido; (3) genes que regulam a morte celular programada ou apoptose, evento fundamental na limitação de populações celulares e (4) genes que regulam o reparo do DNA danificado.

O conjunto de mudanças decorrentes das mutações dá origem a clones imortalizados, os quais continuam sofrendo alterações e tornam-se capazes de sobreviver, invadir tecidos vizinhos e até implantar-se à distância. O tipo de neoplasia – benigna ou maligna – depende dos genes afetados por mutações (Figura 13).

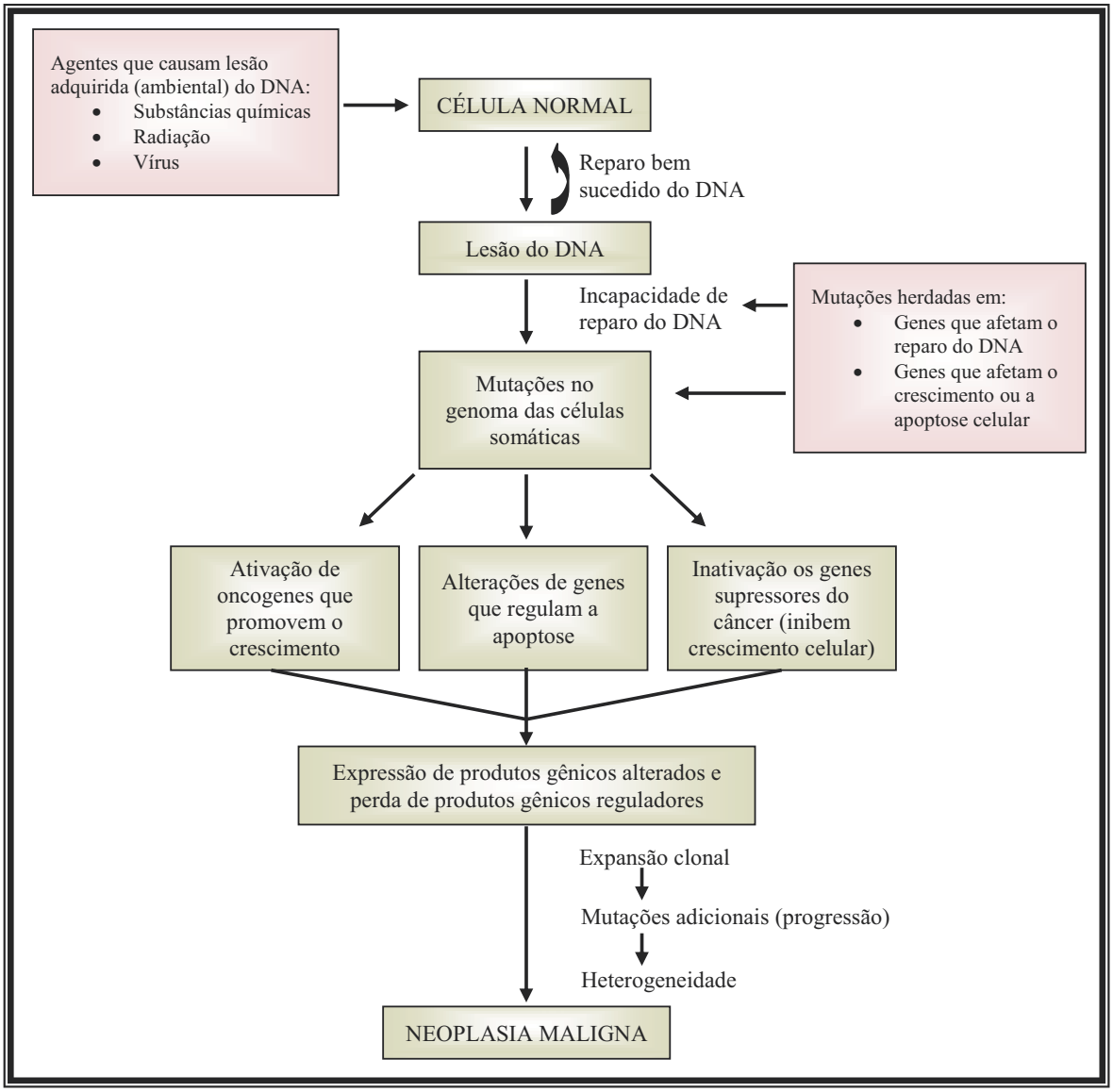


FIGURA 13: FLUXOGRAMA MOSTRANDO UM ESQUEMA SIMPLIFICADO DA BASE MOLECULAR DO CÂNCER. (6°ed – 2000 – Esquema baseado em Patologia Estrutural e funcional – COTRAN, página 249).

Todos os tumores, benignos ou malignos, apresentam dois componentes básicos: parênquima (constituído por células neoplásicas proliferativas) e estroma (formado de tecido conjuntivo e vasos sanguíneos). Apesar das células parenquimatosas representarem o componente proliferante das neoplasias, o crescimento e a evolução destas depende muito do seu estroma, pois além de um suprimento sanguíneo adequado, o tecido conjuntivo fornece o arcabouço para o parênquima (COTRAN et. al., 2000).

Em geral, os tumores benignos são designados pelo sufixo “oma” adicionado ao nome da célula de origem. Geralmente, os tumores originados de células mesenquimatosas seguem essa regra. Exemplos são o fibroma (tumor benigno derivado de fibroblastos), condroma (tumor derivado de cartilagem) e osteoma (tumor derivado de osteoblastos). Porém, a nomenclatura de tumores benignos que se desenvolvem a partir de células epiteliais é mais complexa. Outros parâmetros também são usados como referência, como por exemplo, a arquitetura macroscópica. Os mais comuns são **adenoma**, caracterizado por formar padrões glandulares ou ser derivado de tecido glandular (por exemplo, adenoma tubular renal); **papiloma**, caracterizado por produzir projeções digitiformes ou verrugosas como papiloma de cólon; **cistadenoma**, assim denominado por formar grande massa cística, como cistadenoma nos ovários; **pólipo**, por apresentar inúmeras projeções macroscópicas acima de uma superfície mucosa, como pólipo colônico.

Para tumores malignos, a nomenclatura segue essencialmente o mesmo padrão usado para tumores benignos com alguns acréscimos. Aqueles derivados de células de origem mesenquimal são denominados **sarcomas** (*grego sar = carnoso*). Ocorre em tecidos como ósseo (osteossarcoma), cartilaginoso (condrossarcoma), fibroso (fibrossarcoma), adiposo (lipossarcoma), entre outros. Tumores malignos derivados de tecido epitelial de qualquer uma das camadas germinativas (ectoderme, mesoderme e endoderme) são denominados **carcinomas**. É comum especificar o órgão de origem. Entretanto, os carcinomas podem ser ainda mais qualificados de acordo com os padrões de desenvolvimento. Em tecido epitelial glandular é comum ocorrer à formação de **adenocarcinoma**. Há ainda outros dois tipos de tumores malignos, cuja nomenclatura não segue as regras acima: **leucemias** e **linfomas**. O termo “leucemia” é utilizado para descrever neoplasias linfóides que apresentam comprometimento da medula óssea, geralmente acompanhada de um grande número de células tumorais no sangue periférico, e o termo “linfoma” é utilizado para descrever proliferações que surgem na forma de massas teciduais distintas, a partir de células do sistema imune.

Há ainda tumores que apresentam mais de um tipo celular – tumores **mistos** e **teratomas**. Nos tumores mistos, as células se originam de um único folheto germinativo (exemplo, fibroadenoma), enquanto nos teratomas as células são derivadas de mais de uma camada germinativa (geralmente das três) e formam-se a

partir de células totipotentes ou pluripotentes. São encontradas principalmente nas gônadas (exemplo, teratoma cístico do ovário).

Na grande maioria dos casos, a diferenciação entre tumores benignos e malignos pode ser realizada em nível morfológico. Entretanto, em alguns casos este diagnóstico é subjetivo, já que certos aspectos morfológicos do tumor não condizem com seu comportamento biológico: um aspecto inofensivo pode mascarar uma natureza agressiva. Assim, atualmente outros parâmetros são usados para melhor caracterizar estas diferenças: (1) diferenciação e anaplasia, (2) velocidade de crescimento; (3) invasão local e (4) metástases. A Tabela 4 mostra de forma sucinta as principais características que diferenciam estas neoplasias.

TABELA 4 – COMPARAÇÕES ENTRE TUMORES BENIGNOS E MALIGNOS

CARACTERÍSTICAS	BENIGNO	MALIGNO
Diferenciação /anaplasia[1]	Bem diferenciado; a estrutura pode ser típica do tecido de origem	Alguma falta de diferenciação com anaplasia, a estrutura é freqüentemente atípica
Velocidade de crescimento	Geralmente progressiva e lenta; pode estabilizar-se ou regredir; as figuras mitóticas são raras e normais	Errática, podendo ser lenta a rápida; as figuras mitóticas podem ser numerosas e anormais
Invasão local	Massas bem demarcadas, geralmente coesivas e em expansão, que não invadem nem infiltram os tecido normais circundantes	Localmente invasivo, infiltrando os tecidos vizinhos normais; algumas vezes podem ser aparentemente coesivos e expansivos
Metástases	Ausentes	Frequentemente presentes; quanto maior e mais indiferenciado o tumor primário, maior a probabilidade de metástases

[1]Diferenciação refere-se ao grau de semelhança entre as células parenquimatosas e células normais compatíveis, tanto em nível morfológico quanto funcional. Anaplasia caracteriza-se por diversas alterações morfológicas e funcionais. *(6°ed. 2000 – Patologia Estrutural e Funcional, Robbins – Quadro 8.2 – página 243).*

As células das neoplasias benignas em geral são bem diferenciadas e podem até ser indistinguíveis das células normais correspondentes. O tumor reproduz bem o tecido que lhe deu origem. Em contrapartida, as neoplasias malignas variam desde células bem diferenciadas até células indiferenciadas (anaplásicas). Tanto as células quanto os núcleos apresentam polimorfismo – alterações no tamanho e na forma. As alterações fisiológicas das células são proporcionais às mudanças estruturais.

Em geral, a velocidade de crescimento dos tumores está correlacionada com seu nível de diferenciação. Tumores benignos, em sua maioria, crescem lentamente no decorrer de um período de anos, enquanto a maioria dos tumores malignos cresce rapidamente, disseminando-se e levando à morte (embora existam exceções). Além disso, a taxa de crescimento de ambos pode não ser constante ao longo do tempo. Certos fatores como dependência hormonal e suficiência de suprimento sanguíneo, podem afetar o seu crescimento.

Como já mencionamos, quase todos os tumores benignos crescem como massas coesivas, que permanecem localizadas em seu local de origem. As células crescem unidas entre si, formando uma massa esférica, frequentemente envolta por uma cápsula fibrosa, constituída de tecido conjuntivo derivado do estroma do próprio tumor. Este encapsulamento tende a conter a neoplasia benigna como um corpo isolado, facilmente palpável e móvel, passível de enucleação cirúrgica. Já o crescimento dos tumores malignos é acompanhado de infiltração progressiva, invasão e destruição do tecido circundante. A natureza invasiva dificulta sua ressecção cirúrgica e, mesmo quando parece ser bem circunscrito, é necessário remover considerável margem de tecidos aparentemente normais ao redor da neoplasia infiltrativa. Na grande maioria das neoplasias malignas ocorrem metástases. A capacidade de sua penetração nos vasos sanguíneos, linfáticos e cavidades corporais, proporcionam-lhe a disseminação e implantação em locais distintos do tumor primário.

Nos últimos anos, houve extraordinário avanço dos conhecimentos sobre a etiologia e a patogênese das neoplasias. A melhor compreensão dos mecanismos de desenvolvimento, alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas dos tumores possibilitou o desenvolvimento de novos tratamentos no que diz respeito ao controle da evolução dos diferentes tipos e, até, cura. Enorme volume de trabalhos publicados tem como foco o câncer, já que esta doença é responsável por grande número de mortes a cada ano. Entretanto, apesar de muitas vezes não representarem grande problema para os seus portadores, os tumores benignos têm grande interesse prático por sua frequência e pelas consequências que podem gerar. Com efeito, seja por seu volume, seja por sua localização ou outras propriedades, tumores benignos podem causar vários transtornos para o paciente

como obstrução de órgãos ou estruturas ocas, compressão de órgãos, produção de substâncias em maior ou menor quantidade, podendo levar até mesmo à morte.

4.1 FIBROADENOMA

O fibroadenoma, tumor benigno mais comum da mama feminina, é uma neoplasia mista constituída por tecido estromal e glandular. A importância do seu estudo deve-se à sua grande incidência, principalmente em mulheres jovens. Corresponde a 50% das biópsias de mama e este número aumenta para 75% em biópsias de mulheres com menos de 20 anos (SCHVERCH et. al., 1982). Estudos realizados em autópsias mostraram incidência de 9% deste tumor (FRANTZ et. al., 1951). O fibroadenoma é a segunda neoplasia mais frequente da glândula mamária, precedida só pelo carcinoma (NAZÁRIO et. al., 2007). Alguns estudos indicam o fibroadenoma como fator de risco para o desenvolvimento de carcinoma mamário, principalmente o fibroadenoma complexo, conceituado como aquele que possui alterações císticas, papilares, adenose esclerosante ou calcificações epiteliais no seu interior (PICK et. al., 1984; DUPONT et. al., 1994).

A faixa etária mais frequentemente afetada compreende dos 20 aos 30 anos, embora também esteja presente em outras idades (COLE et. al., 1991; HUNTER et. al. 1996; KUIJPER et. al., 2001). Cerca de 25% dos casos são assintomáticos (ALLE et. al., 1996).

O fibroadenoma desenvolve-se como nódulo único, esférico, de consistência fibro-elástica, móvel e não-aderido ao tecido mamário adjacente. Macroscopicamente são encapsulados e claramente delimitados do tecido mamário circundante (Figura 14). Geralmente são detectados no quadrante súpero-lateral da mama feminina, com tamanhos que variam desde 1 cm até formas gigantes de 10 a 15 cm (fibroadenoma gigante), sendo mais comuns os tumores com 2-3 cm. Em 10 a 15% dos casos ocorre bilateralidade e, em 13 a 16% dos casos, ocorrem lesões múltiplas (GREENBERG et. al., 1998; HAAGASEN, 1986; ROSEN, 2001).

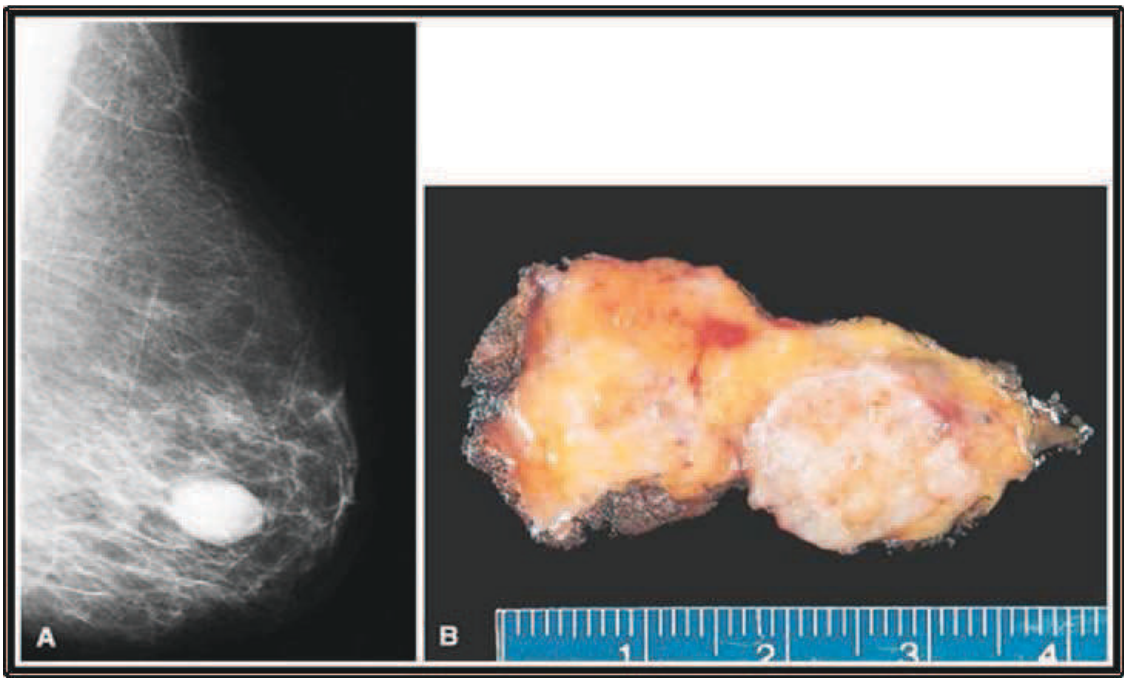


FIGURA 14: FIBROADENOMA. (A) Densidade bem circunscrita na mamografia, que corresponde mais comumente a fibroadenoma. (B) A massa branca bem circunscrita está claramente demarcada, difereciando-se do tecido adiposo amarelado circundante. *(6°ed. 2000 – Pathology Basis of disease, Robbins and Contran – página 1214).*

O tamanho do tumor varia ao longo do tempo (GREENBERG et. al., 1998). Eles podem crescer, regredir ou permanecer inalterados, conforme o ambiente hormonal. A presença de receptores de hormônios esteróides nos tecidos que compõe o fibroadenoma reforça sua dependência hormonal (SAPINO et. al., 2006). Sabe-se que tanto na mama normal como em neoplasias benignas e malignas os hormônios esteróides estrógeno e progesterona têm importantes funções. Estes hormônios são sintetizados em períodos cíclicos durante a fase reprodutora feminina. Regulam o desenvolvimento das glândulas mamárias na puberdade e na gravidez, e estão associados com a iniciação, o desenvolvimento e a progressão de câncer de mama (HANSEN & BISSELL, 2000).

4.2 CICLO MENSTRUAL E HORMÔNIOS ESTERÓIDES FEMININOS

Como citado anteriormente, o período reprodutivo das mulheres (aproximadamente entre 13 e 46 anos de idade) é caracterizado por alterações rítmicas das taxas de secreção dos hormônios femininos e por alterações correspondentes nos ovários e órgãos sexuais, denominado **ciclo menstrual**.

No início da puberdade feminina, a secreção de GnRH (*Gonadotropin-Releasing Hormone*), controlada por centros cerebrais, aumenta significativamente. Durante a vida adulta, este hormônio liberador hipotalâmico estimula a liberação dos hormônios gonadotrópicos FSH (*Follicle Stimulanting Hormone*) e LH (*Luteinizing Hormone*), produzidos na hipófise anterior. Estes, por sua vez, estimulam a produção de hormônios esteróides – estrogênios e progesterona – principalmente pelos ovários. O controle da secreção de hormônios gonadotrópicos e ovarianos é apresentado, em uma visão geral, na Figura 15. O FSH, uma vez liberado, estimula a síntese e a secreção de 17-β-estradiol nos ovários. Este, por sua vez, exerce controle por retroalimentação negativa (*feedback negativo*) sobre a hipófise anterior, inibindo a secreção de FSH, e sobre o hipotálamo, inibindo a secreção de GnRH durante a fase proliferativa. Numa segunda etapa, o próprio 17-β-estradiol passa a exercer controle positivo sobre a hipófise anterior, estimulando a liberação de altas concentrações de LH e também de FSH. O pico de LH é essencial para a ovulação. Após a ovulação, um corpo lúteo funcional substitui o folículo rompido, que passa a sintetizar progesterona e uma pequena quantidade de estradiol. A progesterona, entretanto, inibe a síntese e a liberação de LH. Ocorre a queda de LH e, em sua decorrência, a involução do corpo lúteo. Por fim, as concentrações plasmáticas de 17-β-estradiol e progesterona caem significativamente, resultando na menstruação e iniciando um novo ciclo.

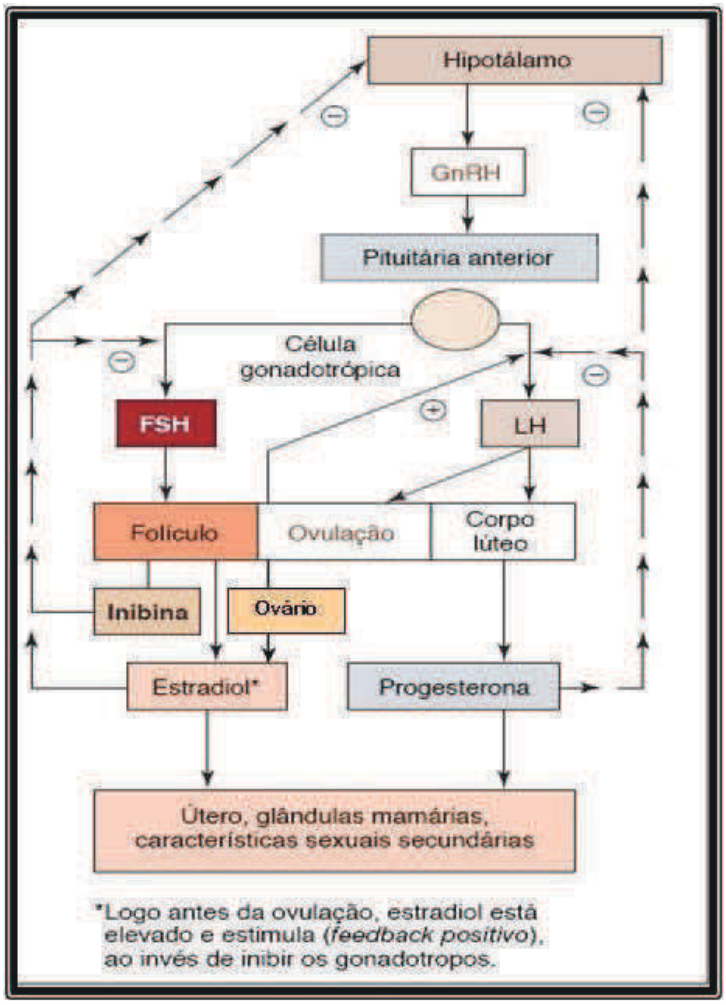


FIGURA 15: FORMAÇÃO DE 17-β-ESTRADIOL E PROGESTERONA. (Figura baseada em DEVLIN et. al., 2007 – 6° ed. americana traduzida – Manual de bioquímica com correlações clínicas, página 911, figura 23-45).

Em decorrência de processos altamente ordenados, todos os hormônios apresentam diferentes concentrações ao longo deste período, o qual está dividido em duas fases – fase folicular (ou proliferativa) e fase lútea (ou secretória). A duração média do ciclo completo é de 28 dias, embora sejam relatadas variações de 20 a 45 dias. A Figura 16 mostra as diferentes concentrações hormonais durante o ciclo menstrual. A concentração de estrogênios é maior na fase proliferativa do que na fase lútea, porque estão intimamente relacionados com o desenvolvimento e a maturação dos folículos ovarianos. Já as concentrações de progesterona são muito

superiores na fase lútea do que na fase proliferativa. De fato, este hormônio tem como função promover alterações secretoras no endométrio uterino, preparando-o para a implantação de um óvulo fertilizado.

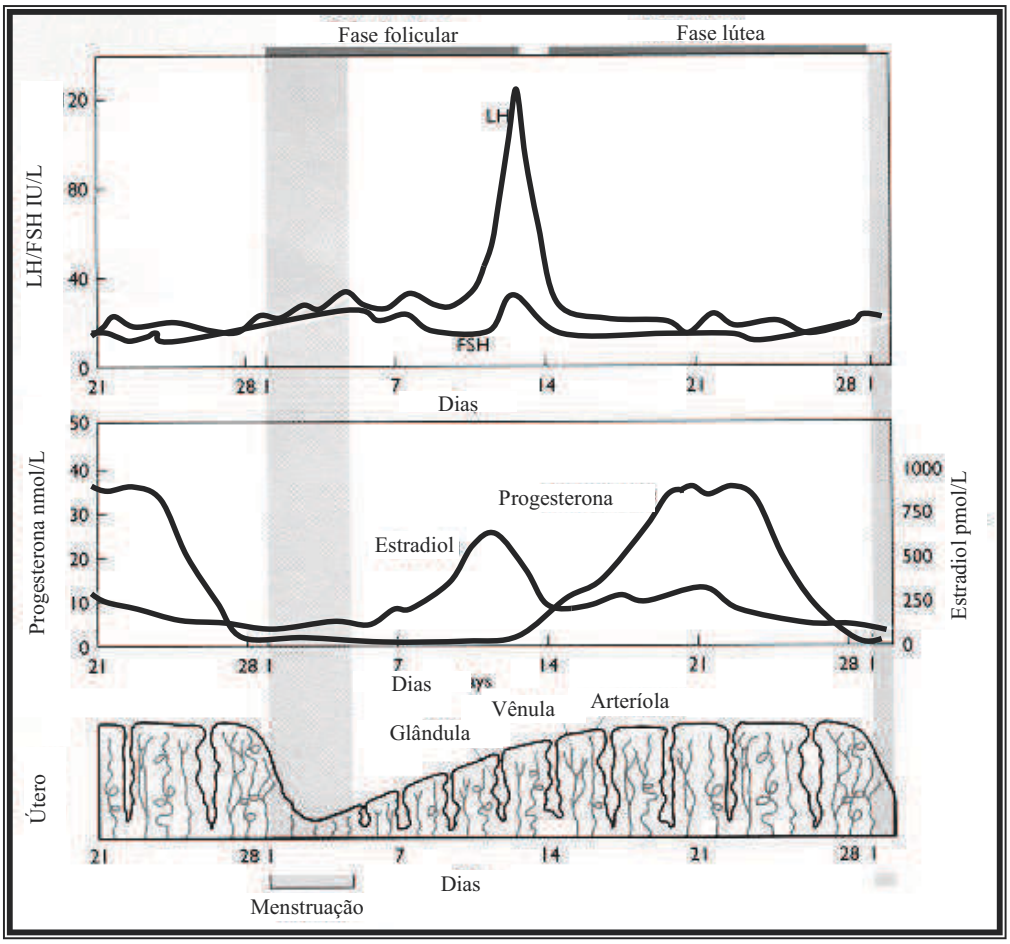


FIGURA 16: CICLO MENSTRUAL HUMANO. O gráfico apresenta a concentração sérica média dos hormônios durante um ciclo menstrual típico de 28 dias no endométrio uterino. (Obtido do livro Endocrinology: An Integrated Approach by site: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=endocrin&part=A972&rendertype=box&id=A1224).

Há três tipos principais de estrogênios em quantidades significativas no plasma feminino humano: 17-β-estradiol, estrona e estriol. O 17-β-estradiol é o principal e mais potente deles. Todos têm como função principal promover a proliferação celular e, assim, o desenvolvimento de órgãos sexuais e de tecidos

relacionados à reprodução. Atuam por meio de dois tipos clássicos de receptores: ER-α e ER-β (*Estrogen-Receptors)*, expressos nos diferentes tecidos e em diferentes quantidades, de acordo com as oscilações hormonais durante o ciclo menstrual (GREENE et. al., 1986; KUIPER et. al., 1996; RICKETTS et. al., 1991). Já a progesterona é o principal hormônio do grupo das progestinas. Está relacionada com o controle da proliferação e adesão celulares e da apoptose (DESREUX et. al., 2001; WIEBE et. al., 2006). Essas atividades são desencadeadas pela ligação com receptores PR-α e PR-β (*Progesteron-Receptors*), cuja expressão varia de acordo com o tipo celular (TUNG et. al., 1993; VEGETO et. al., 1993). A Figura 17 mostra a estrutura química desses hormônios principais.

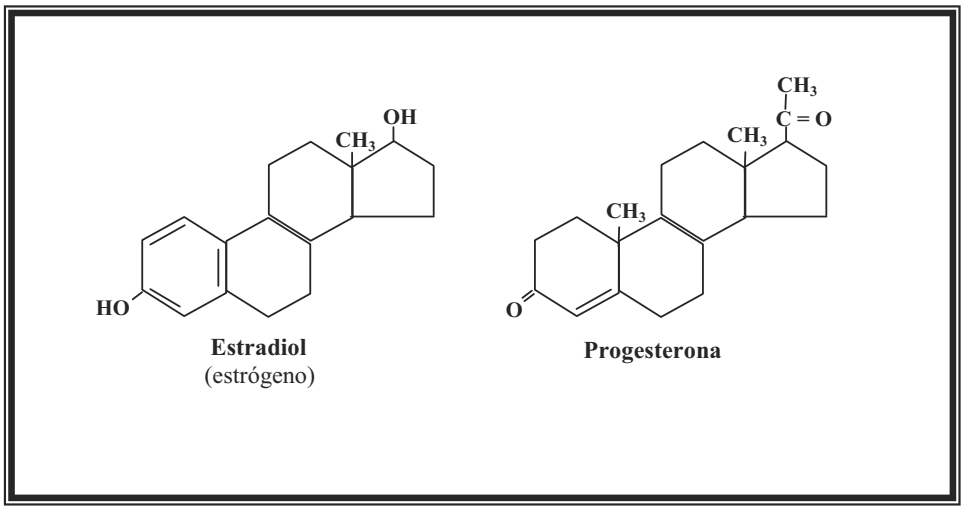


FIGURA 17: ESTRUTURA DE ALGUNS HORMÔNIOS ESTERÓIDES. Hormônios sexuais: β-estradiol, principal estrogênio e progesterona (6°ed. 2007 – Manual de bioquímica com correlações clínicas - DEVLIN, et. al.; página 903).

A partir das funções descritas acima, atribui-se aos hormônios esteróides papel imprescindível tanto no desenvolvimento quanto na fisiologia de vários tecidos, incluindo, mamas, esqueleto e cérebro (JAMNONGJIT & HAMMES, 2006).

4.3 EFEITO DOS HORMÔNIOS SOBRE TECIDO MAMÁRIO NORMAL, FIBROADENOMA E CÂNCER DE MAMA

Estrogênios e progesterona iniciam suas funções ligando-se com seus receptores, ERs e PRs, que são membros da superfamília de receptores intracelulares de hormônios (Figura 18). Estes contêm três principais domínios funcionais: (1) domínio de ligação ao hormônio esteróide localizado na região C-terminal conhecido com LBD (*Ligand-Binding Domain*), (2) domínio de ligação ao DNA – DBD (*DNA-Binding Domain*) e (3) domínio N-terminal, muito variável, que modula a ativação da transcrição. O domínio (1) também pode funcionar como um domínio repressor na ausência do ligante. A ligação de um dímero de proteínas repressoras (hsp 90) mantém o domínio de ligação ao hormônio na conformação ótima para o esteróide e impede sua entrada no núcleo (recobre o sinal de direcionamento nuclear). O domínio de ligação ao DNA (2) pertence à família das proteínas dedos de zinco que reconhecem HREs (*Hormone Receptors Elements*) específicos e funcionam como dímeros. A Tabela 5 mostra as principais sequências de HREs para receptores de estrógeno e progesterona.

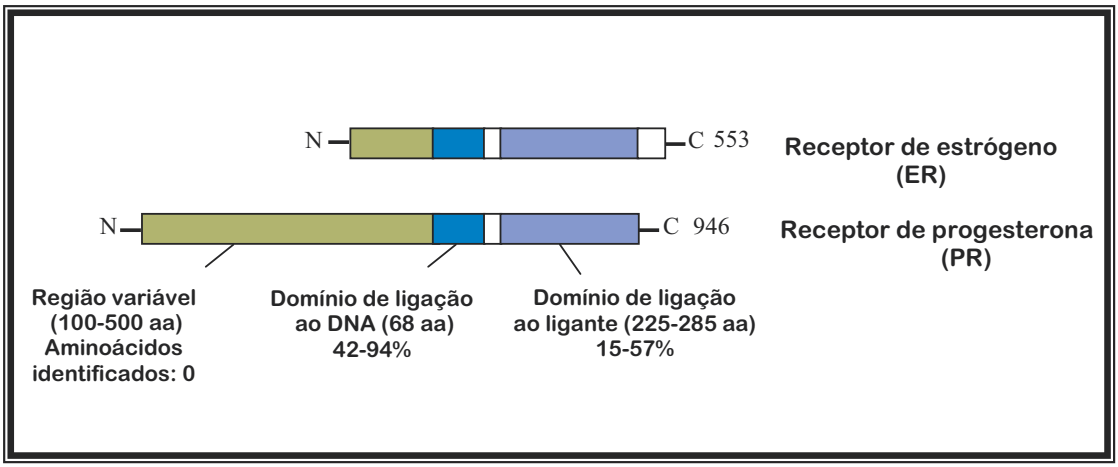


FIGURA 18: ESQUEMA GERAL DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO NA SUPERFAMÍLIA DE RECEPTORES NUCLEARES. O domínio central de ligação ao DNA exibe considerável homologia das sequências entre diferentes receptores e contém duas cópias de motivo dedo de zinco. O domínio C-terminal de ligação ao hormônio exibe menor homologia. A região N-terminal em diferentes receptores varia em comprimento, tem sequências exclusivas e, podem conter um ou mais domínios de ativação. *See R. M. Evans, 1988, Science 240:889*. (*5th ed – 2003 - Freeman and Company – Molecular Cell Biology; Lodish, H.; figure origin – Figure 11.41*).

O processo pelo qual eles interagem com seus receptores é similar ao de todos os membros da família de receptores intracelulares de hormônios (Figura 19). Na ausência do hormônio, os receptores formam complexos inativos com proteínas inibidoras específicas (família hsp 90). Quando os hormônios passam pela membrana celular e ligam-se a seus receptores, o complexo oligomérico inativo dissocia-se, expondo o sinal de direcionamento nuclear do receptor. O complexo receptor-hormônio é reconhecido pela importina e transportado para o núcleo, através dos poros nucleares. No núcleo, o receptor liga-se aos HREs (elementos de resposta ao hormônio) para controlar a expressão gênica, quer diretamente, como fator de transcrição (BEATO & SANCHEZ-PACHECO, 1996, GLASS et. al., 1996), ou indiretamente, por ligação com outros fatores de transcrição (GAUB et. al., 1990, PHILIPS et. al. 1993).

TABELA 5 – SEQUÊNCIAS CONSENSO DO DNA DE HREs (ELEMENTOS DE RESPOSTA AOS HORMÔNIOS)

HREs (Elementos de resposta ao hormônio)	Sequências consenso no DNA
ERE (Elemento de resposta ao estrógeno)	5 A G G T C A $(N)_3$ T G A C C T 3’ 3’ T C C A G T $(N)_3$ A C T G G A 5’
PRE (Elemento de resposta a progesterona)	5 A G A A C A $(N)_3$ T C T T G T 3’ 3’ T C T T G T $(N)_3$ A G A A C A 5’

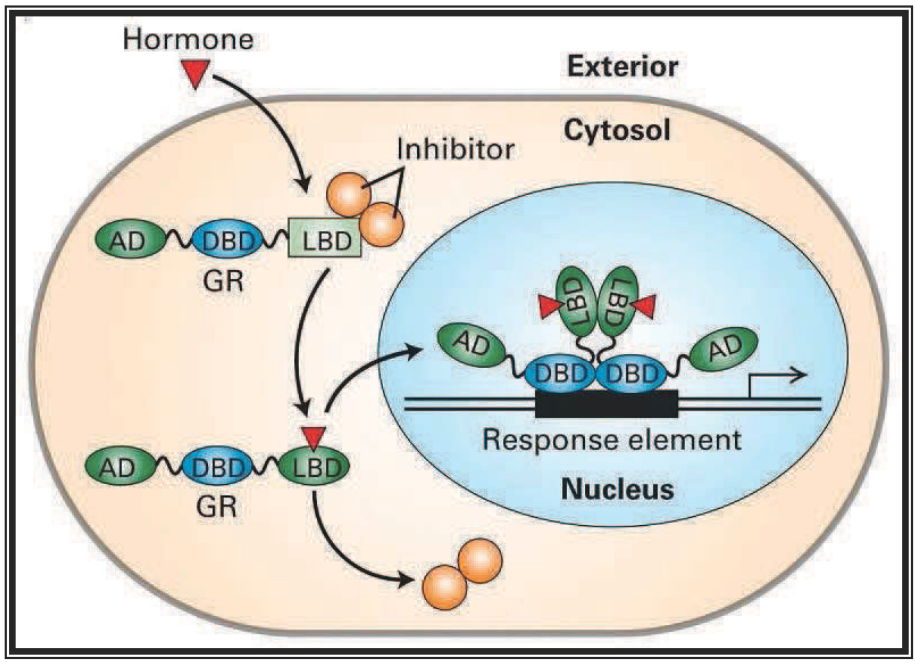


FIGURA 19: MODELO DE ATIVAÇÃO GÊNICA HORMÔNIO-DEPENDENTE PELA HOMODIMERIZAÇÃO DE RECEPTOR NUCLEAR. Na ausência do hormônio, o receptor é mantido no citoplasma pela interação entre o LBD (*Ligand-Binding Domain*) e proteínas inibitórias. Quando há hormônio, este difunde pela membrana plasmática e se liga ao LBD, causando uma mudança na conformação que libera o receptor das proteínas inibitórias. O receptor com ligante ligado, em seguida, é translocado para o núcleo, onde o domínio DBD (*DNA-Binding Domain*) liga-se aos elementos de resposta, permitindo que este domínio ligação-ligante e seu domínio adicional da região N-terminal estimulem a transcrição dos genes alvo. (*5th ed – 2003 - Freeman and Company – Molecular Cell Biology; Lodish, H.; Figure 11.44*).

Entretanto, a expressão de ERs e PRs varia muito nos diferentes tecidos. No caso das glândulas mamárias essa distribuição tem grande importância nas relações entre células epiteliais e do estroma. Sabe-se que a estrutura e a homeostase do tecido mamário normal são mantidas pela interação entre estas células. Por exemplo, fibroblastos presentes no estroma modulam a proliferação das células epiteliais (SADLONOVA et. al., 2005) e a presença de ER no estroma é necessária para esse processo (CUNHA et. al., 1997).

Outra importante característica destes receptores no tecido mamário é que sua expressão e distribuição variam juntamente com as oscilações dos hormônios durante o ciclo menstrual, evidenciando o efeito cíclico dos hormônios ovarianos sobre as mamas. As células epiteliais expressam níveis variáveis de ERs, sendo que são predominantes na fase folicular (MARKOPOLOUS et. al., 1988; RICKETTS et. al., 1991; PETERSEN et. al. 1998). ERs também foram identificados no estroma

mamário humano por imuno-histoquímica e em cultura primária de fibroblastos humanos (MALET et. al., 1991; PALMIERI et. al., 2004). Já receptores PRs são expressos exclusivamente pelo epitélio mamário normal, sendo predominantes na fase lútea (SODERQVIST et. al., 1993; SEAGROVES et. al., 2000; ISMAIL et. al., 2002).

Em tumores mamários, os receptores hormonais também estão presentes. No entanto, há alterações significativas da expressão destes componentes ao longo do tempo. Isto caracteriza, portanto, alterações dos efeitos hormonais levando ao desenvolvimento das neoplasias. Nos tumores benignos são descritos aumentos importantes na expressão de receptores hormonais, se comparados ao tecido normal (SAPINO et. al., 2006) que ainda respondem ao ciclo hormonal. No fibroadenoma, por exemplo, há um aumento significativo das quantidades de ER e PRs. A presença destes receptores no fibroadenoma comprova sua dependência hormonal como já citado anteriormente (KUTTENN et. al., 1981; CERICATTO et. al., 2005; SAPINO et. al., 2006). No caso de tumores malignos, pode ocorrer a diminuição da expressão e até ausência de receptores. Nos estágios iniciais, terapias hormonais são eficazes, já que há ainda a presença de ERs e PRs (McGUIRE & CLARK, 1992, NICHOLSON et. al., 1999; MANSOUR et. al., 1994). Com a progressão nos estágios de desenvolvimento com o tempo, os tumores Passam de um estado hormonal responsivo para não-responsivo. Cerca de dois terços dos cânceres mamários expressam somente ER e, em um terço, há completa ausência de receptores nos estágios mais avançados. Estas condições estão associadas com menor diferenciação tumoral e, portanto, pior evolução clínica (MARKOPOLOUS et. al., 1988; LAPIDUS et. al., 1998).

As informações apresentadas mostraram a grande importância dos hormônios esteróides bem como a expressão de seus receptores no controle de crescimento e diferenciação, tanto de células mamárias normais quanto de neoplasias. No entanto, estrogênios e progesterona não atuam independentemente. Há muitos outros fatores adicionais que interferem no comportamento celular como, por exemplo, fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular (HOWLETT & BISSELL, 1993). Diferentes estudos mostraram que estes componentes podem ter correlações funcionais e atuar em conjunto sobre os tecidos, evidenciando maior grau de complexidade no controle das sinalizações. Por exemplo, a síntese de componentes

da matriz via interações de fatores de crescimento com outros componentes da própria matriz. TGF-β liga-se aos proteoglicanos decorim e betaglicam, o que desencadeia o controle da expressão de vários componentes da matriz no tecido mamário (IGNOTZ & MASSAGUE, 1986; YAMAGUTHI et. al., 1990; STREULI et. al., 1993). Em outro exemplo, hormônios esteróides podem regular a expressão de receptores de fatores de crescimento. Estrogênios e progesterona regulam a expressão de EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), importante no crescimento e morfogênese dos ductos mamários (BERTHOIS et. al., 1989; HASLAN et. al., 1992; CHRYOGELOS et. al., 1994). Em carcinomas mamários, EGFR tem sua expressão aumentada e associada com piores prognósticos (KOENDERS et. al., 1992; revisão FOX & HARRIS, 1997). Há ainda, estudos que demonstraram que receptores de hormônios esteróides podem ser ativados por fatores de crescimento. ERs são fosforilados e ativados por EGF e são alvos de várias quinases induzidas por fatores de crescimento (IGNAR-TROWBRIDGE et. al., 1992; ALI et. al., 1993; BUNONE et. al., 1996; ARNOLD et. al., 1997).

Correlações entre arquitetura da matriz extracelular e hormônios também são descritas na literatura. A composição da matriz extracelular pode ser alterada por um grande número de enzimas proteolíticas, incluindo serino-proteases e metaloproteases, num processo denominado remodelamento. Nas glândulas mamárias, as metaloproteases atuam juntamente com estímulos hormonais para induzir alterações morfológicas e funcionais necessárias para vários estágios. As metaloproteases estão associadas com crescimento tumoral mamário, invasão, metástase e angiogênese (CHAMBERS & MATRISIAN 1997; BENAUD et. al., 1998).

Estes exemplos mostram que a presença dos componentes da matriz extracelular, como proteoglicanos, proteínas multiadesivas e estruturais circundantes às células epiteliais e estromais coordenam diversos comportamentos celulares via combinação com fatores de crescimento e efeitos hormonais (HOWLETT & BISSEL, 1993).

4.4 PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS NO FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL

Proteoglicanos, como já discutido anteriormente no presente trabalho, são importantes componentes da superfície celular e da matriz extracelular, com capacidade de interagir com outros componentes da matriz como colágeno, fibronectina, laminina, fatores de crescimento e citocinas (SCOTT, 1992; COUCHMAN et. al., 1983; IOZZO et. al., 1998). Estas interações podem afetar a proliferação, a migração, a adesão e a diferenciação celulares e muitas destas funções podem depender das cadeias de glicosaminoglicanos (MERLE et. a.l, 1999).

Proteoglicanos estão presentes no tecido mamário normal, tanto no estroma quanto no epitélio. A expressão dos esqueletos protéicos dos proteoglicanos, das cadeias de glicosaminoglicanos e sua degradação são reguladas por muitos fatores que controlam o desenvolvimento e funções das glândulas mamárias (PARRY et. al., 1985; WARBURTON et. al., 1992). Estudos recentes mostraram também que os glicosaminoglicanos participam dos processos de desenvolvimento do estroma e do epitélio, mediando às interações célula-célula e célula-matriz extracelular (FERNIG et. al., 1994; PENC et. al., 1998; GALAGHER & LION, 2000).

Em tumores, há alterações significativas no conteúdo de proteoglicanos. Estas modificações podem facilitar o crescimento, a progressão e a invasão tumoral. Por exemplo, os níveis de decorim estão significativamente aumentados no estroma de carcinoma de cólon (IOZZO & COHEN, 1993). Além das alterações nas quantidades, também são descritas alterações na estrutura destes proteoglicanos. Em leiomioma, tumor benigno uterino, foi demonstrado que o padrão de glicosilação dos proteoglicanos de matriz extracelular se encontra modificado, havendo aumento das cadeias dos glicosaminoglicanos condroitim sulfato e dermatam sulfato, com mudanças de suas estruturais (BERTO et. al., 2001; 2003).

Em tumores mamários, assim como em uma grande diversidade de tecidos tumorais estudados, foram descritos aumentos significativos na expressão de proteoglicanos, com importante aumento na concentração principalmente de condroitim sulfato, se comparados aos tecidos normais de origem (TAKEUCHI et. al., 1976; SAMPAIO et. al., 1977; IOZZO 1998; OLSEN et. al., 1988; BERTO et. al., 2003). O aumento de proteoglicanos de condroitim sulfato em relação aos

proteoglicanos de dermatam sulfato e/ou proteoglicanos de heparam sulfato em células tumorais diminui a interação célula-célula e célula-matriz, aumentando a capacidade invasiva do tumor (PEJLER & DAVID, 1987). Contudo, este aumento varia muito, dependendo do tamanho do tumor, do tipo e do estágio de desenvolvimento tumoral (JERÔNIMO et. al., 1994; RICCIARDELLI et. al., 1997).

Nos últimos anos, o número de trabalhos com objetivo de analisar o efeito de hormônios esteróides sobre o tecido mamário normal e tumores malignos, no que se refere à sua composição (componentes da matriz extracelular) e às alterações bioquímicas e funcionais, está aumentando (FERGUSSON et. al. 1992; HANSEN et. al., 2000). Sabe-se, por exemplo, que estrogênios e seus receptores estão intimamente relacionados com a iniciação, a progressão e a malignidade tumoral, pela sua capacidade de estimular proliferação celular (OSBORNE et. al., 1985; KATZENELLENBOGEN et. al., 1987). Entretanto, os mecanismos bioquímicos envolvidos nestes processos ainda não estão completamente esclarecidos.

Já em relação aos tumores benignos, como fibroadenoma, o número de estudos é menor. As modificações estruturais da matriz extracelular e suas consequências decorrentes das oscilações hormonais durante o ciclo menstrual são pouco estudadas. O número de trabalhos é ainda menor no que se refere aos proteoglicanos e glicosaminoglicanos sob os efeitos dos diferentes hormônios durante o ciclo menstrual. Isto significa que é de grande importância buscar melhor compreensão sobre os níveis de expressão e possíveis modificações estruturais destas macromoléculas para entender melhor das alterações fisiopatológicas no fibroadenoma e assim, contribuir para novas perspectivas de tratamento.

OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi estudar os proteoglicanos e glicosaminoglicanos de fibroadenoma e do tecido mamário normal adjacente, nas fases proliferativa e lútea do ciclo menstrual. Os seguintes aspectos foram abordados:

1. Presença e a concentração de proteoglicanos e glicosaminoglicanos no tecido normal e no fibroadenoma;
2. Identificação dos proteoglicanos presentes nos tecidos, no que se refere ao esqueleto protéico e às cadeias de glicosaminoglicanos;
3. Análise dos proteoglicanos sintetizados em explantes dos tecidos;
4. Localização de decorim e versicam nos tecidos tumoral e normal.

MATERIAIS

1 AMOSTRAS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO HUMANO NORMAL ADJACENTE

Amostras de fibroadenoma e tecido mamário normal humano adjacente (usado como controle pareado) foram obtidos de vinte e oito pacientes atendidas no Setor de Doenças Benignas da Mama da Disciplina de Mastologia do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina. Estas eram portadoras de fibroadenomas de 1 a 4 cm, na faixa etária de 16 a 35 anos.

Foram excluídas do estudo gestantes, pacientes que amamentaram nos últimos 12 meses, usuárias de anticoncepcionais orais ou que o fizeram nos últimos 3 meses. Também foram excluídas as portadoras de qualquer endocrinopatia, bem como aquelas com suspeita de carcinoma mamário.

O diagnóstico de fibroadenoma foi feito por tríplice diagnóstico: quadro clínico, PAAF ou CORE e Ultra-sonografia. Foram consideradas lesões fibroadenomatosas os nódulos de consistência firme e elástica, geralmente móvel, indolor, de superfície regular, lisa ou lobulada, livre em relação à pele, que se apresentava normal. A PAAF ou CORE nos fornece o diagnóstico cito-histopatológico. As dimensões dos fibroadenomas foram medidas em cm. O aparelho de ultra-sonografia usado para a avaliação das dimensões dos nódulos mamários foi um LOGIQ 5 PRO DA GE, aparelho usado com transdutor de 7,5–12 mhz, que encontra-se na Casa da Mama do Setor de Mastologia do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina.

2 GLICOSAMINOGLICANOS PADRÕES

Foram usados como padrões os seguintes glicosaminoglicanos:

- Condroitim 4-sulfato (C4S) e condroitim 6-sulfato (C6S), extraídos de cartilagem de baleia e de tubarão, respectivamente, adquiridos de Seikagaku Kogyo Co. Ltd. (Tóquio, Japão);

- Condroitim sulfato (CS), mistura de condroitim sulfato de cartilagem de baleia e de tubarão adquirido da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA);
- Dermatam sulfato (DS) de pele de porco ou de mucosa intestinal suína, adquirido da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA);
- Heparam sulfato (HS) de pulmão bovino, purificado como descrito por DIETRICH & NADER (1974).

3 ANTICORPOS E MARCADORES FLUORESCENTES

Anticorpos foram utilizados para realização de *immunoblotting* e imunofluorescência.

3.1 ANTICORPOS PRIMÁRIOS

- Anticorpo primário monoclonal IgG anti-decorim *(monoclonal anti-human decorin)*, adquirido da Seikagaku Kogyo Company, Ltd. (Tóquio, Japão);
- Anticorpo primário monoclonal IgG anti-proteoglicano humano de alto peso molecular – versicam (*monoclonal anti-human large proteoglycan*), adquirido da Seikagaku Kogyo Company, Ltd. (Tóquio, Japão).

3.2 ANTICORPOS SECUNDÁRIOS

- Anticorpo policlonal anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase, adquirido da Seikagaku Kogyo Company, Ltd. (Tóquio, Japão);
- Anticorpo policlonal anti-IgG de camundongo marcado com biotina, adquirido da Seikagaku Kogyo Company, Ltd. (Tóquio, Japão);
- Anticorpo policlonal anti-IgG de camundongo produzido em cabra conjugado com Alexa Fluor^{TM} 488 (H+L) (*Alexa Fluor^{TM} 488 goat anti-mouse IgG*), adquirido da Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, USA);

- Anticorpo policlonal anti-IgG de camundongo produzido em cabra conjugado com Alexa Fluor™ 594 (H+L) (*Alexa Fluor™ 594 goat anti-mouse IgG*), adquirido da Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, USA).

3.3 MARCADORES FLUORESCENTES

- Faloidina conjugada com Alexa Fluor™ 568 foi obtida da Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, USA).

4 MEIO DE CULTURA

Para o cultivo dos explantes de tecido mamário normal e fibroadenoma foi utilizado o meio nutriente F-12 com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, adquirido da GIBCO (Life Tecnologies, Rockville, MD, USA), ao qual foram acrescentadas os antibióticos penicilina e estreptomicina (penicilina-estreptomicina liofilizadas em pó, diluídas em 0,9% NaCl da Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.

O meio foi preparado dissolvendo-se F-12 em pó (F-12 *nutrient mixture*) em água recém-destilada e passada no purificador de água Milli-Q, acrescentando-se 1,18 g de bicarbonato de sódio, 10.000 UI de penicilina e 10 mg/ml de estreptomicina. Em seguida, o meio foi esterilizado por filtração em filtros de acetato de celulose (0,22 µm) e distribuído em frações de 450 ml a 4°C.

5 RADIOISÓTOPO

^{35}S-Sulfato de sódio livre de carregador foi adquirido do IPEN-CNEM (São Paulo, SP, Brasil) – Registro da Comissão de Energia Nuclear processo n° 104.695/70 (matrícula 12679) – validade: 31/05/2010. Número de registro HBN AP – 0842. Este radioisótopo foi usado para marcação metabólica dos proteoglicanos e glicosaminoglicanos em condições de cultura.

6 ENZIMAS

Papaína (protease) foi obtida da Sigma Chemical Co. (St. Loius, MO, USA.

Condroitinases AC e B de *Flavobacterium heparinum* (MICHELACCI & DIETRICH, 1974) foram purificadas como descrito por AGUIAR et. al. (2003).

Heparitinase II de *Flavobacterium heparinum* foi purificada como descrito por SILVA & DIETRICH (1974) e NADER et. al. (1990).

7 OUTRAS DROGAS E MATERIAIS

Além das drogas e reagente de boa procedência e grau analítico foram utilizados:

- 4',6-Diamidino-2-fenilindol – DAPI (Nucleid Acid Stain), Molecular Probes (Eugene, OR, USA);
- Ácido isobutírico, da Aldrich Chemical Co., Inc. (Milwaukee, WI, USA);
- Acrilamida – BioRad Laboratories (Richmond, CA, USA);
- Agarose (standart low Mr) – BioRad Laboratories (Richmond, CA, USA);
- Azul de Toluidina, albumina sérica bovina, N, N'-metilbisacrilamida, N,N,N,N' – tetrametilenodiamina (TEMED) – Sigma Chemical Co. (St. Loius, MO, USA);
- Brometo de cetiltrimetilamônio (CETAVLON) e 1,3- diaminopropano – Aldrich Chemical Co., Inc. (Millwauke, WI, USA);
- Coquetel de inibidores de proteases contendo ácido ε-aminocapróico 0,1M, benzamidina 6,5mM, iodoacetamida 5,5mM e PMSF (Fluoreto de fenilmeteilsulonila) 0,1mM (todos obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) preparados em nosso laboratório;
- Diaminobenzaldeído (DAB) – Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA);
- Estreptavidina conjugada com peroxidase foi obtido da Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, USA);
- Garrafas de cultura de 25 cm^2/ 30ml, da Corning Laboratory Science (Ft. Washington, PA, USA);
- Hidrocloreto de guanidina (aminomethanamidine) obtida de Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA);

- Kit SuperSignal RPA III Chemiluminescent detection obtido da Termo Fisher Scientific (Rockford, USA);
- Lâminas silanizadas foram adquiridas da Dako Co. (Carpinteria, Califórnia, USA);
- Líquido de cintilação – Ultima Gold^{TM} - obtido da Packard Instruments Company Inc., (Downers Grove, IL, USA);
- Meio de montagem aquoso Fluoromount-G, adquirido de Electron Microscopy Sciences (Ft, Washington, PA, USA);
- PBS (*phosphate buffered saline*) 0,1 M preparado em nosso laboratório, utilizando NaCl 137 mM; Na_2HPO_4 15,22 mM, KH_2PO_4 1,5 mM e KCl 2,7 mM em água filtrada em sistema Milli-Q^{TM}, em pH 7,4, todos obtidos da MERCK EGA (Darmstadt, Alemanha);
- Placas para cultura de poliestireno (P-35) 35X10 mm e (P-20) 20X10 mm obtidas da Falcon (New Jersey, USA);
- *Tissue Freezing Medium* – Leika Intruments Nussloch GmbH (Wetzlar, Alemanha) e Electron Microscopy Sciences (Ft, Washington, PA, USA);

8 EQUIPAMENTOS

Além dos equipamentos comuns de laboratório foram utilizados:

- Câmara de eletroforese em gel, desenvolvido por JAQUES et. al., (1968) – Técnica Permatron Ind. Com. Ltda. (São Paulo , SP, Brasil);
- Densitômetro CS-9000 – Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão);
- Densitômetro Quick Scan Flur Vis adquiridos da Helena Laboratories (Beaumont, TX, USA);
- Fonte de corrente contínua regulável – Técnica Permatron Ind. Com. Ltda. (São Paulo, SP, Brasil);
- Fonte de corrente contínua regulável modelo 200/2.0 – BioRad Laboratories, Inc. (Hercules, CA; USA);
- Microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E600 (Tóquio, Japão);

- Microscópio de varredura Confocal a laser LSM-510 NLO adquirido da Zeiss (Alemanha);
- Micrótomo criostato, modelo HM 500 OM, obtido da Microm Laborgeräte GmbH (Walldorf, Alemanha);
- Sistema Packard Cyclone Phosphor Image, adquirido da Packard Instrument Company (Meriden, CT, USA);
- Sistemas de eletroforese vertical, Modelo Protean II xi, da Bio-Rad (Hercules, CA, USA) e Mini-V 8.10, da BRL (Gaithersburg, MD, USA);

MÉTODOS

1 MARCAÇÃO METABÓLICA DOS PROTEOGLICANOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL HUMANOS COM ^{35}S-SULFATO

Pequenos fragmentos de fibroadenoma e de tecido mamário normal humano adjacente a cada tumor (usado como controle pareado), obtidos imediatamente após a cirurgia, foram lavados com 5 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo gentamicina (4 mg/ml) e colocados em frascos de cultura, contendo 10 ml de meio F12 sem soro fetal bovino acrescidos dos antibióticos penicilina (10.000 U) e estreptomicina (100 mg) e ainda de ^{35}S-sulfato (50 µCi/ml de meio) para marcação metabólica de proteoglicanos. Estes explantes de tecidos foram mantidos em condições de cultura por 24 horas a 37ºC, em atmosfera de 2,5% CO_2. Após este período, o meio foi coletado e os proteoglicanos foram precipitados pela adição lenta e sob agitação de dois volumes de metanol. Após 18 horas à -20°C, o precipitado formado foi coletado por centrifugação (1300 X g, 15 minutos), seco e ressuspenso em 1 ml de água destilada para posterior análise. Dos tecidos, foram extraídos proteoglicanos e glicosaminoglicanos, como descrito a seguir.

2 EXTRAÇÃO DE PROTEOGLICANOS

As amostras de tecidos (fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente, marcados ou não com ^{35}S-sulfato) foram inicialmente pesadas. Para a extração de proteoglicanos, cada tecido foi cortado em fragmentos de aproximadamente 0,5 mm, congelados em nitrogênio líquido, macerados e incubados com dez volumes de uma solução de hidrocloreto de guanidina 4 M em tampão de acetato de sódio 0,05 M, pH 6,5 (GuHCl), contendo os inibidores de proteases: ácido ε-aminocapróico 1,1 M, benzamidina 6,5 mM, iodocetamida 5,5 mM e PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride)* 0,1 M (SAMPAIO et. al., 1988). Após 18 horas sob agitação a 4ºC, os fragmentos ainda presentes foram separados por centrifugação (1300 X g, 2 minutos) e as macromoléculas do sobrenadante foram precipitadas pela adição lenta de três volumes de metanol, sob agitação. O precipitado formado após 18 horas a -20ºC foi coletado por centrifugação (1300 X g, 15 minutos), lavado com metanol e seco a vácuo. Dos fragmentos ainda presentes (tecido residual), foram extraídos glicosaminoglicanos, após proteólise, como descrito a seguir.

Tanto as moléculas obtidas do meio de cultura, como os proteoglicanos e glicosaminoglicanos extraídos do tecido residual marcadas com ^{35}S-sulfato foram ressuspensas em 1ml de água destilada. E proteoglicanos extraídos dos tecidos não-marcados com ^{35}S-sulfato foram pesados e ressuspensos em solução de uréia 6 M em tampão acetato de sódio 0,05M, pH 6,5 em concentração de 50 mg/ml.

3 EXTRAÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS

As cadeias de glicosaminoglicanos foram extraídas após proteólise dos tecidos residuais. Os tecidos foram incubados com a enzima proteolítica papaína (2 mg/ml em tampão fosfato-cisteína 0,05 M, pH 6,5, contendo EDTA 20 mM), na proporção de 1 ml de solução para cada 100 mg de tecido úmido. Após 18 horas de incubação a 60°C, ácidos nucléicos e proteínas ainda presentes na solução foram precipitados pela adição de TCA (10%, concentração final), em presença de NaCl (1 M, concentração final). Após 10 minutos em banho de gelo, o precipitado formado foi removido por centrifugação (1300 X g, 15 minutos). Ao sobrenadante, foram adicionados lentamente três volumes de metanol para precipitação dos glicosaminoglicanos, sob agitação. Após 18 horas a -20°C, o precipitado formado foi coletado por centrifugação (1300 X g, 20 minutos), seco a vácuo, ressuspenso e analisado.

4 CARACTERIZAÇÃO DE PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS

Os proteoglicanos e glicosaminoglicanos extraídos (marcados ou não com ^{35}S-sulfato) foram caracterizados por uma combinação de eletroforese em gel de agarose, eletroforese em gel de poliacrilamida, *immunoblotting*, degradação com glicosaminoglicano liases específicas e cromatografia em papel.

4.1 ELETROFORESE

4.1.1 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

4.1.1.1 TAMPÃO 1,3-DIAMINOPROPANO-ACETATO (PDA)

Para identificação e/ou quantificação de proteoglicanos e glicosaminoglicanos (0,5 a 5µg em 5µl) foi utilizado o método de eletroforese em gel de agarose em tampão 1,3-diaminopropano-acetato 0,05 M, pH 9,0 (PDA), desenvolvido por JAQUES et. al. (1968) e modificado por DIETRICH & DIETRICH (1976).

O método consiste na aplicação de 5 µl do material a ser analisado a uma lâmina de gel de agarose 0,55% em tampão 1,3-diaminopropano-acetato 0,05 M, pH 9,0 (PDA), com espessura de 2 mm. A corrida eletroforética é realizada em uma câmara refrigerada, submetida a uma diferença de potencial de 100 V, durante aproximadamente 1 hora ou até que se obtenha a migração apropriada. Finalizada a corrida eletroforética, os proteoglicanos e/ou glicosaminoglicanos são precipitados no gel por cetavlon (brometo de cetiltrimetilamônio) 0,1%, por um período mínimo de 2 horas. O gel é, então, seco sob calor e ventilação e corado com azul de toluidina 0,1% em solução de ácido acético 1%: etanol 50%. O excesso de corante é retirado por lavagem na mesma solução (ácido acético 1%: etanol 50%). Os glicosaminoglicanos são identificados por comparação a padrões conhecidos e quantificados por densitometria.

4.1.1.2 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Proteoglicanos, glicosaminoglicanos e seus produtos de degradação foram também analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS/PAGE).

As amostras previamente secas a vácuo foram ressuspensas em 20 µl de tampão de amostra (glicerol 10%, 62,5 mM de Tris HCl 1,25 M, SDS 5%, pH 6,6, azul de bromofenol 0,1%, β-mercapto 5%), fervidas por dez minutos a 100ºC e aplicadas ao gel em gradiente de poliacrilamida de 3 a 20% preparado a partir de

uma solução de acrilamida 30%, bisacrilamida 0,8% e tampão Lower Gel Buffer (Tris 1,5 M em HCl pH 8,8, SDS 0,4%). A corrida eletroforética foi realizada em presença de tampão de corrida (Tris 0,025 M, glicina 15 mM, SDS 0,1%) em um sistema vertical modelo da Bio-Rad, a 50 V, por 4-5 horas. Os géis foram fixados (metanol 50%, ácido acético 12%) e revelados com nitrato de prata 0,2% para visualização de proteínas ou, ainda, submetidos à transferência dos compostos presentes a uma membrana de nitrocelulose, na mesma cuba eletroforética em presença de tampão de transferência a 50 V por 4 horas (Tris 0,025 M, glicina 15 mM, metanol 20%), para identificação de proteoglicanos por *immunoblotting*, descrito a seguir.

Os compostos radioativos foram submetidos aos mesmos procedimentos, exceto que as cadeias de ^{35}S-glicosaminoglicanos foram identificadas pela exposição do gel a uma tela (filme) sensível, analisada após 24 horas de exposição no sistema *Packard Cyclone Phosphor Image* para obtenção da imagem digital.

Este método relaciona a distância percorrida pelo composto (migração eletroforética) com o logaritmo do seu peso molecular.

4.1.2 IMMUNOBLOTTING

Os proteoglicanos extraídos dos tecidos (fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente) foram também analisados por *immunoblotting*, método que permite a identificação dos esqueletos protéicos.

Os proteoglicanos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e/ou eletroforese em gel de poliacrilamida. Após a corrida eletroforética, os compostos foram transferidos para membrana de nitrocelulose. Esta membrana foi submetida a uma série de etapas apresentadas a seguir:

a-) Incubação em solução de caseína (leite em pó 5% diluído em PBS), para bloquear ligações inespecíficas de proteínas, por 2 horas à temperatura ambiente sob agitação;

b-) Lavagem com PBS (3 vezes, 5 minutos cada);

c-) Incubação com anticorpo primário monoclonal anti-decorim (anti-proteoglicano humano de dermatam sulfato) – diluído 1:3000 em BSA 1% em PBS por 2 horas à temperatura ambiente ou 18 horas à 4ºC;

d-) Lavagem com PBS (3 vezes, 5 minutos cada);

e-) Incubação com anticorpo secundário policlonal anti-IgG de camundongo conjugado com biotina (diluído 1:2000 em BSA 1% em PBS), por 2 horas no escuro.

f-) Lavagem com PBS (3 vezes, 5 minutos cada);

g-) Incubação com estreptavidina conjugada com peroxidase (diluída 1:2000 em BSA 1% em PBS) por 1 hora.

h-) Lavagem com PBS (5 vezes, 5 minutos cada);

i-) Revelação por quimioluminescência - Kit SuperSignal RPA III;

j-) Incubação com solução de diaminobenzaldeído (DAB) 0,5 mg/ml em PBS contendo $NiCl_2$ 0,2%, no escuro, sob agitação, temperatura ambiente, 15 minutos;

k-) Revelação por incubação com a mesma solução anterior contendo H_2O_2 (H_2O_2 30 volumes diluída 60 vezes, 1μl para cada ml de solução de DAB);

l-) Interrupção da reação pela lavagem com água destilada;

Para análise de versicam, os mesmos procedimentos foram realizados, exceto que o anticorpo primário utilizado foi o anticorpo monoclonal IgG anti-proteoglicano humano de alto peso molecular (anti-versicam).

4.1.3 DEGRADAÇÕES ENZIMÁTICAS

As degradações enzimáticas com glicosaminoglicanos liases específicas - condroitinases AC, B (MICHELACCI & DIETRICH, 1974; AGUIAR et. al., 2003) e heparitinase II (SILVA & DIETRICH, 1974; NADER et. al., 1990) de *Flavobacterium heparinum* – foram realizadas como descrito anteriormente (CÁSSARO & DIETRICH, 1977).

Alíquotas de proteoglicanos ou glicosaminoglicanos (25-100 μg) foram incubados com 2-3 $x10^{-4}$ unidade de condroitinase AC ou B em tampão etilenodiamino-acetato (EDA) 0,05 M, pH 8,0, e heparitinase II em tampão etilenodiamino-acetato (EDA) 0,1 M, pH 7,0, em um volume final de 50 μl, a temperatura ótima de cada enzima por 6 horas. Em seguida, as amostras foram secas a vácuo, ressuspensas em 5 μl e submetidas à eletroforese em gel de agarose ou eletroforese em gel de poliacrilamida.

A condroitinase AC age especificamente sobre ligações β(1-4) entre N-acetilgalactosamina ou N-acetilglucosamina e ácido β-D-glucurônico de condroitim sulfato, dermatam sulfato e ácido hialurônico, formando dissacarídeos ou oligossacarídeos insaturados (YAMAGATA et. al., 1968). A condroitinase B age apenas nas regiões de dermatam sulfato que contêm ligações β(1-4) entre N-acetilgalactosamina e ácido α-L-idurônico (MICHELACCI & DIETRICH, 1974; 1975). A heparitinase II quebra heparam sulfato em ligações glicosídicas do tipo α(1-4) entre D-glucosamina N-acetilada ou N-sulfatada e ácido α-L-idurônico. Esta enzima também pode agir em ligações envolvendo D-glucosamina e o ácido β-D-glucurônico, porém a hexosamina deve estar sulfatada em C6 (NADER et. al., 1990).

4.1.4 ANÁLISES DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EM PAPEL

Ensaios enzimáticos (como descrito no item anterior) foram utilizados para obtenção de produtos de degradação, posteriormente analisados por cromatografia em papel.

Misturas de incubação das amostras de glicosaminoglicanos dos tecidos (fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente) com as glicosaminoglicanos liases específicas foram aplicadas em papel Whatman nº 1 e submetidos à cromatografia descendente em ácido isobutírico: NH_4OH 1,25 M (5:3 v/v). Após 18-24 horas, o cromatograma foi seco em estufa com aquecimento e circulação de ar. Os produtos insaturados formados foram vistos no cromatograma sob luz U.V. (UV distante) e os produtos redutores foram revelados com nitrato de prata em meio alcalino. Os produtos foram quantificados por densitometria.

Os produtos de degradação obtidos a partir dos compostos marcados com ^{35}S-sulfato foram analisados pela exposição do cromatograma a um uma tela (filme) sensível, analisada após 24 horas de exposição no sistema *Packard Cyclone Phosphor Image* para obtenção da imagem digital e quantificada como descrito no item a seguir.

4.1.5 PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS MARCADOS COM ^{35}S-SULFATO

A quantificação dos compostos radioativos foi realizada por contagem da radioatividade utilizando líquido de cintilação (Ultima Gold ^{TM}). As bandas do gel de eletroforese em agarose ou os cromatogramas contendo radioatividade, identificadas por radioautograma, foram retiradas, mergulhadas no líquido de cintilação, e a radioatividade foi quantificada utilizando o contador de cintilações. A radioatividade de cada amostra foi expressa em cpm.

4.1.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Inicialmente, amostras dos tecidos foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,4, por 18 horas. Após a fixação, foram lavadas com PB e mantidas por 24 horas em solução de sacarose 30% em PB, à temperatura ambiente. Os tecidos foram congelados em *Tissue Freezing Medium* e armazenados a –20°C. Foram cortados em secções de 20 µm em criostato, e estes cortes foram montados em lâminas silanizadas.

Em seguida, estes cortes foram submetidos aos procedimentos a seguir para imunolocalização de proteoglicanos e outras moléculas:

a-) Lavagem dos cortes com salina tamponada (PBS) 0,1 M, pH 7,4 dez vezes;

b-) Incubação com glicina 0,1% diluída em PBS por 1 minuto a 25°C.

c-) Lavagem dos cortes com salina tamponada (PBS) 0,1 M, pH 7,4 cinco vezes;

d-) Incubação com soroalbumina bovina 1% (BSA) em PBS por dez minutos à temperatura ambiente em câmara úmida;

e-) Lavagem dos cortes com salina tamponada (PBS) 0,1 M, pH 7,4 dez vezes;

f-) Incubação por 1 hora com anticorpo primário anti-decorim *(monoclonal anti-human dermatan sulfate proteoglycan*) diluído 1:50 em solução de BSA 1% em PBS ou anticorpo monoclonal anti-versicam (*monoclonal anti-human large proteoglycan*) diluído 1:50 diluído na mesma solução de BSA .

g-) Lavagem dos cortes com salina tamponada (PBS) 0,1 M, pH 7,4 dez vezes;

h-) Incubados por 1 hora com anticorpo secundário anti-IgG produzido em cabra conjugado com fluoróforo Alexa Fluor™ 488 (*Alexa Fluor™ 488 goat anti-mouse IgG -*

verde) ou com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo produzido em cabra conjugado com Alexa Fluor™ 594 (*Alexa Fluor™ 594 goat anti-mouse -vermelho*) diluído 1:50 para PBS, centrifugados previamente a 16.000 X g, no escuro, por dez minutos em microcentrífuga.

i-) Alternativamente, marcação das proteínas de citoesqueleto (filamentos de actina) por incubação dos cortes com faloidina conjugada com Alexa Fluor™ 568 (*Alexa Fluor™ 568 phalloidin*) 1:150, diluído em PBS, por uma hora;

j-) Lavagem dos cortes com salina tamponada (PBS) 0,1 M, pH 7,4 dez vezes;

k-) Marcação do DNA por incubação dos cortes com DAPI (*4´,6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride*) diluído 1:1000 em PBS por 5 minutos.

l-) Lavagem dos cortes com salina tamponada (PBS) 0,1 M, pH 7,4 dez vezes;

m-) Rápida lavagem com água destilada e posterior montagem das lâminas com *Fluoromount G/PBS* (2:1)

n-) Observação dos cortes e marcações em microscópio de fluorescência (*Nikon Eclipse E600 microscope* equipado com *CF160 epi-fluorescence optics*).

o-) Digitalização de imagens por microscopia confocal (*LSM510 Confocal Microscope, Carl Zeiss*).

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos quanto à concentração de proteoglicanos e glicosaminoglicanos de fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente foram submetidos à análise estatística. Todas as correlações apresentadas foram analisadas pelo teste T de Student, utilizando o programa *JMP 8 Statistical Discovery*. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi sempre fixado em 5% ($P<0,05$).

RESULTADOS

1 PACIENTES E TUMORES

Neste trabalho foram incluídas vinte e oito pacientes (previamente informadas conforme itens 2 e 3 do Anexo), com idades entre 16 e 35 anos, não usuárias de anticoncepcionais e sem histórico de antecedentes familiares de câncer de mama.

A Tabela 6 e o item 1 do Anexo mostram informações dos casos estudados.

TABELA 6 – DADOS INDIVIDUAIS DAS PACIENTES REFERENTES AO CICLO MENSTRUAL

CASO	PACIENTE	COM M.M.* (^{35}S)	SEM M.M.**	IDADE	DIA CICLO	FASE CICLO	PROGESTERONA
				(anos)	(dias)		(ng/dl)
1	J.L.S.	X		20	20	FL	5,9
2	J.M.D.	X		19	18	FL	4,5
3	M.F.S.	X		33	24	FL	6,6
4	M.P.	X		22	11	FP	0,7
5	J.S.C.	X		19	13	FP	0,5
6	D.D.S.	X		28	12	FP	0,71
7	G.A.S.	X		18	16	FL	28,3
8	S.C.S.	X		30	23	FL	4,9
9	R.L.A.	X		18	2	FP	1,72
10	R.A.R.	X		22	9	FP	0,96
11	J.A.C.S.	X	X	17	8	FP	0,2
12	A.C.V.L.	X	X	19	25	FL	7,2
13	L.S.F.	X	X	16	14	FP	2,2
14	S.L.F.	X	X	29	16	FL	8,6
15	M.F.K.	X		22	6	FP	1,1
16	J.B.U.A.	X		21	4	FP	1,0
17	I.P.S.	X		30	30	FL	3,3
18	S.N.O.	X		16	12	FP	0,5
19	R.P.B.C.	X	X	35	8	FP	0,7
20	F.S.	X	X	27	17	FL	10,1
21	K.C.S.	X	X	17	19	FL	4,1
22	D.P.O.	X	X	20	4	FP	0,9
23	R.C.S.	X	X	27	4	FP	0,3
24	J.S.S.	X		33	28	FL	4,9
25	R.M.R.	X		24	14	FP	0,6
26	S.M.S.		X	24	27	FL	12,8
27	A.M.G.S.		X	27	2	FP	1,8
28	F.T.V.		X	22	25	FL	30,0

FP: fase proliferativa do ciclo menstrual; FL: fase lútea do ciclo menstrual; M.M.: marcação metabólica;

**Amostras submetidas à marcação metabólica com ^{35}S-sulfato;*

*** Amostras analisadas sem marcação metabólica com ^{35}S-sulfato.*

Cerca de 64% dos casos analisados incluíram mulheres com idades entre 16 e 24 anos, e 36% com idades entre 27 e 35 anos. Estes dados estão de acordo com a literatura, e mostram que a ocorrência de fibroadenoma tem maior incidência em mulheres mais jovens.

No que se refere ao período menstrual, foi obtido o dia do ciclo de cada paciente. No entanto, para confirmação da fase do ciclo foi realizada a dosagem de progesterona sérica. Isto porque durante o ciclo menstrual, a concentração deste hormônio na fase proliferativa é de aproximadamente 1 ng/ml, elevando-se após a ovulação até uma concentração média de 10 ng/ml, que é mantida por 7 a 10 dias. De acordo todos os resultados obtidos, verificamos que 15 pacientes estavam na fase proliferativa e 13 pacientes na fase lútea.

Informações sobre os tumores também foram coletados para correlacionar posteriormente com os dados obtidos das análises bioquímicas realizadas a partir de amostras de fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente. O número de nódulos diagnosticados nas pacientes e seus respectivos tamanhos são apresentados na Tabela 7.

Cerca de 75% das pacientes apresentaram apenas um único nódulo fibroso, 21% dois nódulos e 4% três nódulos. Os tamanhos variaram entre 1 e 5 cm, com média de 2,7 cm.

TABELA 7 – DADOS DOS TUMORES BENIGNOS DIAGNOSTICADOS NAS PACIENTES

CASO	PACIENTE	QUANTIDADE	TAMANHO (CM)
1	J.L.S.	1	2
2	J.M.D.	1	5
3	M.F.S.	1	13
4	M.A.	2	2/1*
5	J.S.C.	1	2
6	D.D.S.	1	1,3
7	G.A.S.	1	2
8	S.C.S.	1	2
9	R.L.A.	1	2
10	R.A.R.	1	2,5
11	J.A.C.S.	2	2/1*
12	A.C.V.L.	1	3
13	L.S.F.	1	4
14	S.L.F.	3	3/2/1*
15	M.F.K.	2	2/1,5*
16	J.B.U.A.	1	4
17	I.P.S.	1	3
18	S.N.O.	1	2,5
19	R.P.B.C.	1	3
20	F.S.	2	2/3*
21	K.C.S.	1	3,5
22	D.P.O.	1	1,5
23	R.C.S.	1	2
24	J.S.S.	1	2
25	R.M.R.	1	3
26	S.M.S.	1	2
27	A.M.G.S.	2	2/4*
28	F.T.V.	2	3/2*

** Casos em que foram removidos por procedimento cirúrgico dois ou mais nódulos. Nestes casos, o primeiro nódulo apresentado indica a origem do fragmento utilizado nos experimentos.*

2 PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE

2.1 PROTEOGLICANOS PRESENTES NO FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE

Com o objetivo de investigar a presença de proteoglicanos e glicosaminoglicanos de fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente sob os efeitos hormonais durante o ciclo menstrual, iniciamos nosso trabalho extraindo e analisando as macromoléculas já presentes nestes tecidos.

Em apenas doze casos, os tumores tinham tamanho suficientemente grande para permitir a análise dos proteoglicanos e glicosaminoglicanos, sem marcação isotópica.

Pequenos fragmentos de fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente foram obtidos após procedimento cirúrgico como descrito em Métodos e, também como descrito em Métodos, os proteoglicanos foram extraídos dos tecidos pela ação de um agente caotrópico (hidrocloreto de guanidina). Para verificar a eficiência do processo de extração, os resíduos de tecidos foram digeridos com enzima proteolítica, que os dissolveu completamente (mas quebrou também os esqueletos protéicos dos proteoglicanos, de modo que apenas as cadeias de glicosaminoglicanos foram analisadas e quantificadas). As moléculas obtidas (proteoglicanos) foram ressuspensas em concentrações conhecidas (50 µg/µl) e analisadas por eletroforese em gel de agarose, tampão PDA. A Figura 20 mostra a migração eletroforética dos proteoglicanos (A) e dos glicosaminoglicanos extraídos dos tecidos residuais (B).

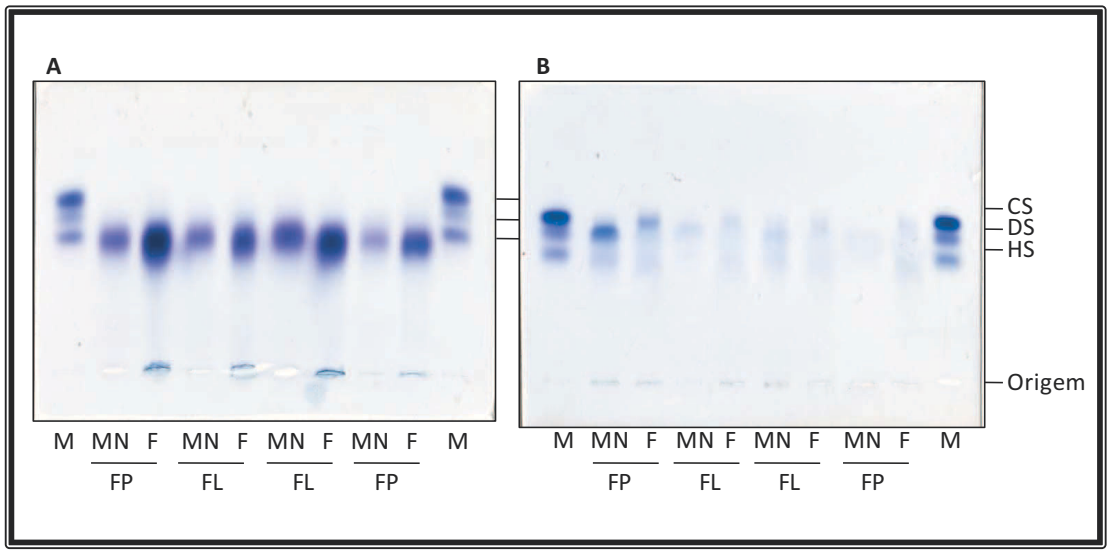


FIGURA 20: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS EXTRAÍDOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE. (A) Eletroforese dos proteoglicanos; (B) glicosaminoglicanos extraídos do tecido residual. Os proteoglicanos e glicosaminoglicanos foram extraídos como descrito em Métodos. Alíquotas (5 µl) foram submetidas à eletroforese em gel de agarose, fixadas com 0,1% CTV e coradas com azul de toluidina. M: mistura padrão de glicosaminoglicanos – CS: condroitim sulfato; DS: dermatam sulfato; HS: heparam sulfato; MN: tecido mamário normal; F: fibroadenoma; FP: fase proliferativa do ciclo menstrual; FL: fase lútea do ciclo menstrual.

Na Figura 20-A, observa-se a presença de proteoglicanos tanto no fibroadenoma quanto no tecido mamário normal adjacente, migrando como uma única banda, próxima ao heparam sulfato. A intensidade na coloração com azul de toluidina foi sempre maior nos tumores, indicando maiores quantidades de proteoglicanos em comparação com os tecidos normais adjacentes. Já a Figura 20-B mostra que pequenas quantidades de glicosaminoglicanos foram extraídas do tecido residual, o que indica que a eficiência na extração de proteoglicanos foi boa. Rendimentos foram sempre superiores a 90% para os dois tecidos (Tabela 8 e Figura 21). Os dados individuais são apresentados nas Tabelas 1 e 2 do Anexo.

TABELA 8 – VALORES MÉDIOS DO RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DE PROTEOGLICANOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL

EXTRAÇÃO DE PG (%)	TECIDO MAMÁRIO NORMAL		FIBROADENOMA	
	Fase Proliferativa	Fase Lútea	Fase Proliferativa	Fase Lútea
PG EXTRAÍDO	96	93	92	93
PG NÃO-EXTRAÍDO	4	7	8	7

PG não extraídos: glicosaminoglicanos do tecido residual.

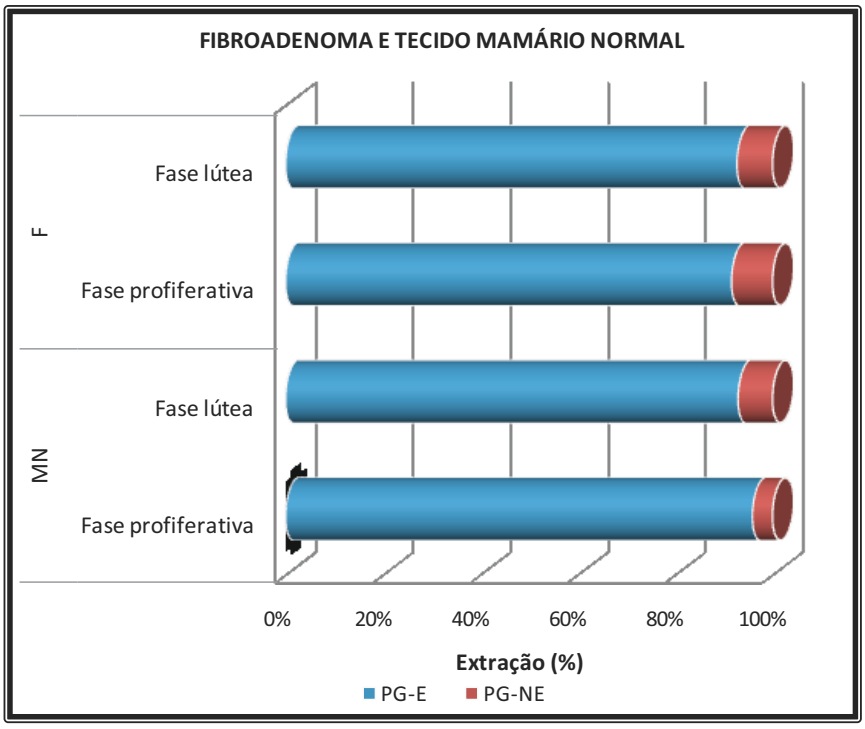


FIGURA 21: RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DE PROTEOGLICANOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. Os valores médios são expressos em %. MN: tecido mamário normal; F: fibroadenoma; PG-E: proteoglicanos extraídos; PG-NE: proteoglicanos não-extraídos (glicosaminoglicanos do tecido residual).

Estes compostos (proteoglicanos e glicosaminoglicanos) foram quantificados por densitometria das lâminas. Os resultados individuais são apresentados na Figura 22 e também nas Tabelas 3 e 4 do Anexo).

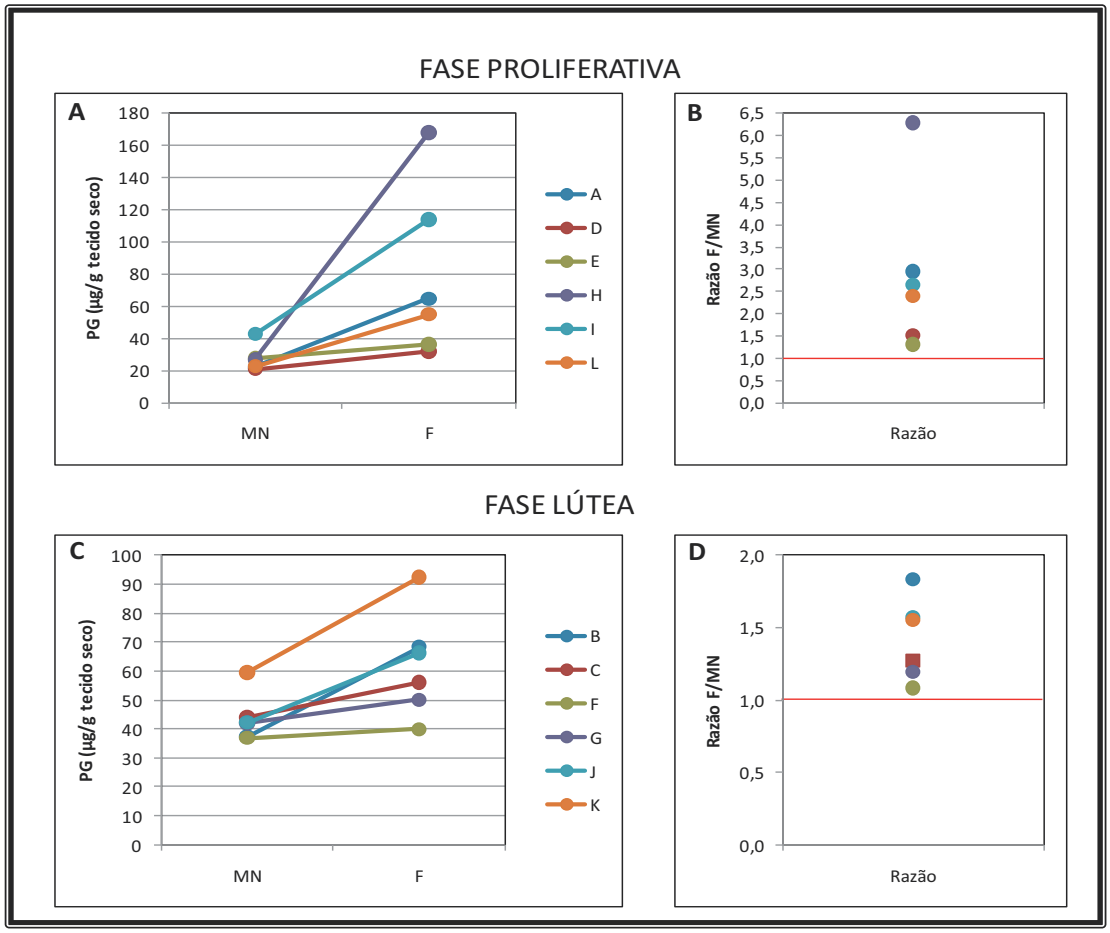


FIGURA 22: DADOS INDIVIDUAIS DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEOGLICANOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. (A) e (C) Dados individuais das concentrações de proteoglicanos de fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente são apresentados em µg/g de tecido seco; (B) e (D) Razão entre a concentração de proteoglicanos de fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente; PG: proteoglicanos; MN: tecido mamário normal; F: fibroadenoma.

A Figura 22-A e C apresentam os dados individuais obtidos dos fibroadenomas e respectivos tecidos mamários normais adjacentes. Os resultados mostram que em todos os casos, a concentração de proteoglicanos extraídos dos fibroadenomas foi sempre maior que as concentrações dos tecidos mamários normais, tanto na fase proliferativa quanto na fase lútea do ciclo menstrual. No entanto, houve uma

importante variação na razão da concentração destas moléculas entre tecido tumoral e respectivo tecido normal (Figura 22-B e D). Essas diferenças foram maiores na fase proliferativa. As concentrações de proteoglicanos no fibroadenoma foram, em média, 2,9 vezes maiores que a do tecido mamário normal adjacente. Já na fase lútea, essas diferenças foram menores, com valor médio de 1,4 vezes.

A Tabela 9 e Figura 23 mostram os valores médios das concentrações dos proteoglicanos e glicosaminoglicanos (resíduo) dos tecidos analisados (valores individuais nas tabelas 3 e 5 do Anexo).

TABELA 9 – CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS EXTRAÍDOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL

	TECIDO MAMÁRIO NORMAL		FIBROADENOMA	
	PG (µg/g tecido seco)	GAG (µg/g tecido seco)	PG (µg/g tecido seco)	GAG (µg/g tecido seco)
Fase proliferativa	27,2 ± 3,6	1,2 ± 0,3	78,4± 23,6	6,1 ± 2,1
Fase lútea	43,6 ± 3,7	3,2 ± 0,9	62,2 ± 8,1	5,5 ± 3,1

São apresentadas as médias ± erro padrão

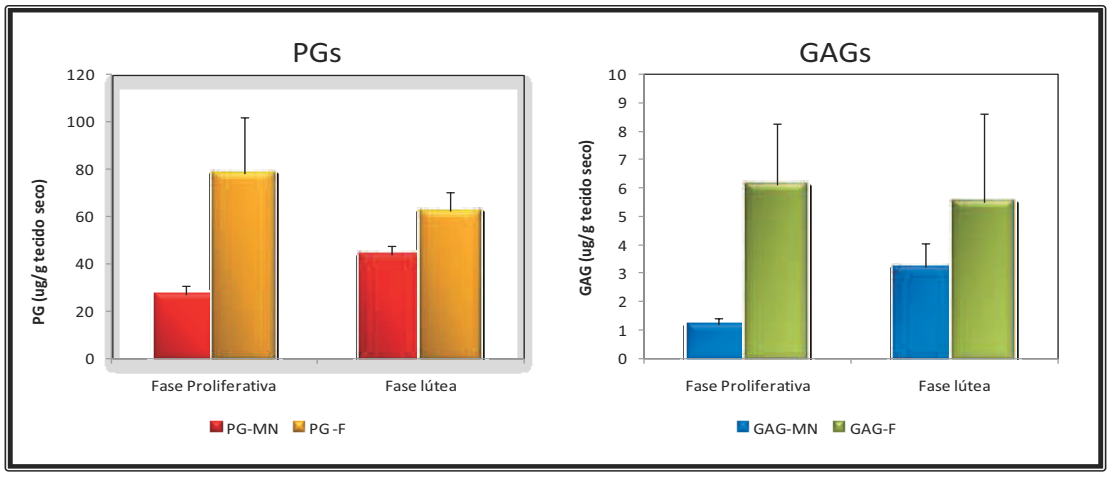


FIGURA 23: CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS EXTRAÍDOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. A barra de erro indica o erro padrão. PG: proteoglicanos; GAG: glicosaminoglicanos do tecido residual; MN: tecido mamário normal; F: fibroadenoma.

A análise estatística dos dados é apresentada na Figura 24. Os resultados mostram que as diferenças observadas entre tecido tumoral e normal são estatisticamente significantes nas duas fases do ciclo menstrual (P<0,05).

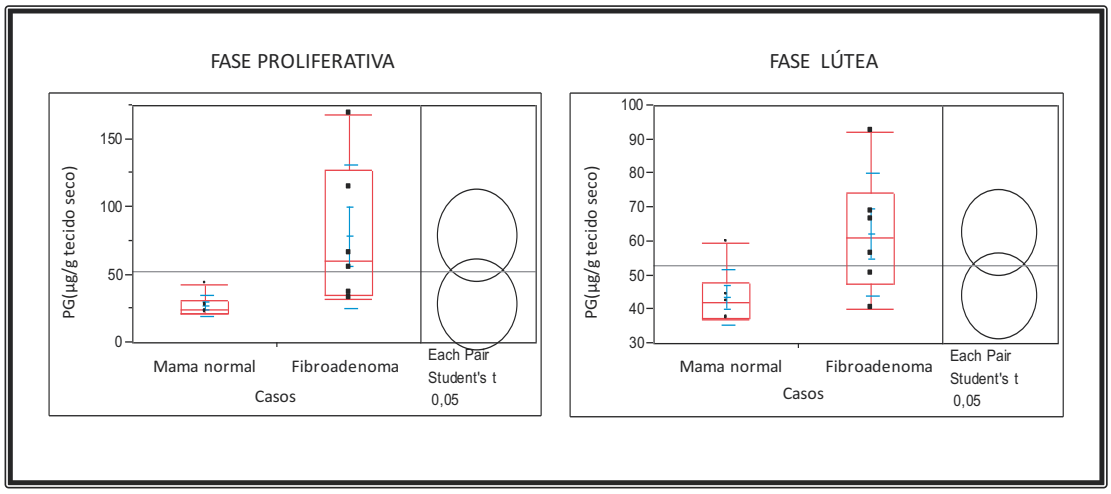


FIGURA 24: ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS CONCENTRAÇÕES DE PROTEOGLICANOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. O teste T de Student mostra que as diferenças nas concentrações de proteoglicanos de fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente são estatisticamente significantes nas duas fases do ciclo menstrual (P<0,05).

Os resultados obtidos quanto às diferenças entre a razão das concentrações de proteoglicanos de fibroadenoma e tecido mamário normal nas duas fases do ciclo menstrual são mais esclarecidos quando os tecidos são analisados individualmente. Os valores médios das concentrações de proteoglicanos de tecido mamário normal foram menores na fase proliferativa e maiores na fase lútea, enquanto que, no fibroadenoma resultados inversos foram obtidos – maior concentração na fase proliferativa e menor na fase lútea.

Com estes dados, cada um dos tecidos foi analisado ao longo do ciclo menstrual para verificar possíveis relações entre as oscilações hormonais e a síntese de proteoglicanos. Os dados das concentrações de proteoglicanos de fibroadenoma tecido e mamário normal adjacente obtidos de cada análise foram correlacionados com os dias do ciclo menstrual e são apresentados na Figura 25.

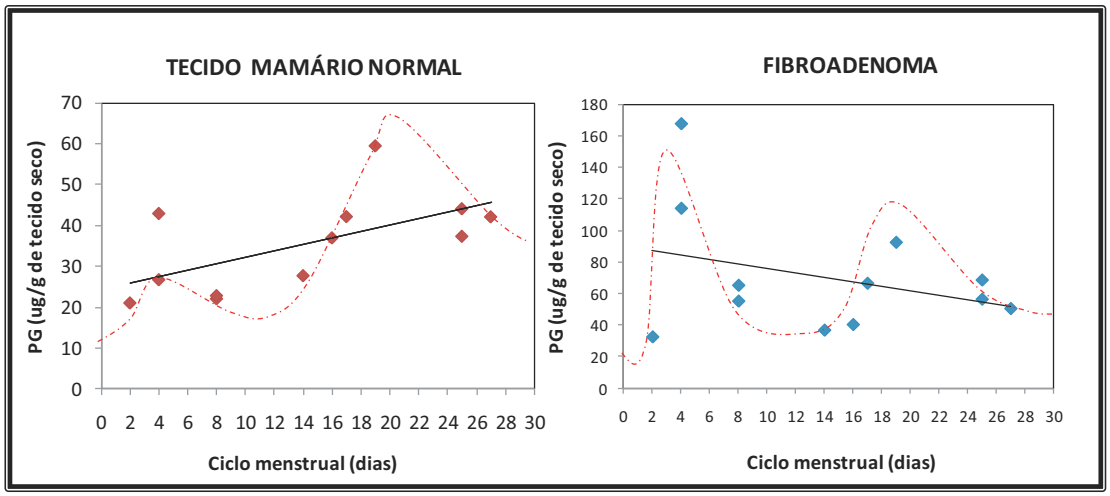


FIGURA 25: DADOS INDIVIDUAIS DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEOGLICANOS DE TECIDO MAMÁRIO NORMAL E FIBROADENOMA DURANTE O CICLO MENSTRUAL. A linha pontilha acompanha as oscilações nas concentrações de proteoglicanos ao longo do ciclo; PG: proteoglicanos.

Os resultados mostram que no tecido mamário normal ocorreu uma variação na síntese de proteoglicanos durante o ciclo menstrual, atingindo concentrações mais altas na fase lútea. Um discreto aumento inicial foi verificado durante a fase proliferativa, seguido de um ponto de inflexão por volta do décimo quarto dia, e subsequente aumento durante a fase lútea com aparente declínio no final do ciclo, sugerindo que a síntese destas moléculas sofre influência hormonal. Em contrapartida, não foram observadas as mesmas correlações para o fibroadenoma nas duas fases do ciclo. No entanto, houve uma tendência ao declínio nas concentrações dos proteoglicanos no final do ciclo menstrual.

A análise estatística mostrou que as diferenças observadas entre as concentrações de proteoglicanos do tecido mamário normal na fase proliferativa e fase lútea são estatisticamente significantes ($P<0,01$). Já no fibroadenoma, apesar dos valores médios das concentrações de proteoglicanos (Figura 23 e Tabela 7) apresentarem uma tendência a queda na fase lútea, essas diferenças não são estatisticamente significantes (Figura 26).

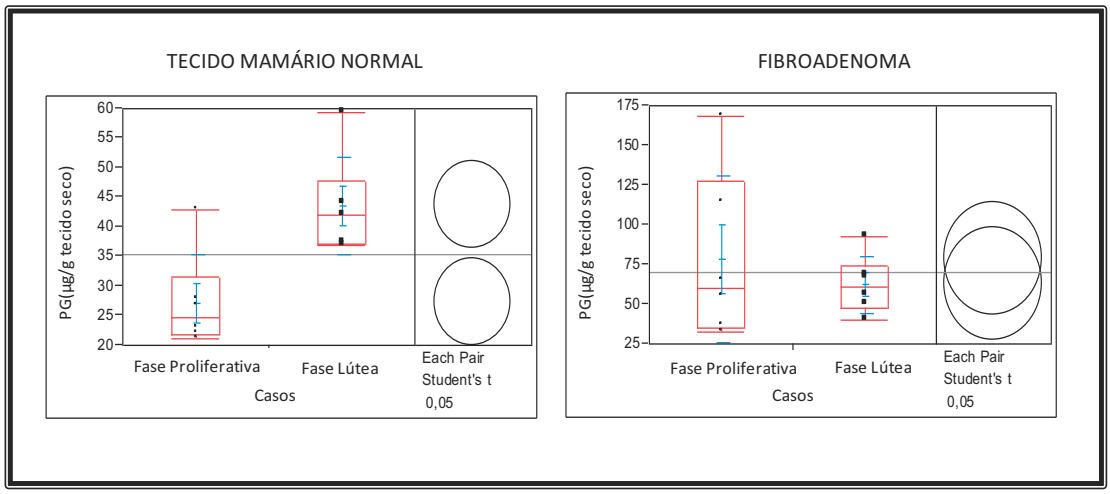


FIGURA 26: ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS CONCENTRAÇÕES DE PROTEOGLICANOS NO TECIDO MAMÁRIO NORMAL E FIBROADENOMA DURANTE O CICLO MENSTRUAL. O teste T de Student mostra significância nas diferenças entre as concentrações de proteoglicanos do tecido mamário normal nas fases proliferativa e lútea ($p<0,01$), o que não ocorreu para as concentrações de proteoglicanos nos fibroadenomas.

2.2 GLICOSAMINOGLICANOS PRESENTES EM FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL

Na etapa seguinte, as cadeias de glicosaminoglicanos presentes nos tecidos foram analisadas. Os proteoglicanos extraídos inicialmente de fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente foram submetidos à ação de enzima proteolítica. Os polissacarídeos sulfatados liberados dos esqueletos protéicos foram analisados por uma combinação de eletroforese em gel de agarose e degradação enzimática com glicosaminoglicano liases específicas. A migração eletroforética dos glicosaminoglicanos é apresentada na Figura 27.

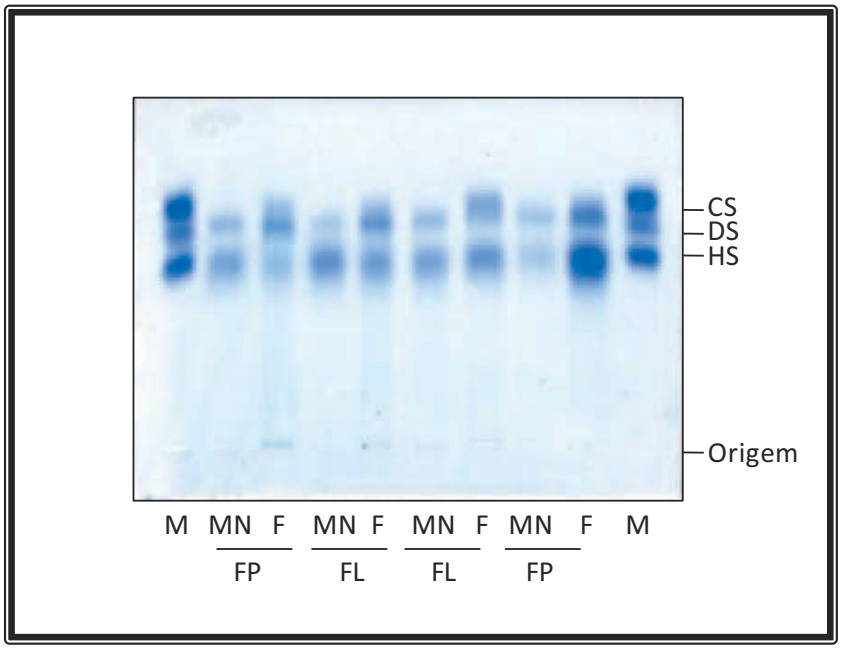


FIGURA 27: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE EM TAMPÃO PDA DOS GLICOSAMINOGLICANOS LIBERADOS POR PROTEÓLISE DOS PROTEOGLICANOS EXTRAÍDOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. Os proteoglicanos extraídos destes tecidos foram incubados com enzima proteolítica para degradação dos esqueletos protéicos e liberação de cadeias de glicosaminoglicanos. Alíquotas dessas misturas de incubação foram submetidas à eletroforese em gel de agarose, posteriormente fixadas no gel com 0,1% CTV e coradas com azul de toluidina. M: mistura padrão de glicosaminoglicanos contendo condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e heparam sulfato (HS); MN: tecido mamário normal; F: fibroadenoma; FP: fase proliferativa do ciclo menstrual; FL: fase lútea do ciclo menstrual.

No tecido mamário normal foram identificadas duas bandas eletroforéticas. A primeira migrou como dermatam sulfato, e a segunda como heparam sulfato. Os mesmos glicosaminoglicanos foram identificados no fibroadenoma, porém, a banda que migrou como dermatam sulfato foi mais polidispersa e com maior migração, sugerindo mudança na estrutura desse polímero. Degradações com enzimas específicas foram realizadas como descrito em Métodos, e comprovaram a identificação desses glicosaminoglicanos (Figura 28).

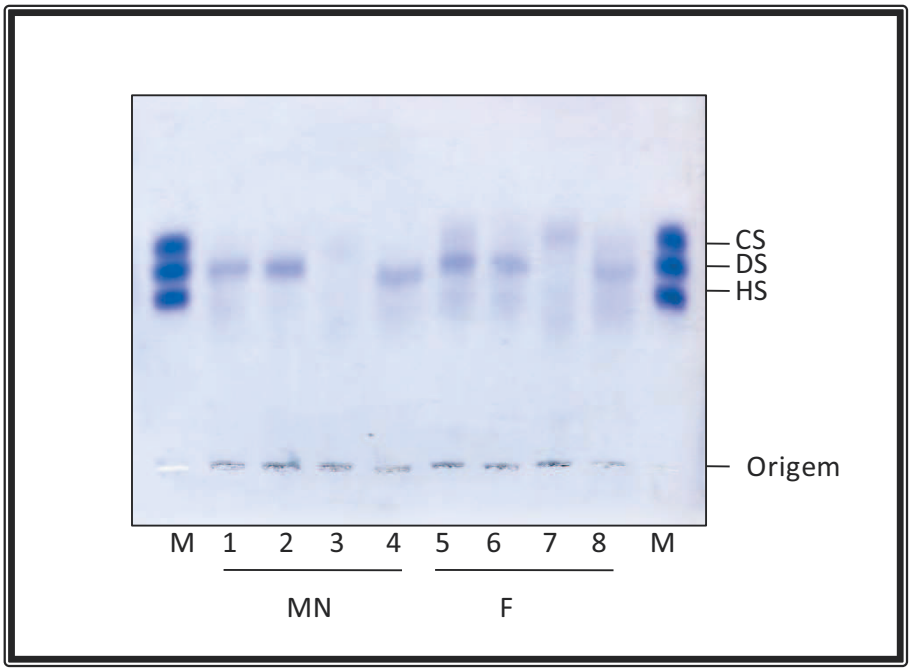


FIGURA 28: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE EM TAMPÃO PDA DOS GLICOSAMINOGLICANOS LIBERADOS POR PROTEÓLISE DOS PROTEOGLICANOS EXTRAÍDOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE APÓS DEGRADAÇÃO COM GLICOSAMINOGLICANO LIASES ESPECÍFICAS. Alíquotas dos glicosaminoglicanos (10µl) foram incubadas com 10 a 30µl de cada enzima por 6 horas em suas respectivas temperaturas ótimas de ação. Em seguida, as misturas foram secas a vácuo, ressuspensas em 5 µl de água e submetidas à eletroforese. M: mistura padrão de glicosaminoglicanos contendo condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e heparam sulfato (HS); MN-(1-4): (1) GAGs; (2) GAGs incubados com condroitinase AC; (3) GAGs incubados com condroitinase B; (4) GAGs incubados heparitinase II; F-(5-8): (5) GAGs; (6) GAGs incubados com condroitinase AC; (7) GAGs incubados com condroitinase B; (8) GAGs incubados com heparitinase II. MN: tecido mamário normal; F: fibroadenoma.

No tecido mamário normal, foi observada a ação de condroitinase B sobre o dermatam sulfato e heparitinase II sobre o heparam sulfato, resultando na degradação completa dos compostos e, portanto, a ausência na eletroforese. Quanto aos glicosaminoglicanos obtidos de fibroadenoma, foi constatada a ação de todas as enzimas. Após a ação da condroitinase AC, a banda de dermatam sulfato ficou mais definida, embora menos intensa (lembrando que esta enzima quebra especificamente ligações β-glicosídicas entre N-acetilgalactosamina ou N-acetilglucosamina e ácido β-D-glucurônico). Esta banda desapareceu após a ação de condroitinase B e passou a migrar como condroitim sulfato. A condroitinase B

quebra exclusivamente as ligações β,1-4 entre os resíduos de *N*-acetilgalactosamina e ácido α-L-idurônico, produzindo fragmentos que não são fixados no gel. Ela não age sobre condroitim sulfato, já que este não tem ácido α-L-idurônico. Isto sugere a existência de um polímero híbrido de dermatam sulfato, contendo ácido α-L-idurônico e ácido β-D-glucurônico.

O heparam sulfato foi digerido pela ação da heparitinase II.

Cada um dos glicosaminoglicanos foi analisado, comparando inicialmente as diferenças entre tumor e tecido normal e em seguida cada tecido ao longo do ciclo menstrual.

Como visto anteriormente na Figura 27, cada tecido apresentou uma composição característica de glicosaminoglicanos. Os dados quantitativos de dermatam sulfato (rico em ácido β-D-glucurônico e rico em ácido α-L-idurônico) e heparam sulfato presentes no fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente são apresentadas na Figura 29. Os valores individuais são apresentados nas Tabelas 6, 7 e 9 do Anexo.

Os resultados mostram que, nas duas fases do ciclo, a concentração de cada glicosaminoglicano foi superior no fibroadenoma e que, as diferenças entre tumor e tecido normal foram novamente superiores na fase proliferativa.

O dermatam sulfato do fibroadenoma é mais rico em ácido β-D-glucurônico. Dermatam sulfato e heparam sulfato apresentaram concentrações médias superiores no tecido tumoral (cerca de 3 e 2,5 vezes, respectivamente) às concentrações do tecido mamário normal na fase proliferativa. Na fase lútea, essas diferenças foram menores tanto para dermatam sulfato (valor médio de 2 vezes) quanto para heparam sulfato (valor médio de 1,1 vezes). Dados individuais são apresentados na Tabela 8 e 10 do Anexo.

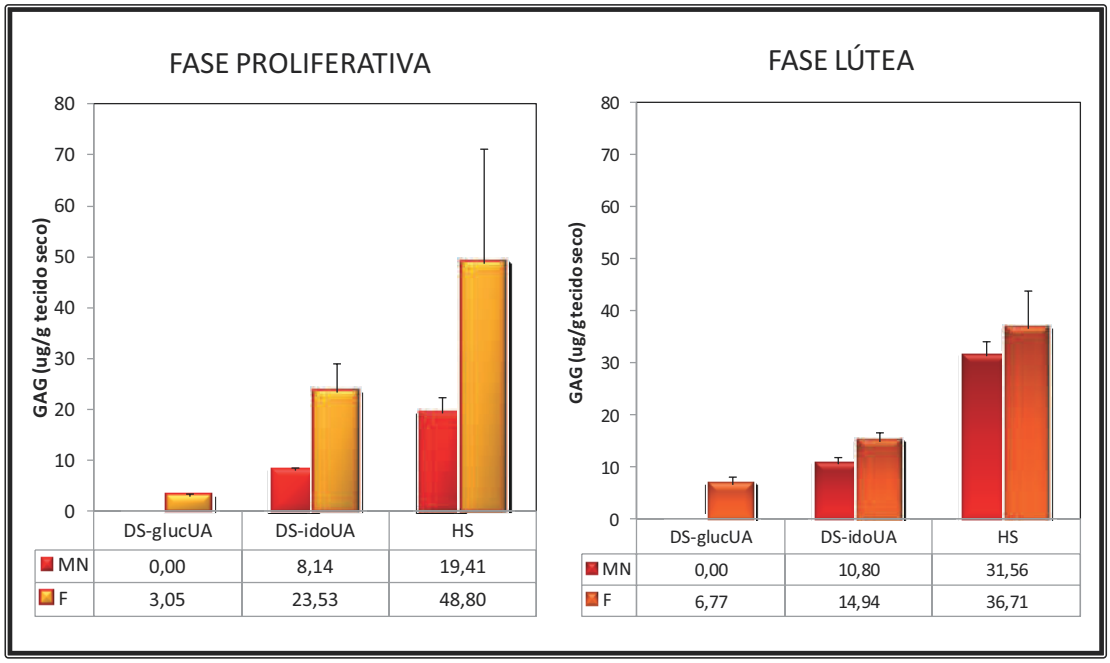


FIGURA 29: CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE DERMATAM SULFATO (RICO EM ÁCIDO β-D-GLUCURÔNICO E ÁCIDO α-L-IDURÔNICO) E HEPARAM SULFATO OBTIDO POR PROTEÓLISE DOS PROTEOGLICANOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE. A concentração de cada glicosaminoglicano é expressa em µg/g de tecido seco. A barra de erro indica o erro padrão; MN: tecido mamário normal; F: fibroadenoma; GAG: glicosaminoglicanos; DS-glucUA: dermatam sulfato de maior migração eletroforética, rico em ácido β-D-glucurônico; DS-idoUA: dermatam sulfato de menor migração eletroforética, rico em ácido α-L-idurônico; HS: heparam sulfato.

As diferenças obtidas entre tumor e tecido normal na fase proliferativa são estatisticamente significantes para dermatam sulfato rico em ácido β-D-glucurônico ($P<0,01$) e dermatam sulfato rico em ácido α-L-idurônico ($P<0,05$). Já na fase lútea, somente para dermatam sulfato rico em ácido β-D-glucurônico ($P<0,05$) (Figura 30).

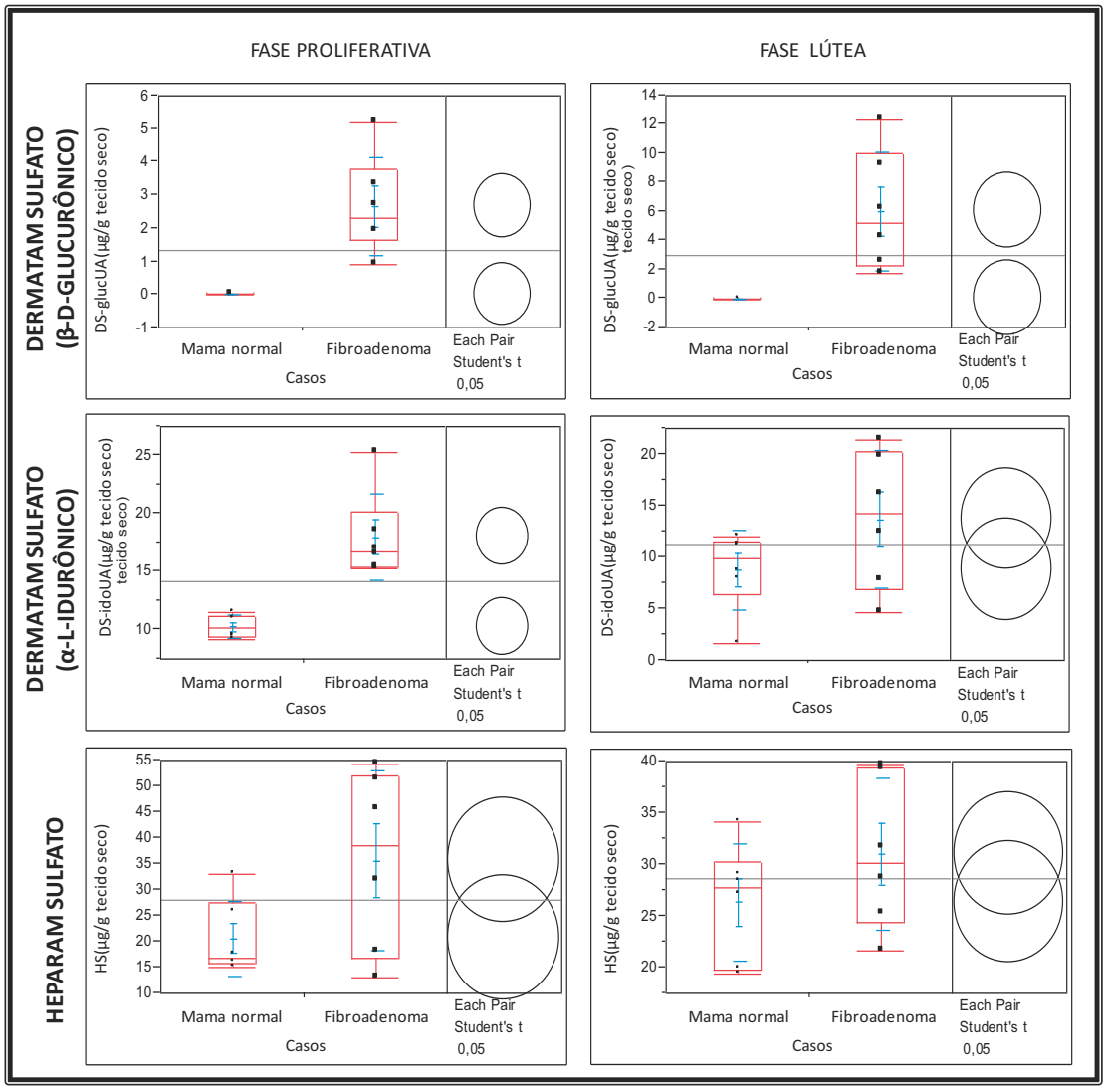


FIGURA 30: ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS CONCENTRAÇÕES DE DERMATAM SULFATO (RICO EM ÁCIDO β-D-GLUCURÔNICO E ÁCIDO α-L-IDURÔNICO) E HEPARAM SULFATO DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. O teste T de Student mostra significância nas diferenças entre as concentrações de dermatam sulfato (rico em β-D-glucurônico) de fibroadenoma e tecido mamário normal nas fases proliferativa e lútea ($P<0,01$) e para dermatam sulfato (rico em α-L-idurônico) somente na fase proliferativa ($P<0,01$). Nas demais analises não há diferenças estatisticamente significantes.

A seguir, com o objetivo de analisar o perfil de cada glicosaminoglicano do fibroadenoma e do tecido mamário normal ao longo do ciclo menstrual para verificar as alterações em função das variações hormonais, os dados individuais foram correlacionados em função dos dias do ciclo de cada paciente (Figura 31).

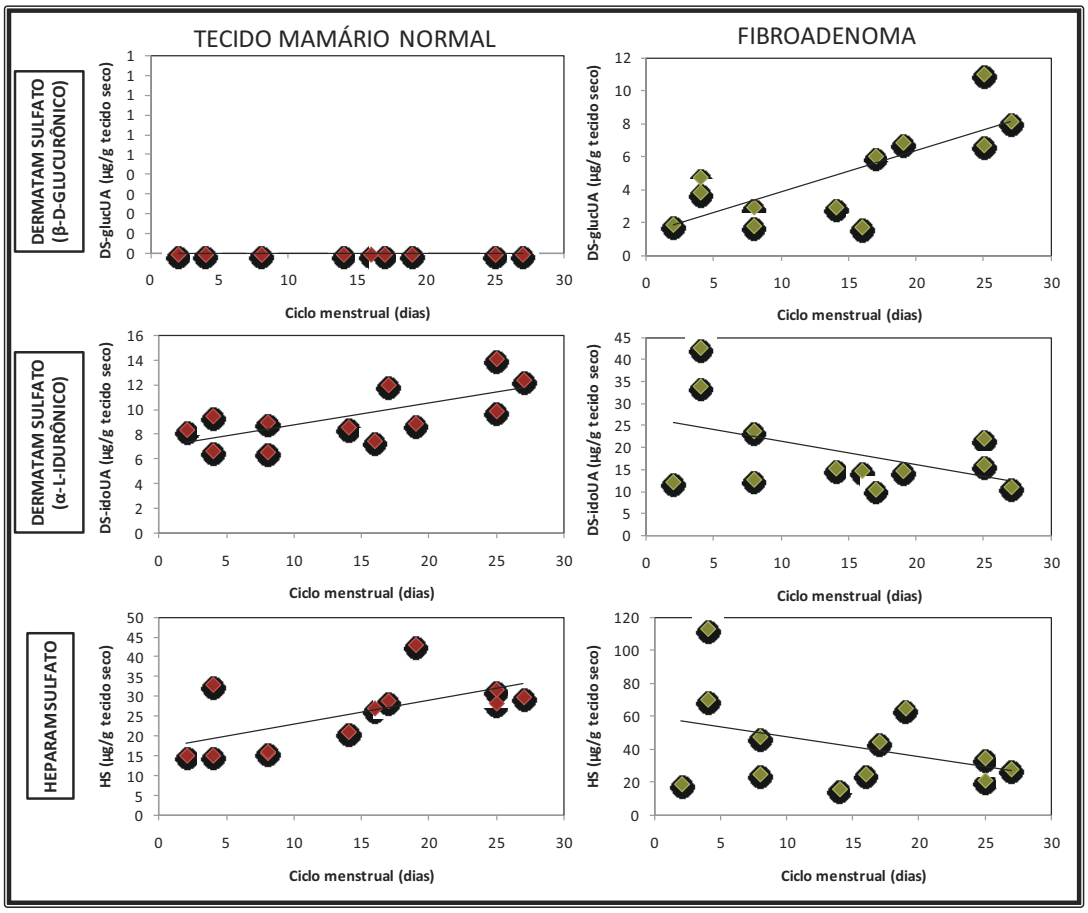


FIGURA 31: DADOS INDIVIDUAIS DA CONCENTRAÇÃO DE DERMATAM SULFATO (RICO EM ÁCIDO β-D-GLUCURÔNICO E ÁCIDO α-L-IDURÔNICO) E HEPARAM SULFATO NO TECIDO MAMÁRIO NORMAL E FIBROADENOMA DURANTE O CICLO MENSTRUAL. DS-glucUA: dermatam sulfato de maior migração eletroforética, rico em ácido β-D-glucurônico; DS-idoUA: dermatam sulfato de menor migração eletroforética, rico em ácido α-L-idurônico; HS: heparam sulfato.

A tendência ao aumento nas concentrações das macromoléculas vista na Figura 25 no tecido mamário normal ocorreram principalmente pelo aumento nas concentrações de heparam sulfato ao longo do ciclo menstrual (proteoglicanos de heparam sulfato), embora as concentrações de dermatam sulfato (rico em ácido α-L-idurônico) também tenham aumentado. Em contrapartida, as oscilações observadas nas concentrações totais de glicosaminoglicanos no fibroadenoma ao longo do ciclo com uma discreta tendência a queda, ocorreu devido, principalmente, ao declínio nos valores de heparam sulfato. Embora um aumento importante nas concentrações de dermatam sulfato rico em ácido β-D-glucurônico ao longo do ciclo menstrual tenha sido observado (cerca de 2 vezes mais na fase lútea), a diminuição de

dermatam sulfato rico em ácido α-L-idurônico foi maior, levando uma discreta diminuição das concentrações do galactosaminoglicano na segunda fase (Tabela 11 do Anexo).

A Figura 32 mostra que no tecido mamário normal, as diferenças foram estatisticamente significantes para o dermatam sulfato (P<0,05) e heparam sulfato (P<0,01). Já no fibroadenoma, somente para dermatam sulfato rico em ácido β-D-glucurônico (P<0,05).

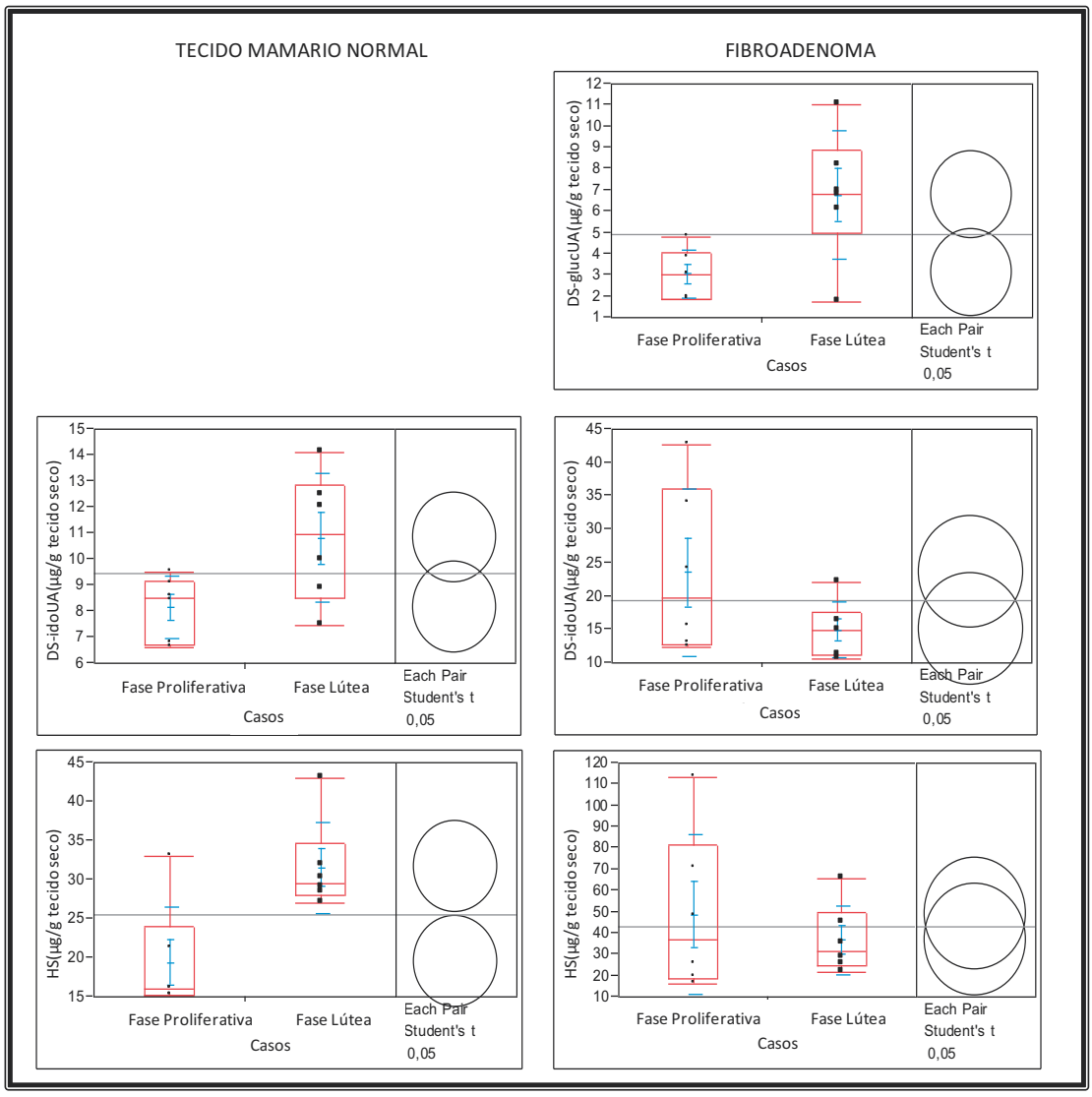


FIGURA 32: ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS CONCENTRAÇÕES DE DERMATAM SULFATO (RICO EM ÁCIDO β-D-GLUCURÔNICO E ÁCIDO α-L-IDURÔNICO) E HEPARAM SULFATO DE TECIDO MAMÁRIO NORMAL E FIBROADENOMA DURANTE O CICLO MENSTRUAL. O teste T de Student mostra que há significância estatística para dermatam sulfato (P<0,05) e heparam sulfato (P<0,01) no tecido mamário normal durante o ciclo menstrual. Já no fibroadenoma, somente para dermatam sulfato rico em ácido β-D-glucurônico (P<0,05).

A Figura 33 mostra que as proporções entre dermatam sulfato e heparam sulfato são diferente nas duas fases do ciclo para o tecido mamário normal, mas quase não se altera no fibroadenoma (dados individuais nas Tabelas 12 e 15 do Anexo).

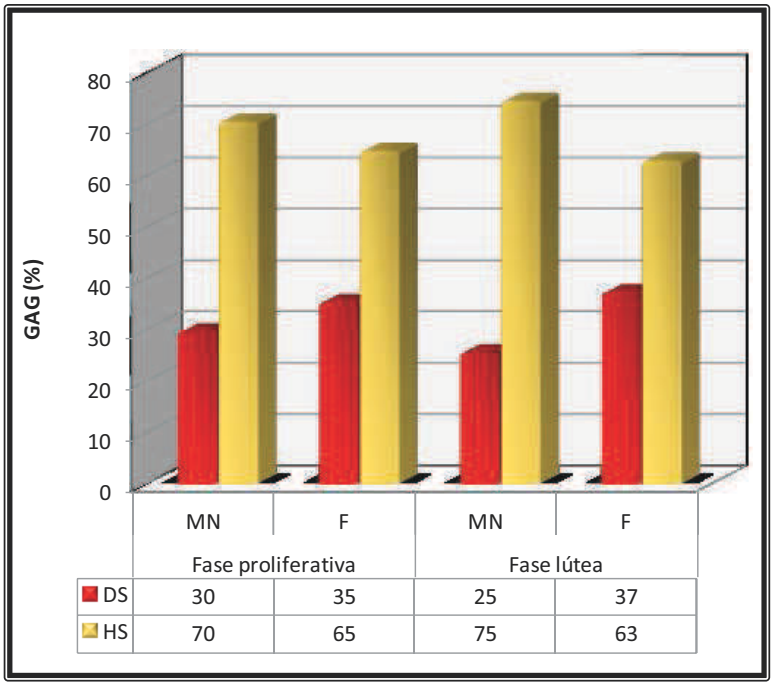


FIGURA 33: PROPORÇÃO DO DERMATAM SULFATO E HEPARAM SULFATO DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. As concentrações de dermatam sulfato (DS) e heparam sulfato (HS) são expressas em porcentagem (%). MN: tecido mamário normal; F: fibroadenoma; GAG: glicosaminoglicanos.

No tecido mamário normal, com o aumento das concentrações de heparam sulfato que ocorreu ao longo do ciclo, a proporção deste glicosaminoglicano cresceu 70% na fase proliferativa para 75% na fase lútea. Portanto, embora também tenha ocorrido um aumento nas concentrações de dermatam sulfato, sua proporção caiu de 30% na fase proliferativa para 25%.

Já no tecido tumoral, heparam sulfato apresentou uma pequena diminuição relativa (65% para 63%) e o dermatam sulfato um discreto aumento (35% para 37%) ao longo do ciclo menstrual.

A análise do dermatam sulfato no fibroadenoma mostrou um aumento na porcentagem de cadeias mais ricas em ácido β-D-glucurônico da fase proliferativa para a fase lútea (4% para 12%). Este aumento se deu às custas das cadeias mais ricas em ácido α-L-idurônico cuja a proporção caiu de 31% para 26% da primeira fase para a segunda fase do ciclo, sugerindo menor grau de epimerização (Figura 34).

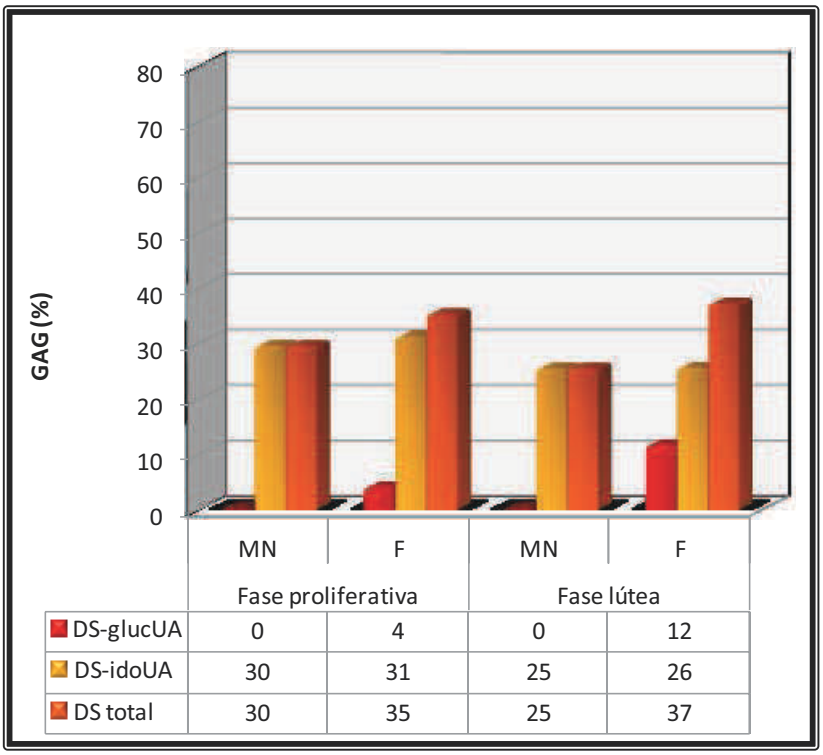


FIGURA 34: PROPORÇÃO DE DERMATAM SULFATO (RICO EM ÁCIDO β-D-GLUCURÔNICO E RICO EM ÁCIDO α-L-IDURÔNICO) DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. As concentrações de dermatam sulfato com maior migração rico em ácido β-D-glucurônico (DS-glucUA), dermatam sulfato com menor migração rico em ácido α-L-idurônico (DS-idoUA) e dermatam sulfato total (DS total) são expressas em porcentagem (%). MN: tecido mamário normal; F: fibroadenoma; GAG: glicosaminoglicanos.

2.3 ESTRUTURA DOS GLICOSAMINOGLICANOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE

A seguir, com o objetivo de estudar a composição destes glicosaminoglicanos quanto às unidades dissacarídicas presentes, os proteoglicanos extraídos individualmente foram agrupados de acordo com tipo de tecido e período do ciclo menstrual, formando quatro grupos distintos, devido à pequena quantidade de material individual para esta análise. Estes *pools* foram submetidos inicialmente à eletroforese em gel de agarose e posteriormente à proteólise para liberação das cadeias de glicosaminoglicanos. A Figura 35 mostra o perfil eletroforético dos proteoglicanos e glicosaminoglicanos.

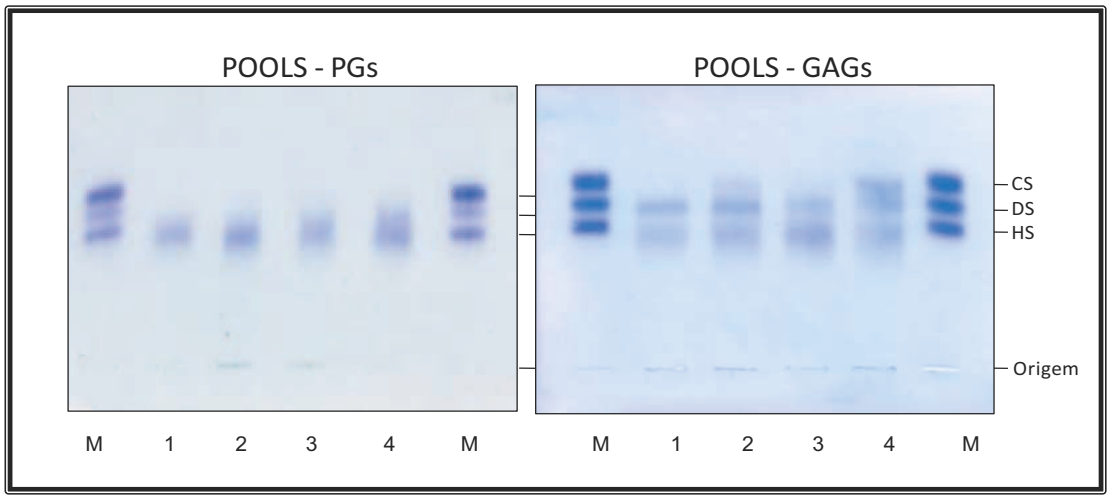


FIGURA 35: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE EM TAMPÃO PDA DE PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS PRESENTES NOS *POOLS* DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MESNTRUAL. Os proteoglicanos extraídos foram agrupados de acordo com o tecido e fase do ciclo menstrual: (1) *pool* de proteoglicanos de tecido mamário normal na fase proliferativa; (2) *pool* de proteoglicanos de fibroadenoma na fase proliferativa; (3) *pool* de proteoglicanos de tecido mamário normal na fase lútea; (4) *pool* de proteoglicanos de fibroadenoma na fase lútea. M: mistura padrão de glicosaminoglicanos – CS: condroitim sulfato; DS: dermatam sulfato; HS: heparam sulfato; PGs: proteoglicanos; GAGs: glicosaminoglicanos.

A partir destes resultados, alíquotas dos *pools* após a proteólise foram submetidas à degradação enzimática com glicosaminoglicano liases específicas e submetidas à cromatografia em papel como descrito em Métodos. Os produtos insaturados foram localizados no papel com uma lâmpada de UV manual e

revelados com nitrato de prata em meio alcalino. A Figura 36 mostra o cromatograma dos produtos de degradação.

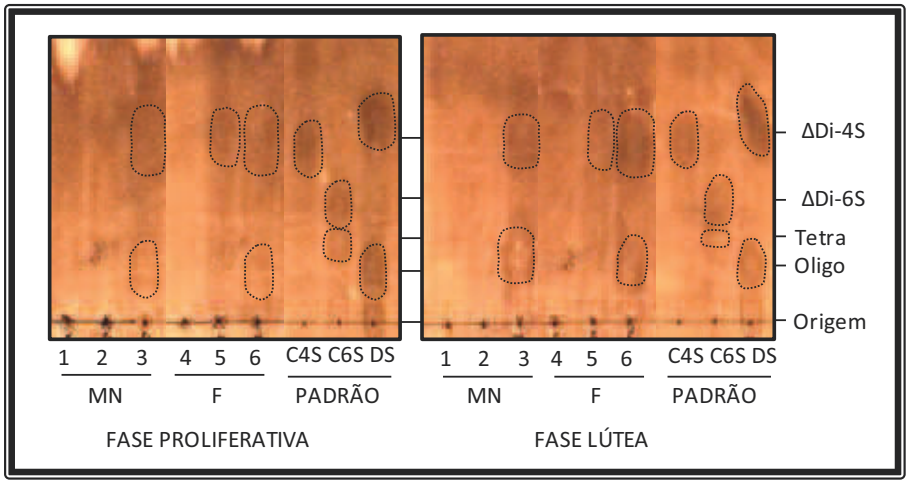


FIGURA 36: CROMATOGRAFIA DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO DERMATAM SULFATO DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. Os proteoglicanos extraídos e agrupados de acordo com o tecido e fase do ciclo menstrual (*pools*) foram submetidos às degradações com glicosaminoglicano liases específicas por 18 horas em suas respectivas temperaturas ótimas de atividade e submetidas à cromatografia descendente em papel conforme descrito em Métodos. (1) MN; (2) MN + condroitinase AC (10μl); (3) MN + condroitinase B (10μl); (4) F; (5): F+ condroitinase AC (10μl); (6) F+ condroitinase B (10μl). C4S: condroitim 4-sulfato; C6S: condroitim 6-sulfato; DS: dermatam sulfato; Oligo: oligossacarídeos; Tetra: tetrasacarídeos; ΔDi-4S: dissacarídeo insaturado 4-sulfatado; ΔDi-6S: dissacarídeo insaturado 6-sulfatado.

No tecido mamário normal obtido nas duas fases do ciclo menstrual, apenas produtos de degradação a partir da ação de condroitinase B foram obtidos, com a formação de ΔDi-4S (ácido α-L-idurônico). ΔDi-6S contendo ácido α-L-idurônico não foi identificado. Já no fibroadenoma, observou-se a ação das duas enzimas. Porém, maior quantidade de produtos de degradação ocorreu a partir da atividade de condroitinase B, formando ΔDi-4S (ácido α-L-idurônico) e menores quantidades pela ação de condroitinase AC, formando ΔDi-4S (ácido β-D-glucurônico). Devido à pequena quantidade de material disponível, não foi possível analisar a estrutura do heparam sulfato.

2.4 PROTEOGLICANOS DE MATRIZ – DECORIM E VERSICAM – EM FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL

Os proteoglicanos extraídos de fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente foram submetidos à técnica de *immunoblotting* para identificação de alguns proteoglicanos de matriz: decorim e versicam. Alíquotas destes tecidos foram submetidas à eletroforese em gel de agarose e transferidas para membranas de nitrocelulose. Conforme descrito em Métodos, os proteoglicanos que ficaram retidos na membrana hidrofóbica de nitrocelulose foram detectados com anticorpos específicos (anticorpo monoclonal anti-decorim e anticorpo monoclonal anti-proteoglicano humano de alto peso molecular – versicam). A Figura 37 mostra os resultados.

A reação dos anticorpos com os esqueletos protéicos dos respectivos proteoglicanos foi realizada por dois métodos como descrito em Métodos, com graus de sensibilidade diferentes: (1) DAB – diaminobenzaldeído (menor sensibilidade) e (2) quimioluminescência – kit Supersignal (mais sensível).

Decorim foi identificado tanto no fibroadenoma quanto no tecido mamário normal nas duas fases do ciclo pela reação positiva do anticorpo anti-decorim com o esqueleto protéico do proteoglicano pelos dois Métodos. Já versicam, foi detectado somente no fibroadenoma pela quimioluminescência, também nas fases proliferativa e lútea.

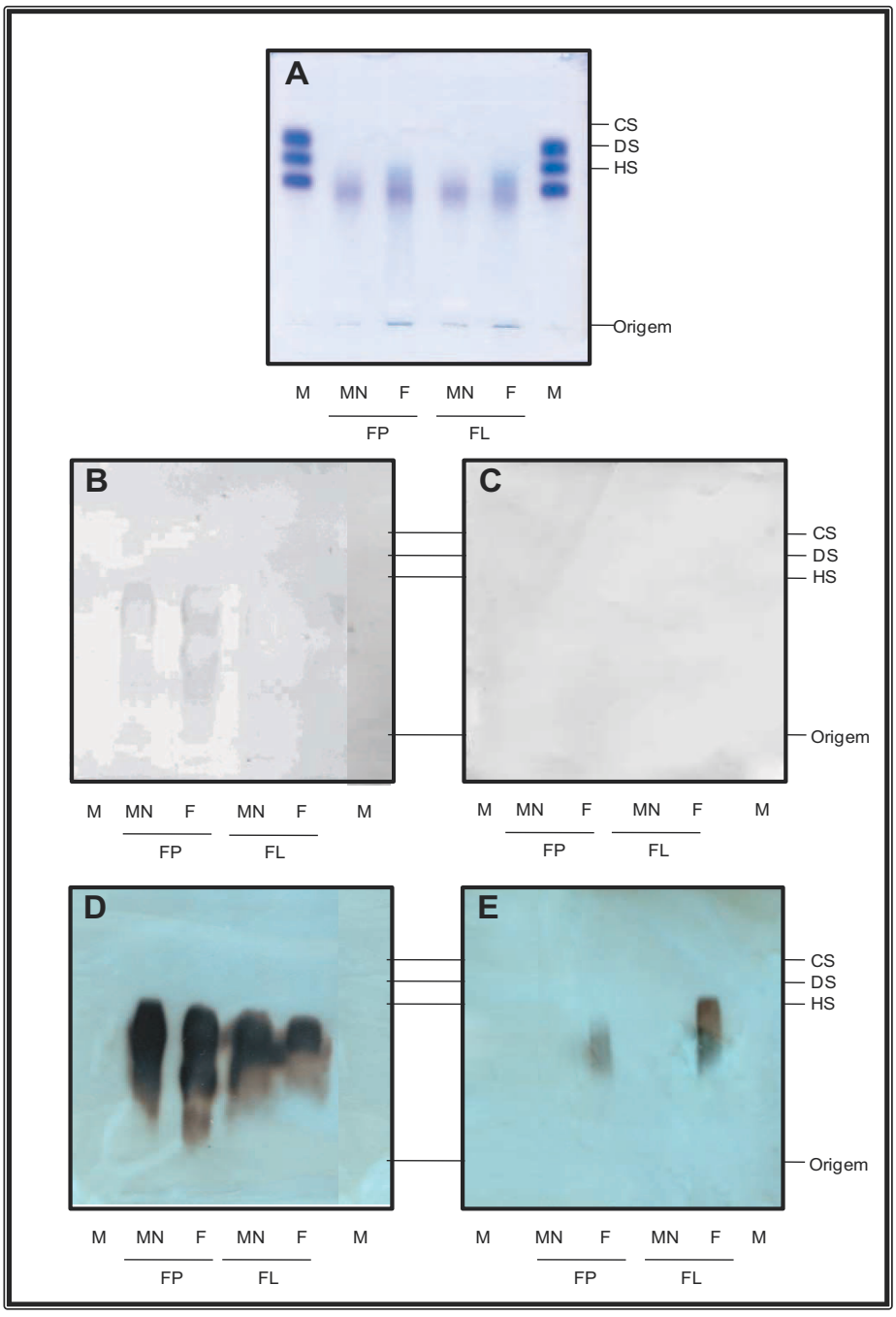


FIGURA 37: *IMMUNOBLOTTING* DE PROTEOGLICANOS – DECORIM E VERSICAM – DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. (A) Eletroforese em gel de agarose em tampão PDA dos proteoglicanos extraídos de fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente na fase proliferativa e fase lútea do ciclo menstrual; (B) *Immunoblotting* para identificação de decorim revelado com DAB e (D) revelado por quimioluminescência; (C) *Immunoblotting* para identificação de versicam revelado com DAB e (E) revelado por quimioluminescência. M: mistura padrão de glicosaminoglicanos – CS: condroitim sulfato; DS: dermatam sulfato; HS: heparam sulfato; MN: tecido mamário normal; F: fibroadenoma; FP: fase proliferativa do ciclo menstrual; FL: fase lútea do ciclo menstrual.

3 MARCAÇÃO METABÓLICA DE PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL

3.1. SÍNTESE DE PROTEOGLICANOS NO FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE

Como visto até o momento, em apenas 12 dos 28 casos aqui analisados houve quantidade suficiente de material para identificação dos proteoglicanos. Nos demais 16 casos, a quantidade de material disponível impossibilitou a análise. Assim, para estudar as variações quantitativas durante o ciclo menstrual, a estrutura destas macromoléculas e a velocidade de síntese, realizamos a marcação metabólica de proteoglicanos com ^{35}S-sulfato. Marcação metabólica foi realizada em 25 dos 28 casos aqui estudados.

Como descrito em Métodos, pequenos fragmentos de fibroadenoma e do tecido mamário normal adjacente, obtidos após procedimento cirúrgico de vinte e cinco pacientes (quartoze casos obtidos na fase proliferativa e onze casos obtidos na fase lútea) foram colocados em meio de cultura contendo ^{35}S-sulfato para a marcação metabólica de proteoglicanos, por 24 horas. Em seguida, os mesmos procedimentos realizados anteriormente para extração de proteoglicanos e glicosaminoglicanos totais foram efetuados. As moléculas extraídas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose, e a radioatividade foi detectada pela exposição do gel a uma tela (filme) sensível, analisada após 24 horas de exposição no sistema *Packard Cyclone Phosphor Image* para obtenção da imagem digital. A Figura 38 exemplifica a migração eletroforética (A) e o radioautograma (B) dos compostos extraídos.

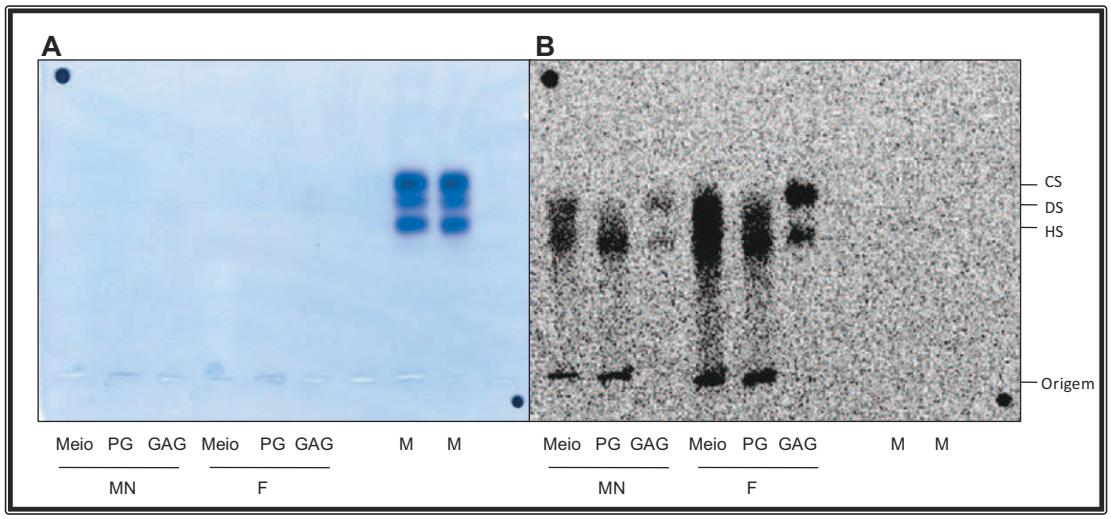


FIGURA 38: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE E RADIOAUTOGRAMA DOS ^{35}S-PROTEOGLICANOS E ^{35}S-GLICOSAMINOGLICANOS EXTRAÍDOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE. Alíquotas (5µl) de ^{35}S-proteoglicanos/^{35}S-glicosaminoglicanos obtidos do meio de cultura e extraídos dos fragmentos teciduais de fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente foram submetidas à eletroforese em gel de agarose, tampão PDA e coradas com azul de toluidina (A), após fixação dos ^{35}S-proteoglicanos /^{35}S-glicosaminoglicanos no gel com 0,1% CTV como descrito em Métodos e a radioatividade foi detectada pela exposição do gel a uma tela (filme) sensível, analisada após 24 horas de exposição no sistema *Packard Cyclone Phosphor Image* para obtenção da imagem digital. (O caso de número 10 foi apresentado nesta figura). MN: tecido mamário normal; F: fibroadenoma; Meio: meio de cultura F12 contendo ^{35}S-PG/^{35}S-GAGs; PG: ^{35}S-proteoglicanos; GAG: ^{35}S-glicosaminoglicanos; M: mistura padrão de glicosaminoglicanos – CS: condroitim sulfato; DS: dermatam sulfato; HS: heparam sulfato.

A Figura 38-A mostra que, como esperado, a qualidade de proteoglicanos e glicosaminoglicanos totais extraídos dos tecidos e do meio de cultura ficou abaixo do nível de detecção da coloração com azul de toluidina. Já a Figura 38-B mostra que ^{35}S-proteoglicanos/^{35}S-glicosaminoglicanos foram sintetizados e marcados nas condições de cultura de tecidos, tanto no fibroadenoma (F) quanto no tecido mamário normal (MN) em 24 horas.

Parte destes compostos radioativos foi extraída do meio de cultura (Meio). Duas bandas eletroforéticas foram identificadas em ambos os tecidos. A menor quantidade de moléculas marcadas no tecido mamário normal permitiu melhor visualização. Uma banda apresentou migração de dermatam sulfato, e a outra banda migrou na mesma região (ou um pouco mais lenta) que o heparam sulfato.

Devido à dificuldade de separação destas bandas em alguns casos, elas foram quantificadas em conjunto.

Outra parte das moléculas marcadas foi extraída dos tecidos na forma de ^{35}S-proteoglicanos (PG na Figura 38-B). Também foram extraídos ^{35}S-glicosaminoglicanos do resíduo (GAG na Figura 38-B).

Observa-se no radioautograma a presença de uma banda principal de ^{35}S-proteoglicanos no tecido mamário normal, que migrou na mesma região (ou um pouco mais lenta) que o heparam sulfato. Já no fibroadenoma, foi identificada a mesma banda presente no tecido mamário normal e uma segunda banda, que migrou na mesma região do dermatam sulfato. Entretanto, devido à sobreposição parcial na migração eletroforética, elas também foram quantificadas em conjunto.

Quanto aos ^{35}S-glicosaminoglicanos extraídos do tecido residual, foram identificadas duas bandas no tecido normal e tumoral, uma que migrou como heparam sulfato e outra que migrou como dermatam sulfato.

Estes compostos foram quantificados por contagem da radioatividade utilizando líquido de cintilação conforme descrito em Métodos. A síntese total de moléculas marcadas em 24 horas foi analisada. A Figura 39 mostra os dados individuais de incorporação total de ^{35}S-sulfato em proteoglicanos (meio+PG+GAG) em cada fibroadenoma e seu controle pareado (dados numéricos nas Tabelas 16 e 17 do Anexo).

Os resultados (Figura 39-A e C) mostram que a incorporação de ^{35}S-sulfato em proteoglicanos foi superior no fibroadenoma em 23 dos 25 casos analisados em comparação ao tecido mamário normal correspondente. As exceções foram um caso na fase proliferativa e um caso na fase lútea. Estes resultados estão de acordo com os obtidos anteriormente, para os compostos não marcados.

Novamente, as maiores diferenças entre tumor e tecido mamário normal foram observadas na fase proliferativa (Figura 39 B e D), onde a incorporação chegou a ser 10 vezes maior no tumor, em relação ao seu controle. A Figura 40 e Tabela 10 apresentam os valores médios da incorporação de ^{35}S-sulfato em proteoglicanos em cada um dos tecidos nas respectivas fases do ciclo menstrual.

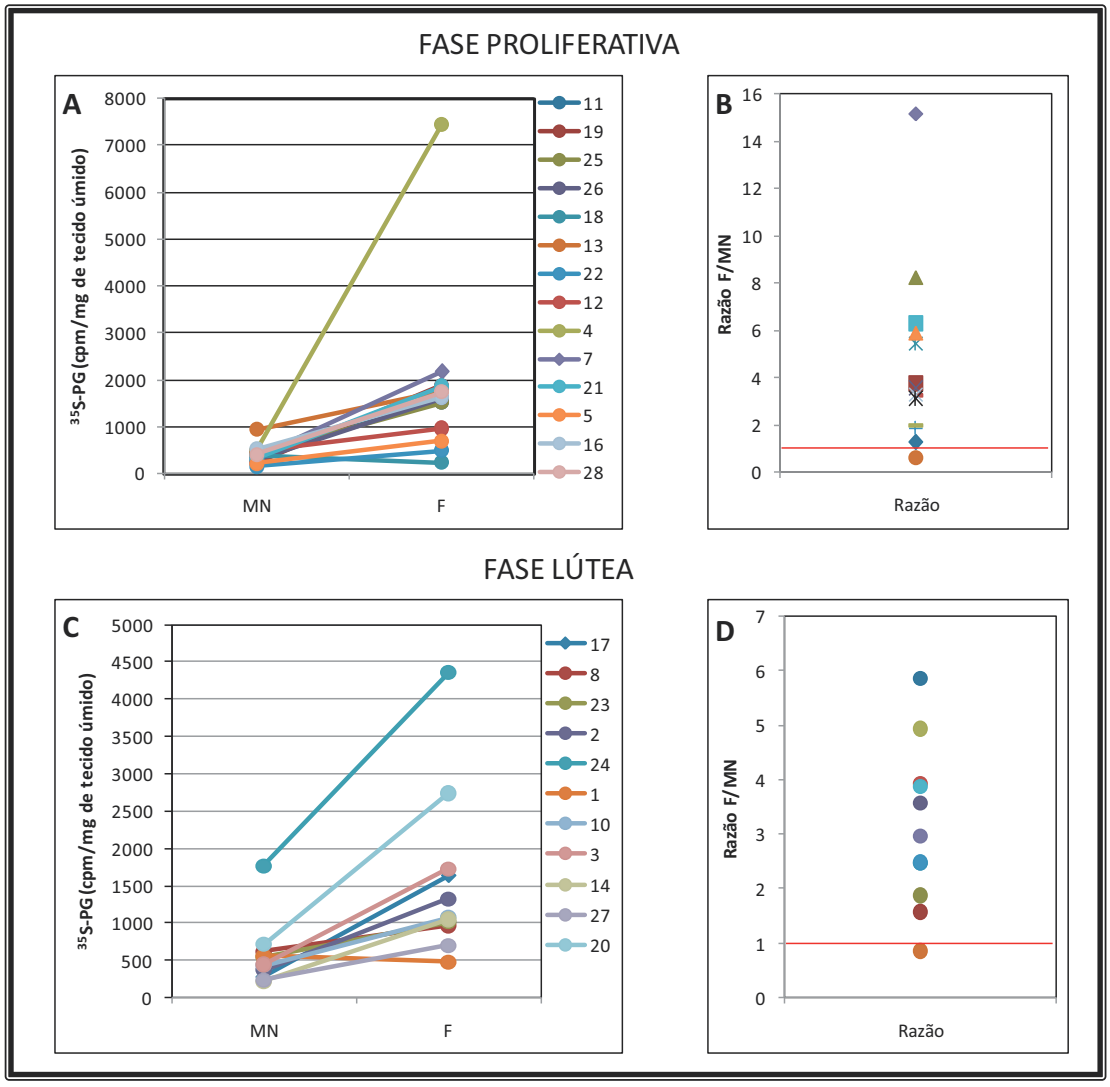


FIGURA 39: DADOS INDIVIDUAIS DA INCORPORAÇÃO TOTAL DE ^{35}S-SULFATO NO FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. (A) e (C) Dados individuais da incorporação total de ^{35}S-sulfato no fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente expressos em cpm/mg de tecido úmido; (B) e (D) Razão entre a concentração de ^{35}S-proteoglicanos de fibroadenoma e tecido mamário normal; MN: tecido mamário normal; F: fibroadenoma; PG: ^{35}S-proteoglicanos.

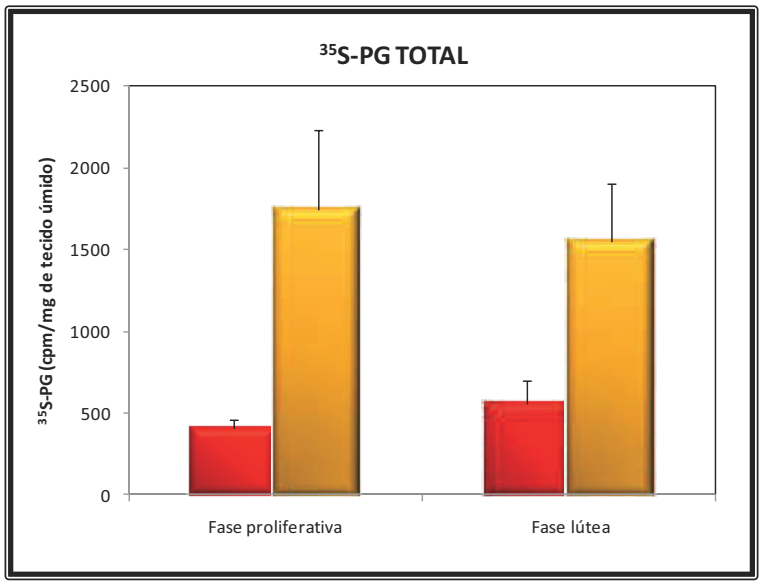


FIGURA 40: CONCENTRAÇÃO MÉDIA DA INCORPORAÇÃO TOTAL DE ^{35}S-SULFATO NO FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. As concentrações de ^{35}S-proteoglicanos totais são expressas em cpm/mg de tecido úmido. A barra de erro indica o erro padrão; ^{35}S-PG: proteoglicanos.

TABELA 10 – CONCENTRAÇÃO MÉDIA DA INCORPORAÇÃO TOTAL DE ^{35}S-SULFATO NO FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL

	FASE PROLIFERATIVA		FASE LÚTEA	
	MN (cpm/mg de tecido úmido)	F (cpm/mg de tecido úmido)	MN (cpm/mg de tecido úmido)	F (cpm/mg de tecido úmido)
^{35}S-PG	408,6±53,6	1746,9±484,1	560,2±135,9	1551,6±351,6

São apresentados as resultados de média±erro padrão.

A análise estatística destes resultados é apresentada na Figura 41 e mostra que estas diferenças entre o tecido tumoral e o tecido normal são estatisticamente significantes ($p<0,01$), tanto na fase proliferativa quanto na fase lútea do ciclo menstrual.

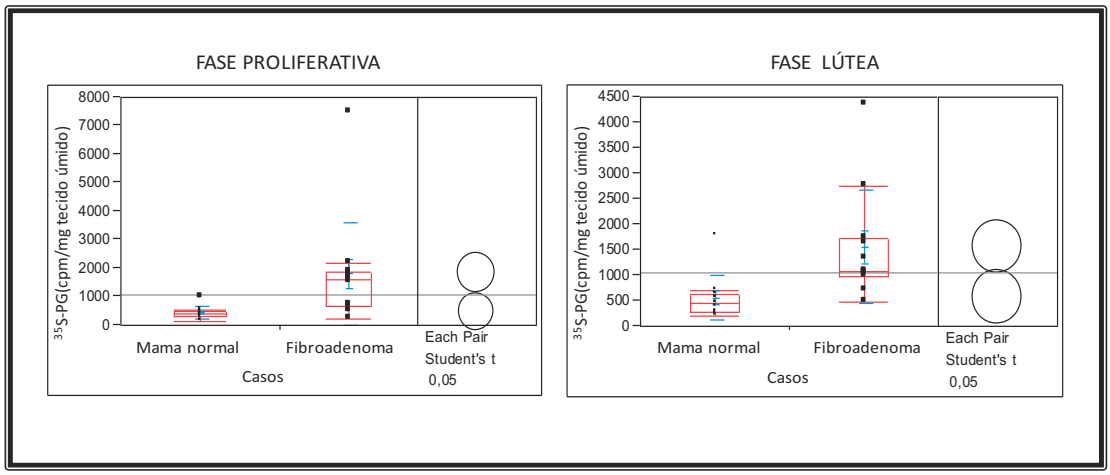


FIGURA 41: ANÁLISE ESTATÍSTICA DA INCORPORAÇÃO TOTAL DE ^{35}S-SULFATO NO FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. O teste T de Student mostra significância estatística nas diferenças entre as concentrações de ^{35}S-proteoglicanos totais de fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente nas fases proliferativa e lútea do ciclo menstrual ($p \leq 0,01$).

Nota-se ainda que, embora os valores médios da razão da concentração tanto de proteoglicanos não marcados quanto de ^{35}S-proteoglicanos revelem diferenças importantes entre fibroadenoma e tecido mamário normal nas duas fases do ciclo, ocorreu uma grande variação significativa entre os diferentes casos, como mostram as Tabelas 3 e 16 do Anexo.

Com o objetivo de investigar fatores responsáveis por estas variações, a razão entre os ^{35}S-proteoglicanos do tecido tumoral e tecido normal foi correlacionada com idade, IMC (índice de massa corpórea), diâmetro do tumor e concentrações de progesterona. A Figura 42 mostra que não houve correlação com nenhum desses parâmetros.

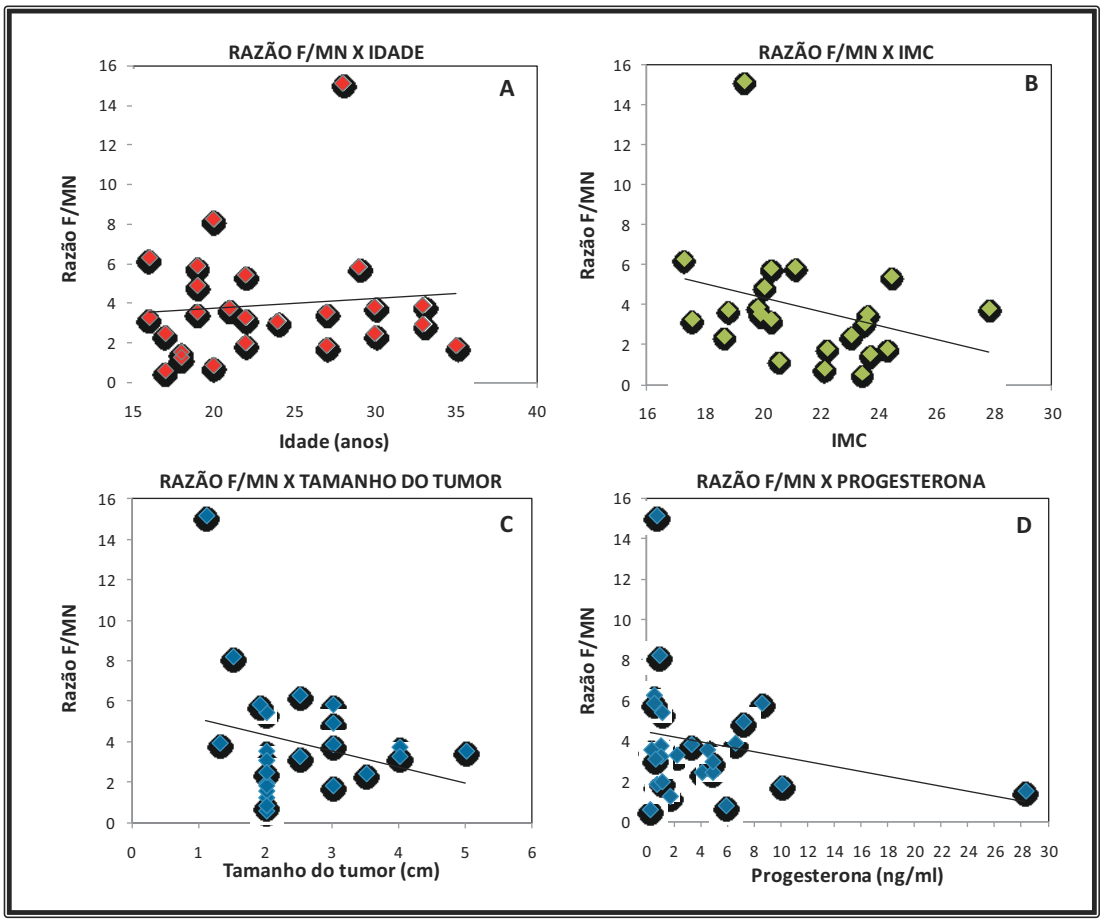


FIGURA 42: CORRELAÇÃO ENTRE A RAZÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS TOTAIS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE E DIFERENTES FATORES. (A) Correlação entre a razão da concentração de ^{35}S-proteoglicanos e a idade das pacientes; (B) correlação entre a razão da concentração de ^{35}S-proteoglicanos e o índice de massa corpórea (IMC); (C) correlação entre a razão da concentração de ^{35}S-proteoglicanos e o tamanho do tumor (cm); (D) correlação entre a razão da concentração de ^{35}S-proteoglicanos e a concentração de progesterona; MN: tecido mamário normal; F: fibroadenoma; IMC: índice de massa corpórea.

A Figura 43 mostra a incorporação de ^{35}S-sulfato em proteoglicanos ao longo do ciclo menstrual.

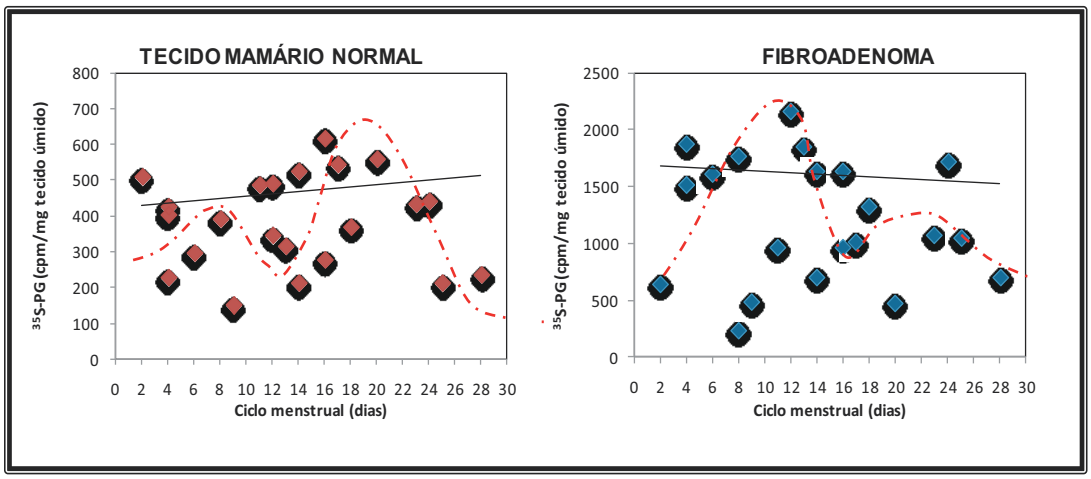


FIGURA 43: DADOS INDIVIDUAIS DA INCORPORAÇÃO TOTAL DE ^{35}S-SULFATO NO TECIDO MAMÁRIO NORMAL E FIBROADENOMA DURANTE O CICLO MENSTRUAL. ^{35}S-PG: ^{35}S-proteoglicanos. As linhas pontilhas (semelhantes às apresentadas na Figura 25) foram adicionadas nestes gráficos para observar se ocorreram as mesmas oscilações nas concentrações de ^{35}S-proteoglicanos ao longo do ciclo menstrual; PG: ^{35}S-proteoglicanos.

Novamente, observa-se grande variação. Embora, no tumor a taxa de síntese tenha sido sempre maior do que no tecido normal, não houve diferenças significantes entre as fases lútea e proliferativa, nem no tecido normal, nem no tecido tumoral (Figura 44).

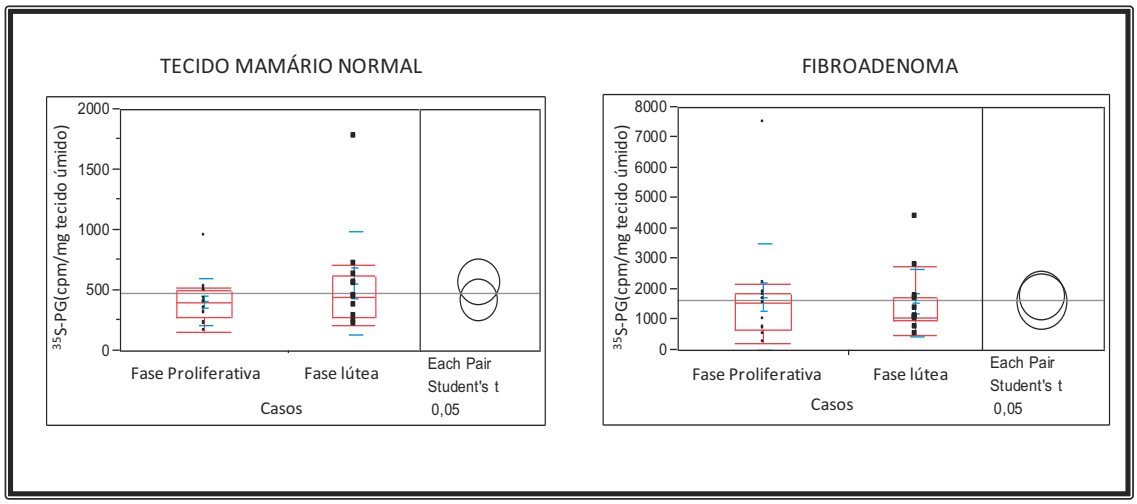


FIGURA 44: ANÁLISE ESTATÍSTICA DA INCORPORAÇÃO TOTAL DE ^{35}S-SULFATO NO TECIDO MAMÁRIO NORMAL E FIBROADENOMA DURANTE O CICLO MENSTRUAL. O teste T de Student mostra que não há significância nas diferenças entre as concentrações de ^{35}S-proteoglicanos nas fases proliferativa e lútea do ciclo menstrual em cada um dos tecidos.

3.2. ANÁLISE DOS ^{35}S-GLICOSAMINOGLICANOS PRESENTES NOS ^{35}S-PROTEOGLICANOS SINTETIZADOS NO FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL EM CONDIÇÕES DE CULTURA DE TECIDOS

Para determinar a composição dos ^{35}S-proteoglicanos no que se refere às cadeias de ^{35}S-glicosaminoglicanos, os compostos do meio de cultura e dos tecidos foram submetidos à proteólise e, posteriormente, a degradação com glicosaminoglicano liases específicas como descrito em Métodos. Os produtos foram submetidos à eletroforese e a radioatividade foi detectada por radioautograma. A Figura 45 exemplifica os resultados obtidos.

Observam-se, após proteólise duas bandas: uma correspondente ao heparam sulfato e outra com migração de dermatam sulfato, tanto no fibroadenoma (F) quanto no tecido mamário normal (MN).

Após a ação da condroitinase AC, a banda migrando como dermatam sulfato foi quase que totalmente degradada, restando uma banda mais discreta, de menor migração. Ao contrário, após a ação da condroitinase B, a mesma banda passou a migrar como condroitim sulfato, indicando que se trata de um polímero híbrido, susceptível a ação de ambas as enzimas. É, portanto, um dermatam sulfato, rico em ácido β-D-glucurônico (mas contendo também ácido α-L-idurônico). Heparam sulfato foi totalmente resistente a ação destas enzimas, mas foi totalmente degradado pela ação de heparitinase II.

A mesma composição em glicosaminoglicanos foi observada no fibroadenoma, e os resultados quantitativos médios (Meio+PG+GAG) são apresentados na Figura 46 (e também nas Tabelas 18, 19 e 20 do Anexo).

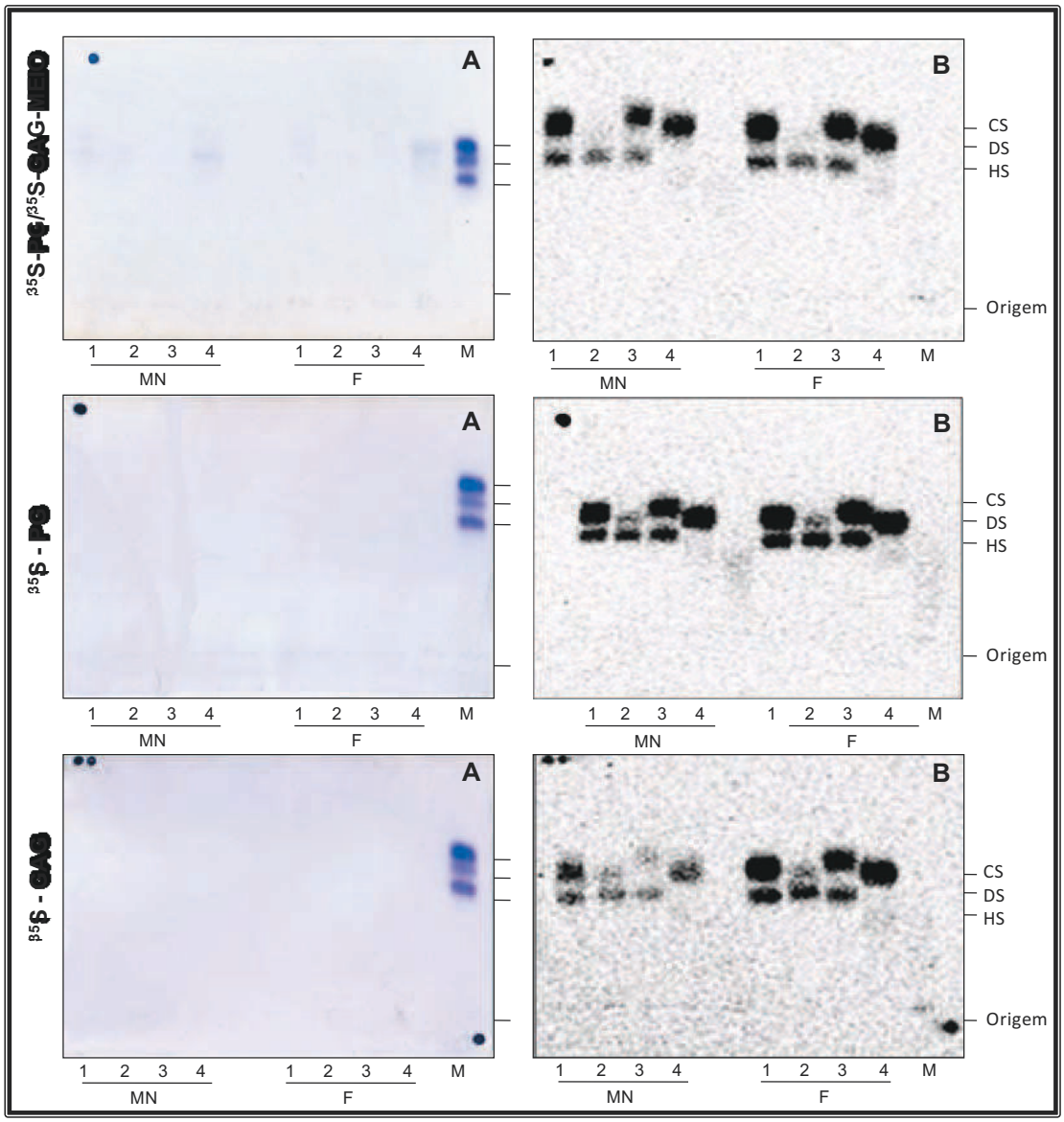


FIGURA 45: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE EM TAMPÃO PDA E RADIOAUTOGRAMA DOS ^{35}S-GLICOSAMINOGLICANOS LIBERADOS POR PROTEÓLISE DOS ^{35}S-PROTEOGLICANOS EXTRAÍDOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE. (A) ^{35}S-Glicosaminoglicanos foram analisados por eletroforese em gel de agarose e corados com azul de toluidina; (B) a radioatividade foi detectada por radioautograma obtido pela exposição do gel a uma tela (filme) sensível, analisada após 24 horas de exposição no sistema *Packard Cyclone Phosphor Image* para obtenção da imagem digital. (O caso de número 10 foi apresentado nesta figura); 1: GAG; 2: GAG + condroitinase AC; 3: GAG + condroitinase B; 4: GAG + heparitinase II; MN: tecido mamário normal; F: fibroadenoma; Meio: meio de cultura contendo ^{35}S-PG/^{35}S GAGs; ^{35}S-PG proteoglicanos; ^{35}S-GAG: ^{35}S glicosaminoglicanos; M: mistura padrão de glicosaminoglicanos – CS: condroitim sulfato; DS: dermatam sulfato; HS: heparam sulfato.

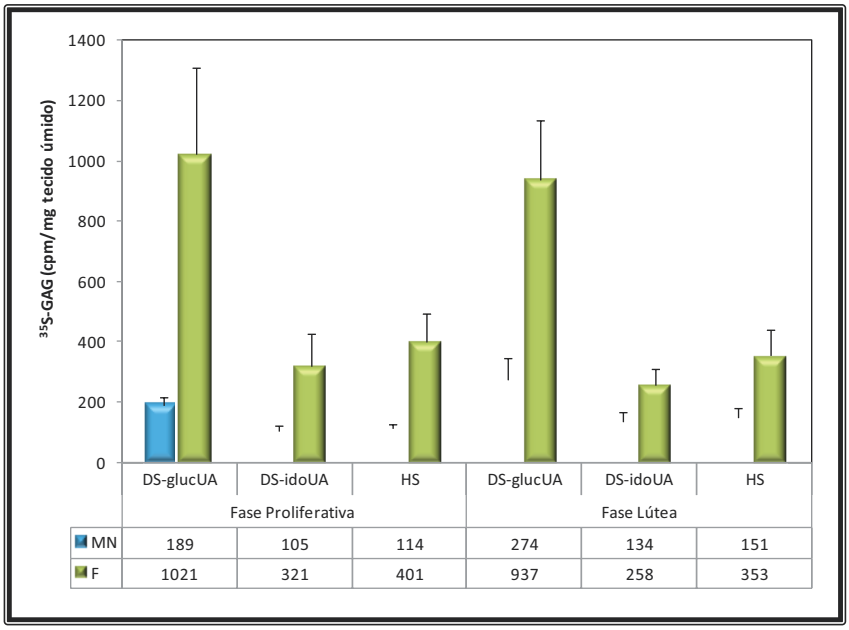


FIGURA 46: CONCENTRAÇÃO MÉDIA TOTAL DOS ^{35}S-GLICOSAMINOGLICANOS EXTRAÍDOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. Os valores médios da incorporação total (Meio+PG+GAG) de cada ^{35}S-glicosaminoglicano extraído de fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente nas duas fases do ciclo menstrual são expressos em cpm/mg de tecido úmido; DS-glucUA: ^{35}S-dermatam sulfato rico em ácido β-D-glucurônico; DS-idoUA: ^{35}S-dermatam rico em ácido α-L-idurônico; HS: ^{35}S-heparam sulfato; MN: tecido mamário normal; F: fibroadenoma.

Verifica-se que as concentrações de todos os ^{35}S-glicosaminoglicanos foram superiores no fibroadenoma nas duas fases do ciclo menstrual, e que as maiores diferenças foram observadas na fase proliferativa (da mesma maneira que ocorreu para os ^{35}S-proteoglicanos e não marcados), principalmente para o dermatam sulfato.

A Figura 47 mostra que todas as diferenças são estatisticamente significantes.

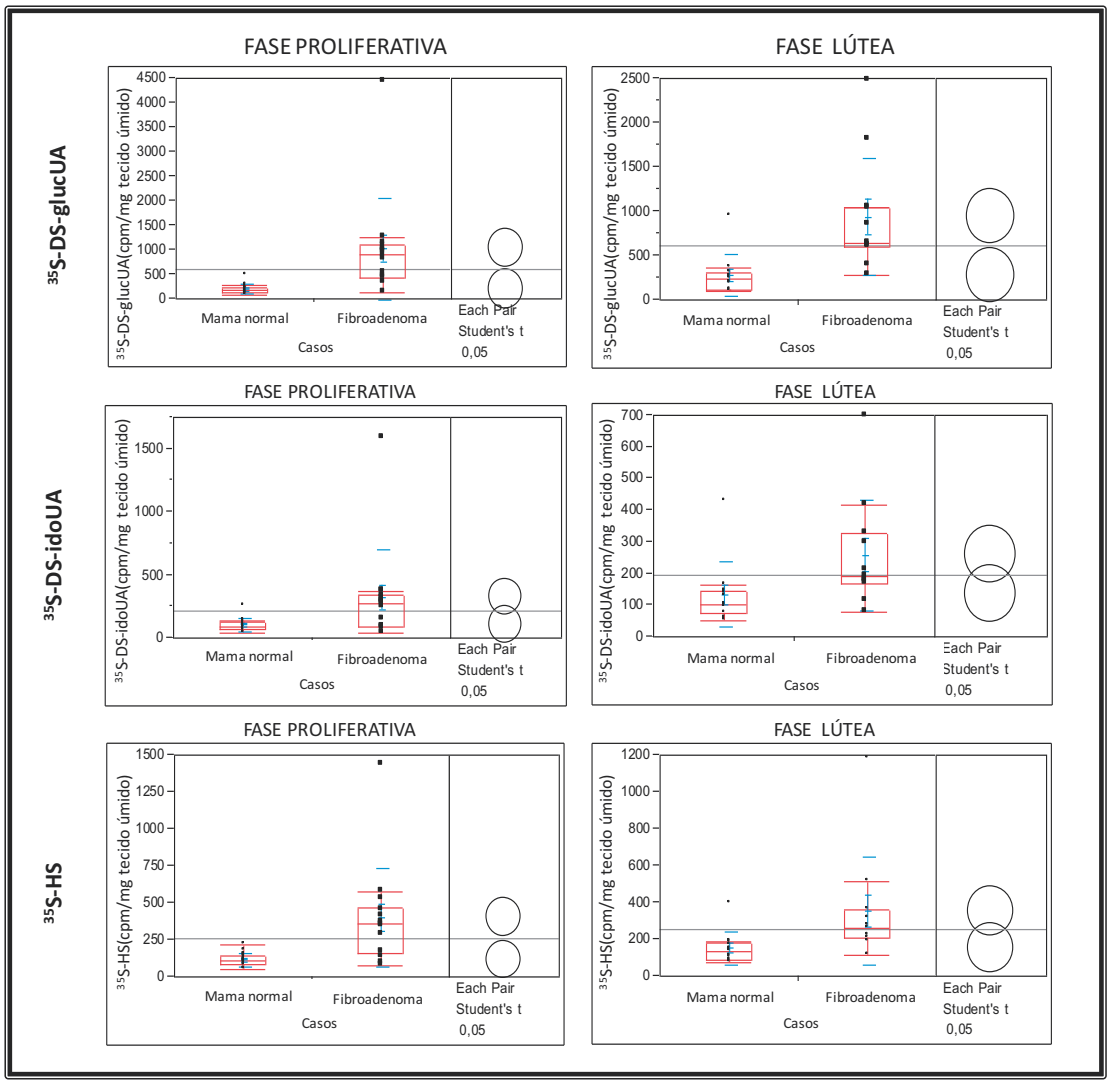


FIGURA 47: ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS CONCENTRAÇÕES TOTAIS DOS ^{35}S-GLICOSAMINOGLICANOS EXTRAÍDOS DE FIBROADENOMA E NO TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. O teste T de Student mostra que há significância estatística em todos os casos nas fases proliferativa e lútea do ciclo menstrual: ^{35}S-DS-glucUA: ^{35}S-dermatam sulfato rico em ácido β-D-glucurônico (P<0,01), ^{35}S-DS-idoUA: ^{35}S-dermatam sulfato rico em ácido α-L-idurônico e ^{35}S-HS: ^{35}S-heparam sulfato (P<0,05).

No tumor, as regiões contendo ácido β-D-glucurônico do dermatam sulfato correspondem a 59% (fase proliferativa) e 61% (fase lútea) do total de ^{35}S-glicosaminoglicanos, enquanto no tecido normal correspondem a 46% na fase proliferativa e 49% na fase lútea (Figura 50 e Tabelas 21, 22 e 23 do Anexo). Isso significa que esse polímero híbrido é mais rico em ácido β-D-glucurônico no tumor.

Essas variações para cada ^{35}S-glicosaminoglicano ao longo do ciclo são apresentadas na Figura 48. Ao final do ciclo, quando acontece a queda nas concentrações estrógenos e progesterona, também se observou uma queda na síntese de ^{35}S-glicosaminoglicanos, subindo logo em seguida.

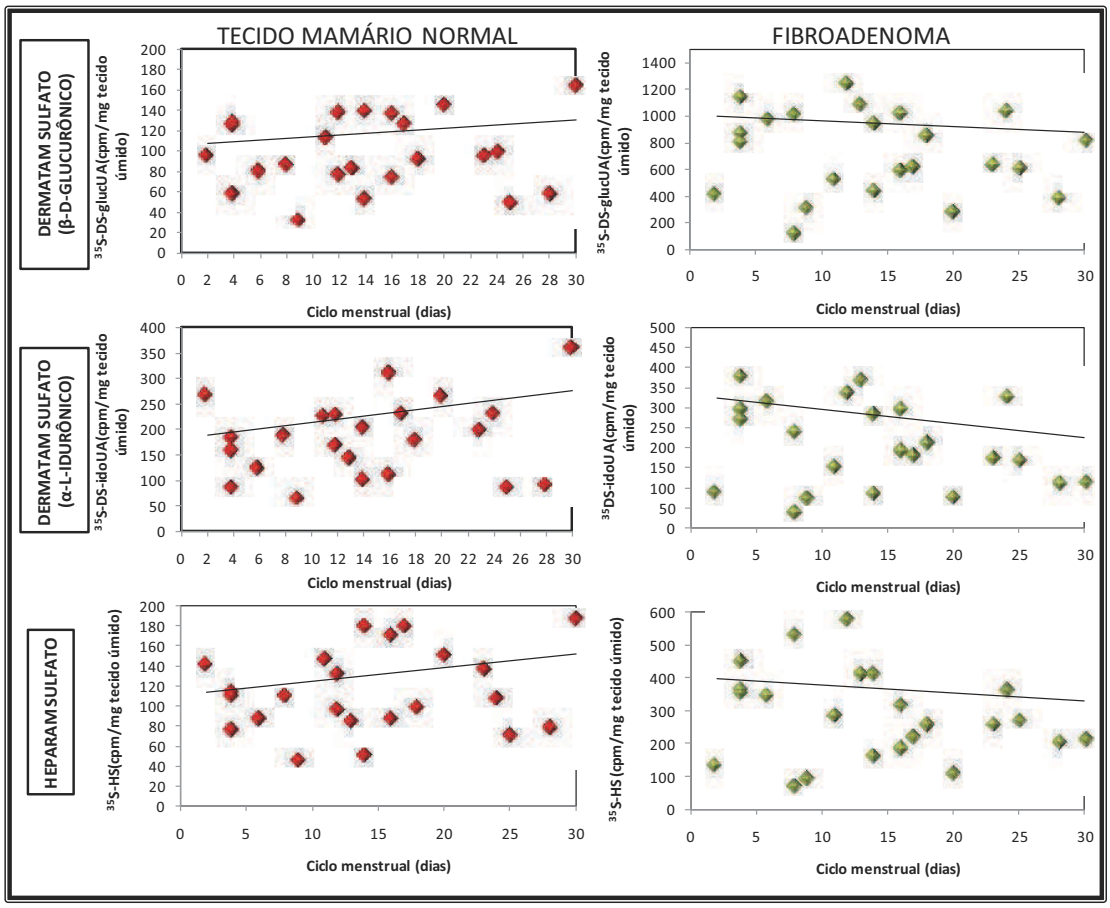


FIGURA 48: DADOS INDIVIDUAIS DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DE CADA ^{35}S-GLICOSAMINOGLICANO DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE DURANTE O CICLO MENSTRUAL. ^{35}S-DS-glucUA: ^{35}S-dermatam sulfato rico em ácido β-D-glucurônico; ^{35}S-DS-idoUA: ^{35}S-dermatam sulfato rico em ácido α-L-idurônico; ^{35}S-HS: ^{35}S-heparam sulfato.

Novamente não há diferenças estatisticamente significantes entre as fases do ciclo menstrual (Figura 49).

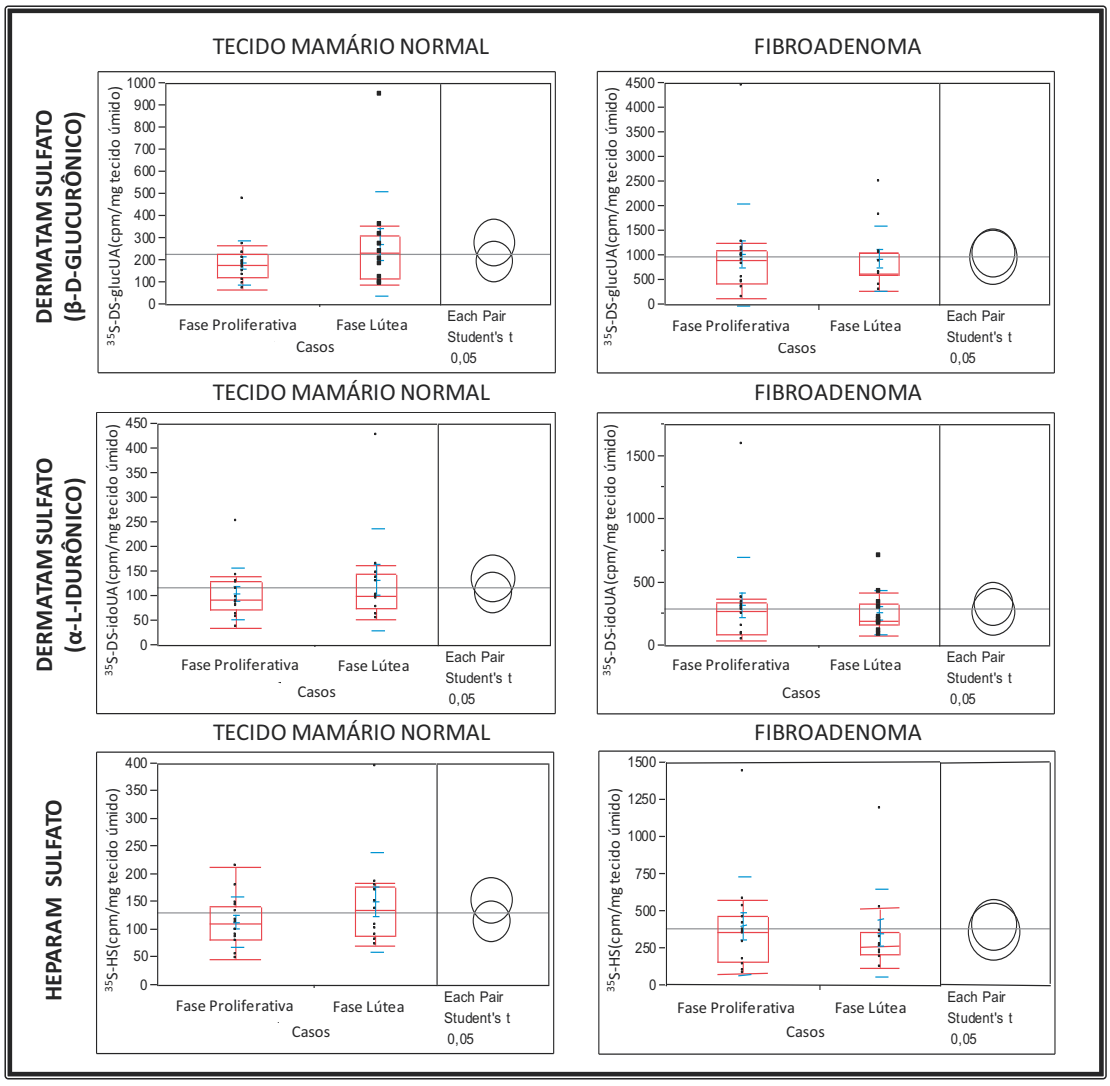


FIGURA 49: ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DE CADA ^{35}S-GLICOSAMINOGLICANO DE TECIDO MAMÁRIO NORMAL E FIBROADENOMA DURANTE O CICLO MENSTRUAL. O teste T de Student mostra que não há significância estatística em nenhum dos casos.

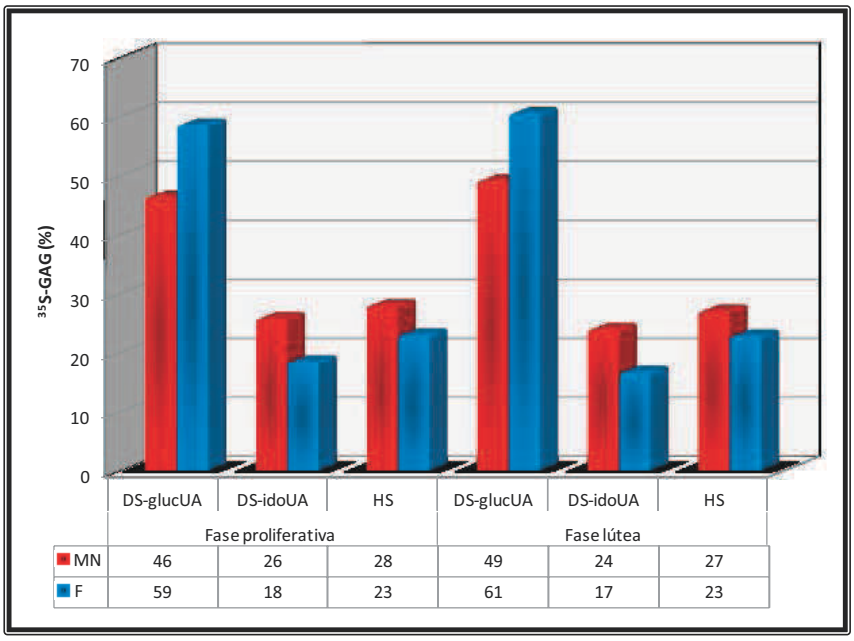


FIGURA 50: PROPORÇÃO DE ^{35}S-GLICOSAMINOGLICANOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. Os valores médios das concentrações de ^{35}S-glicosaminoglicanos presentes no fibroadenoma e tecido mamário normal nas duas fases do ciclo menstrual são expressos em porcentagem (%); GAG: ^{35}S-glicosaminoglicanos; ^{35}S-DS-glucUA: ^{35}S-dermatam sulfato rico em ácido β-D-glucurônico; ^{35}S-DS-idoUA: ^{35}S-dermatam sulfato rico em ácido α-L-idurônico; HS: ^{35}S-heparam sulfato; MN: tecido mamário normal; F: fibroadenoma.

3.3. ANÁLISE DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO ^{35}S-DERMATAM SULFATO PRESENTE NOS ^{35}S-PROTEOGLICANOS SINTETIZADOS NO FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL *EM CONDIÇÕES DE CULTURA DE TECIDOS*

Os ^{35}S-proteoglicanos obtidos em cultura (meio de cultura e dos fragmentos teciduais) de fibroadenoma e tecido mamário normal foram previamente dialisados para remoção do ^{35}S-sulfato livre, submetidos à proteólise e posteriormente incubados com condroitinases específicas (condroitinase AC e B), como descrito em Métodos. Os produtos de degradação formados foram submetidos à cromatografia descendente em papel também, como descrito em Métodos, e a radioatividade foi detectada pela exposição dos cromatogramas a uma tela (filme) sensível, analisada após 24 horas de exposição no sistema *Packard Cyclone Phosphor Image* para obtenção da imagem digital (Figura 51).

Observa-se a presença de produtos de degradação a partir da ação de condroitinase AC, com a formação de dissacarídeos ΔDi-4S e ΔDi-6S (ácido β-D-glucurônico) e, a partir da atividade de condroitinase B, com formação apenas de dissacarídeos ΔDi-4S (ácido α-L-idurônico), tanto no fibroadenoma quanto no tecido mamário normal adjacente nas duas fases do ciclo menstrual. A Figura mostra ainda o acúmulo de produtos de menor migração, identificados como oligossacarídeos e tetrassacarídeos, que foram isolados e reicubados com as respectivas enzimas, formando dissacarídeos.

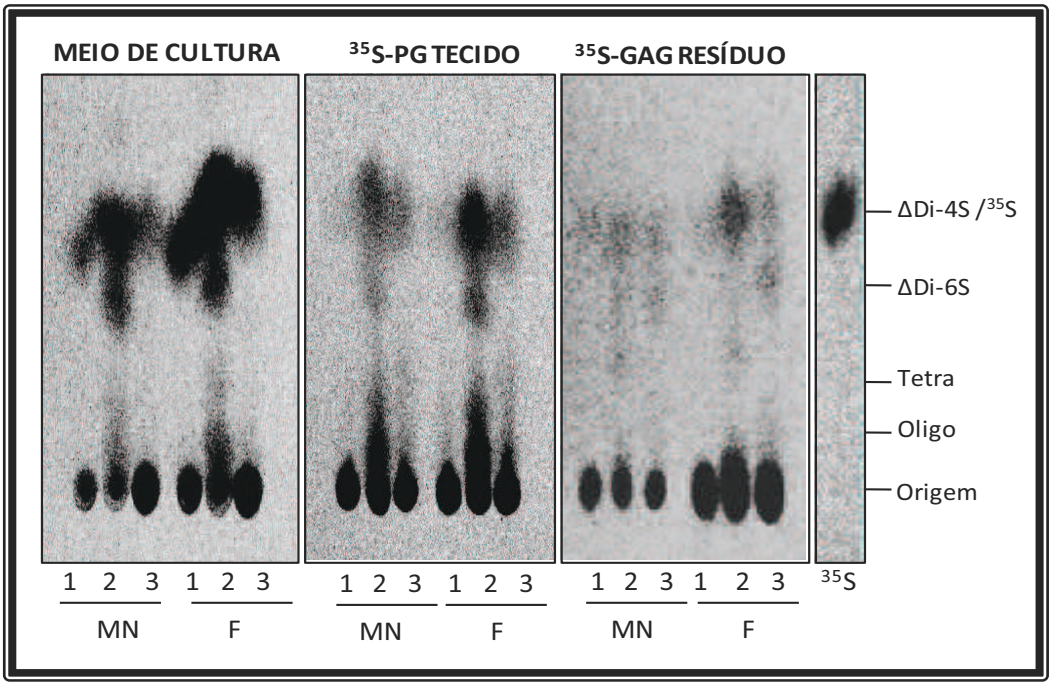


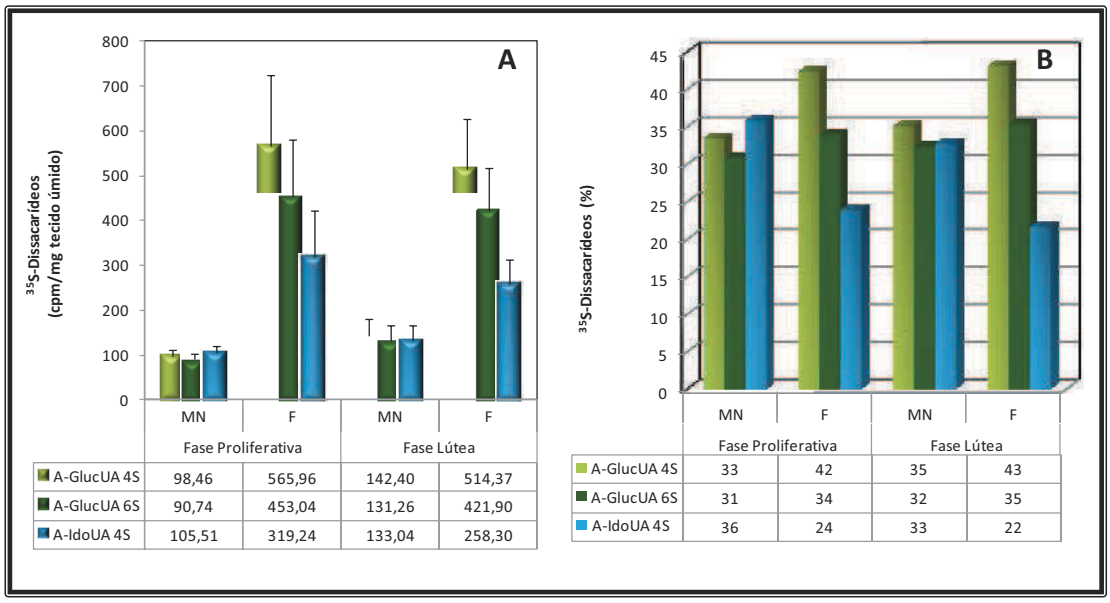
FIGURA 51: CROMATOGRAFIA DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DOS ^{35}S-GALACTOSAMINOGLICANOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. Os ^{35}S-proteoglicanos obtidos do meio de cultura e extraídos dos tecidos previamente degradados com enzima proteolítica papaína foram incubados com condroitinase AC (10μl) e condroitinase B (10μl) por 18 horas em suas respectivas temperaturas ótimas de atividade e submetidas à cromatografia descendente em papel conforme descrito em Métodos. Após, os compostos radioativos foram detectados por radioautograma. (1): ^{35}S-glicosaminoglicano; (2): ^{35}S-glicosaminoglicano incubado com condroitinase AC; (3): ^{35}S-glicosaminoglicano incubado com condroitinase B; MN tecido mamário normal: F: fibroadenoma; ^{35}S: padrão de sulfato radioativo; Oligo: oligossacarídeos; Tetra: tetrasacarídeos; ΔDi-4S: dissacarídeo insaturado 4-sulfatado; ΔDi-6S: dissacarídeo insaturado 6-sulfatado;

Portanto, as regiões do dermatam sulfato contendo ácido α-L-idurônico contêm apenas dissacarídeos 4-sulfatados, enquanto as regiões contendo ácido β-

D-glucurônico são também preferencialmente 4-sulfatadas, embora pequenas quantidades de dissacarídeos 6-sulfatados também estejam presentes, especialmente nos polímeros secretados para o meio de cultura.

Estes compostos foram quantificados por contagem da radioatividade utilizando líquido de cintilação. Os resultados médios do total e as proporções de produtos formados são apresentados na Figura 52 (os valores individuais nas Tabelas 24 a 29 do Anexo).

Observa-se inicialmente que, no fibroadenoma, foram formados cerca de 5 e 3 vezes mais dissacarídeos em relação ao tecido mamário normal adjacente, nas fases proliferativa e lútea do ciclo menstrual, respectivamente. Nota-se que esse aumento médio deve-se principalmente aos resíduos contendo ácido β-D-glucurônico (aumento médio de 5,5 vezes na fase proliferativa e 3,4 vezes na fase lútea), especialmente os 4-sulfatados, embora também tenha sido detectada maiores concentrações dos demais dissacarídeos.



	Fase Proliferativa		Fase Lútea	
	MN	F	MN	F
A-GlucUA 4S	98,46	565,96	142,40	514,37
A-GlucUA 6S	90,74	453,04	131,26	421,90
A-IdoUA 4S	105,51	319,24	133,04	258,30

	Fase Proliferativa		Fase Lútea	
	MN	F	MN	F
A-GlucUA 4S	33	42	35	43
A-GlucUA 6S	31	34	32	35
A-IdoUA 4S	36	24	33	22

FIGURA 52: COMPOSIÇÃO TOTAL EM DISSACARÍDEOS DOS ^{35}S-GALACTOSAMINOGLICANOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. Os valores médios totais (Meio+PG+GAG) das concentrações de cada ^{35}S-dissacarídeo obtido de fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente são expressos em cpm/mg de tecido úmido; A-GlucUA 4S: dissacarídeo insaturado 4-sulfatado que contém ácido D-glucurônico; A-GlucUA 6S: dissacarídeo insaturado 6-sulfatado que contém ácido D-glucurônico: A-IdoUA 4S: dissacarídeo insaturado 4-sulfatado que contém ácido L-idurônico; MN: tecido mamário normal; F: fibroadenoma.

Entretanto, com a análise das proporções de resíduos contendo ácido β-D-glucurônico e ácido α-L-idurônico, confirma-se os resultados obtidos anteriormente dos ^{35}S-glicosaminoglicanos, que apresentaram ^{35}S-galactosaminoglicanos com maiores concentrações de ácido β-D-glucurônico (~66% no tecido mamário normal e ~77% no fibroadenoma) e menores de ácido α-L-idurônico (~34% no tecido mamário normal e ~23% no fibroadenoma) principalmente no fibroadenoma.

Verifica-se ainda que houve um aumento nas proporções de dissacarídeos contendo ácido β-D-glucurônico, porém essa elevação nas proporções foi mais significativa para os resíduos 4-sulfatados nos dois tecidos (em média 8% mais no fibroadenoma).

A análise estatística destes dados é apresentada na Figura 53 e mostra que as diferenças entre os resíduos que contém ácido D-glucurônico ($p<00,1$) e ΔDi-4S - ácido L-idurônico ($p<00,5$) de fibroadenoma em relação ao tecido mamário normal adjacente são estatisticamente significantes nas duas fases do ciclo menstrual.

Estes resultados mais uma vez demonstraram que o galactosaminoglicano tumoral é mais rico em ácido D-glucurônico que o do tecido mamário normal.

Apesar das diferenças observadas em ambos os tecidos ao longo do ciclo menstrual, estas não são estatisticamente significantes (Figura 54).

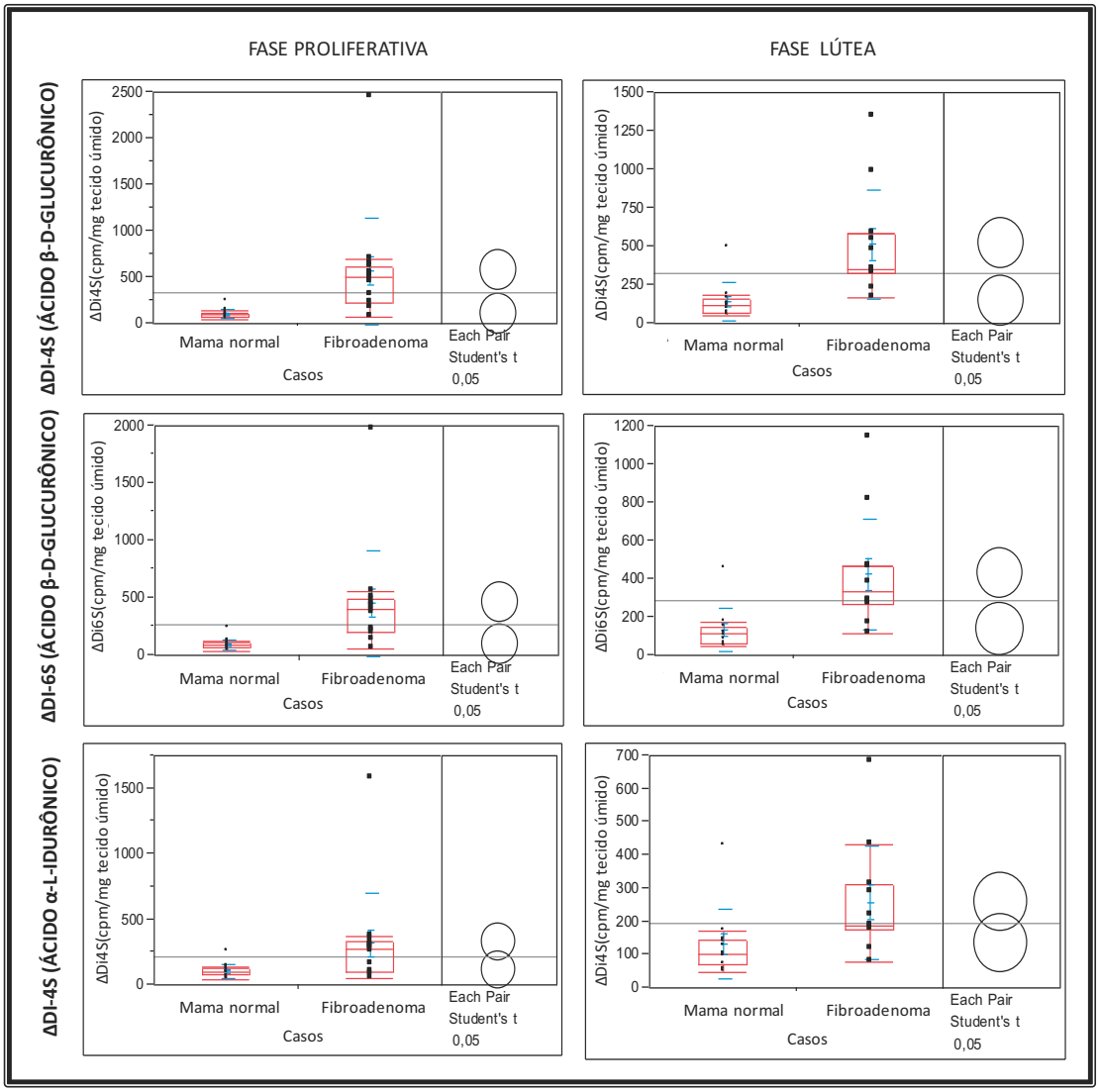


FIGURA 53: ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-DISSACARÍDEOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. O teste T de Student mostra que as diferenças são estatisticamente significantes entre os resíduos que contém ácido β-D-glucurônico (p<00,1) e ΔDi-4S - ácido α-L-idurônico (p<00,5) de fibroadenoma e tecido mamário normal.

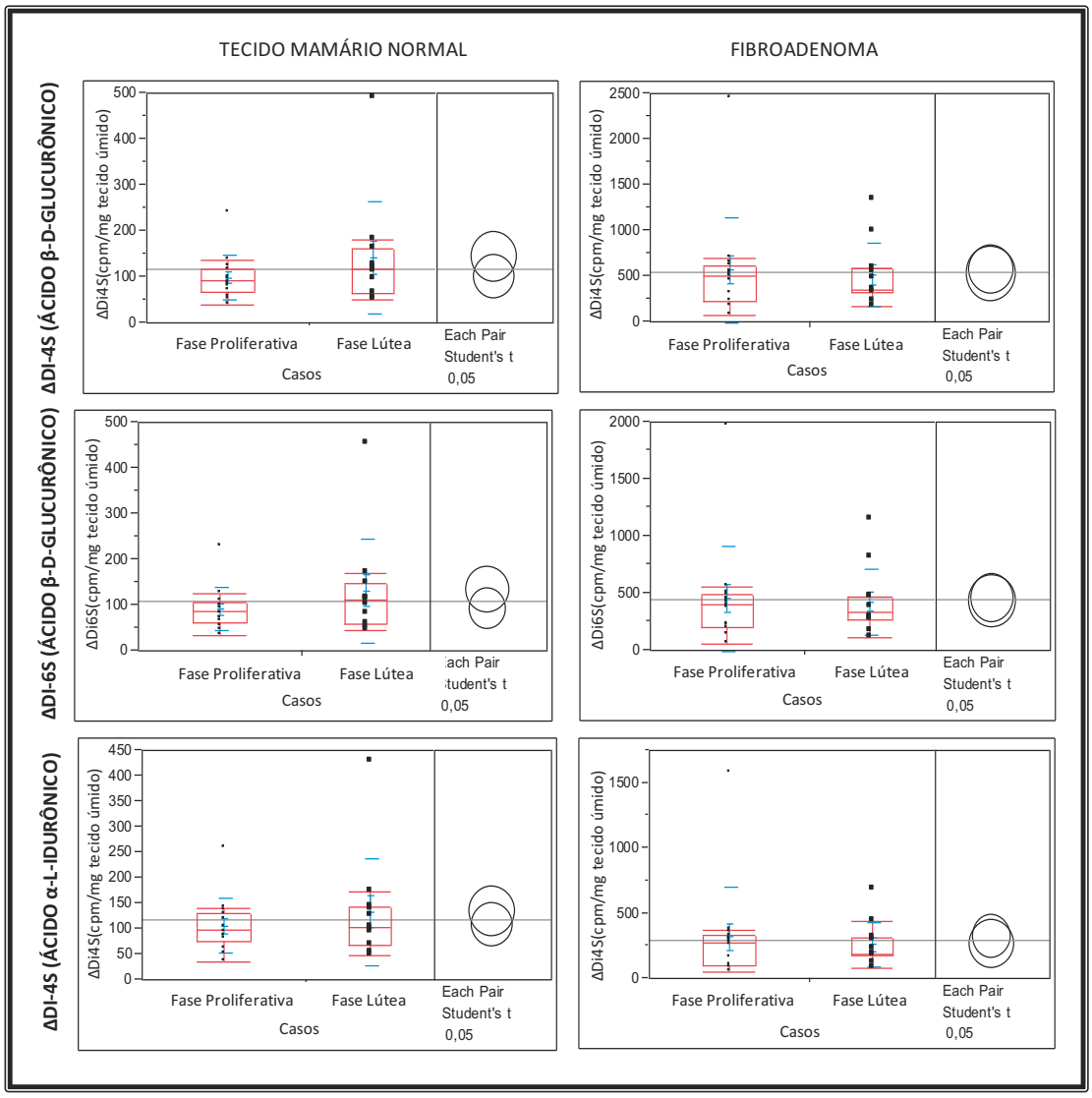


FIGURA 54: ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-DISSACARÍDEOS DE TECIDO MAMÁRIO NORMAL E FIBROADENOMA DURANTE O CICLO MENSTRUAL. O teste T de Student mostra que não há diferenças estatisticamente significantes.

3.4. DISTRIBUIÇÃO DOS ^{35}S-PROTEOGLICANOS E ^{35}S-GLICOSAMINOGLICANOS SINTETIZADOS NO FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL EM CONDIÇÕES DE CULTURA DE TECIDOS

Como visto anteriormente, ^{35}S-proteoglicanos foram secretados para o meio de cultura e extraídos dos fragmentos teciduais. A Figura 55 mostra que essa distribuição variou nas diferentes amostras de fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente.

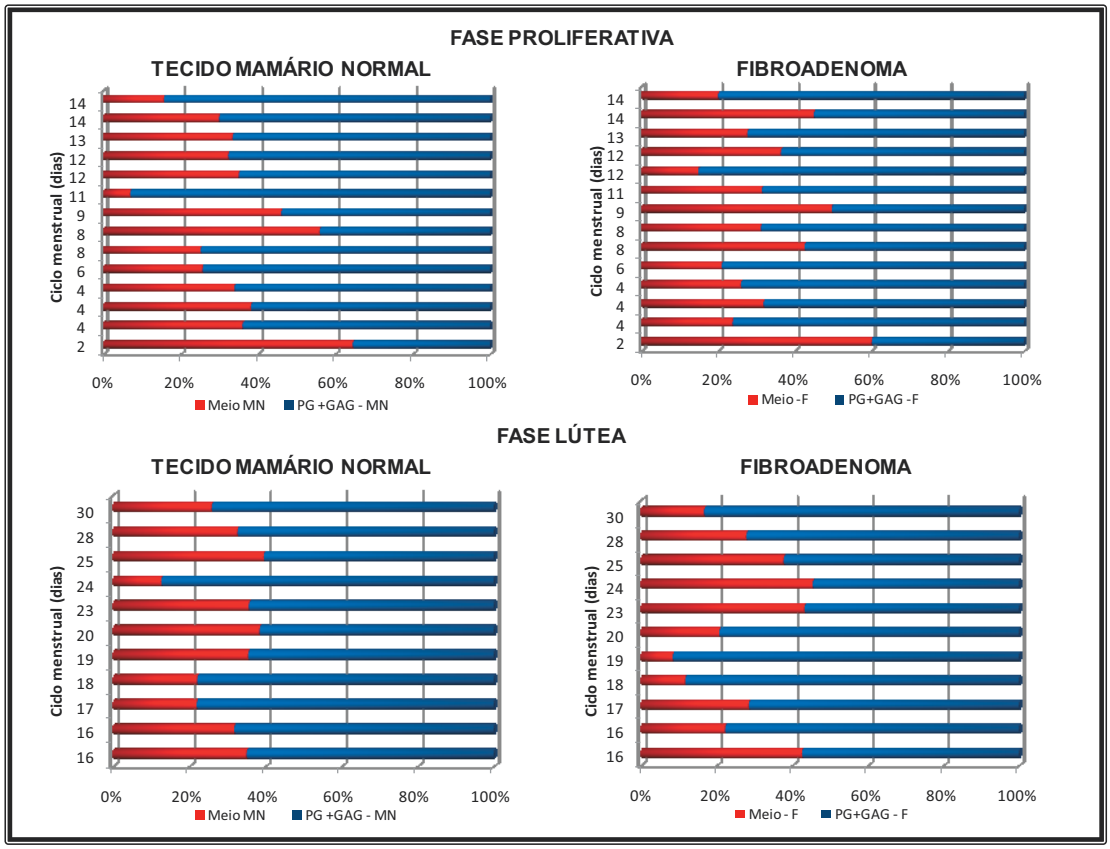


FIGURA 55: DADOS QUANTITATIVOS INDIVIDUAIS DA DISTRIBUIÇÃO DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS NO MEIO DE CULTURA E EXTRAÍDOS DE FRAGMENTOS TECIDUAIS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. Dados quantitativos dos ^{35}S-proteoglicanos detectados no meio de cultura e extraídos dos fragmentos teciduais (PG+GAG) de fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente nas duas fases do ciclo menstrual expressos em porcentagem (%); Meio: meio de cultura contendo ^{35}S-proteoglicanos/^{35}S-glicosaminoglicanos; PG: ^{35}S-proteoglicanos; GAG: ^{35}S-glicosaminoglicanos; MN: tecido mamário normal; F: fibroadenoma.

A Figura 56 (dados individuais nas Tabelas 30 a 33 do Anexo) mostra que, do total de ^{35}S-proteoglicanos sintetizados no fibroadenoma, em média 1/3 foi secretado para o meio de cultura, enquanto no tecido normal, 1/2 dos compostos marcados foram secretados.

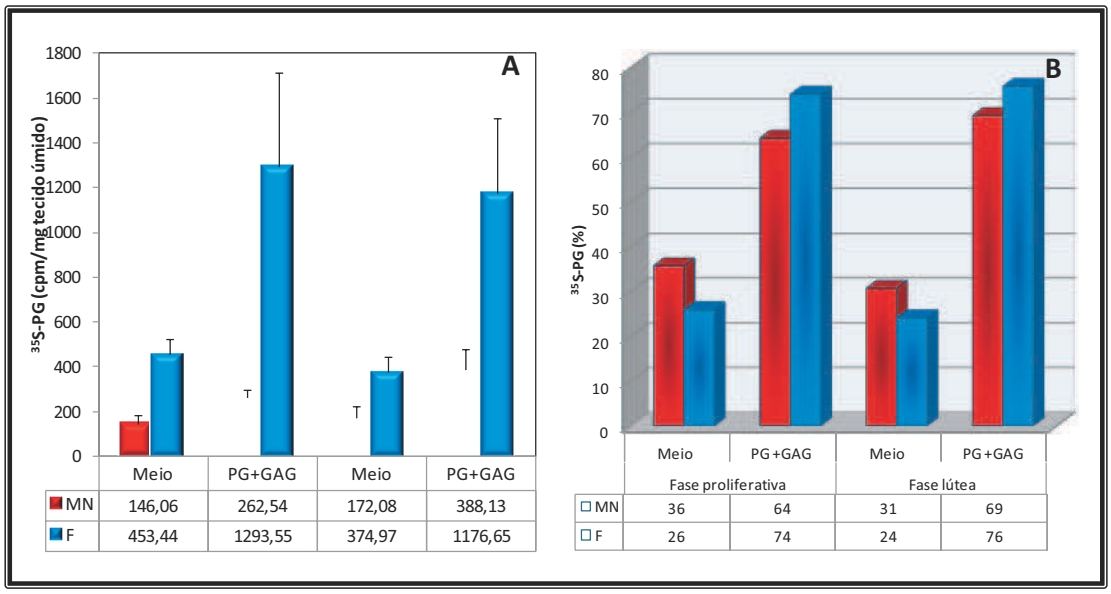


FIGURA 56: CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS DO MEIO DE CULTURA E EXTRAÍDOS DOS FRAGMENTOS TECIDUAIS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. Os valores médios das concentrações de ^{35}S-proteoglicanos/^{35}S-glicosaminoglicanos presentes no meio de cultura e extraídos de fragmentos teciduais (PG+GAG) de fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente nas duas fases do ciclo menstrual são expressos em cpm/mg de tecido úmido (A) e em % (B). A barra de erro indica o erro padrão. Meio: meio de cultura; PG: ^{35}S-proteoglicanos; GAG: ^{35}S-glicosaminoglicanos; MN: tecido mamário normal; F: fibroadenoma.

Em todos os casos, as diferenças entre o fibroadenoma e tecido mamário normal foram estatisticamente significantes (P<0,01) (Figura 57).

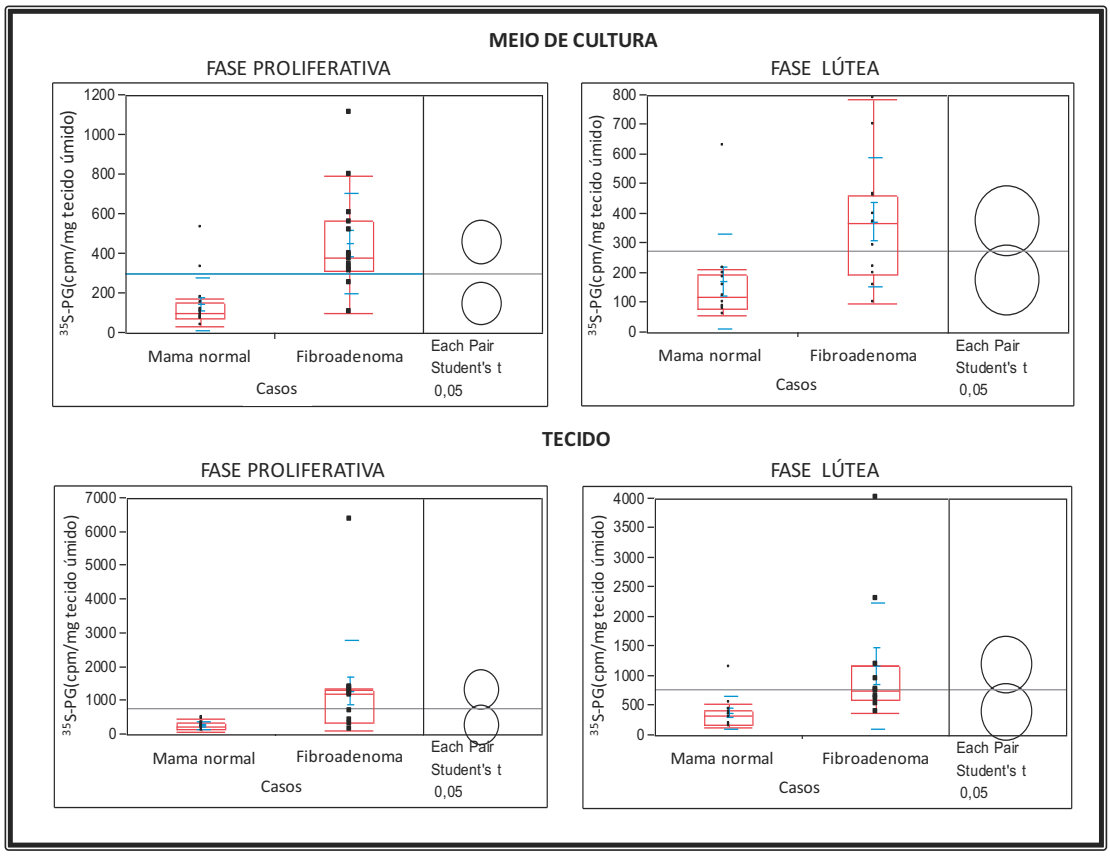


FIGURA 57: ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS DO MEIO DE CULTURA E EXTRAÍDOS DE FRAGMENTOS TECIDUAIS DE FIBROADENOMA E DE TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. O teste T de Student mostra que há significância nas diferenças entre as concentrações de proteoglicanos de fibroadenoma em relação ao tecido mamário normal tanto no meio de cultura quanto a partir dos fragmentos nas fases proliferativa e lútea do ciclo menstrual (P<0,01).

Por outro lado, não houve diferenças significantes entre as fases do ciclo, em nenhum dos tecidos (normal e tumoral) (Figura 56). A análise estatística é apresentada na Figura 58.

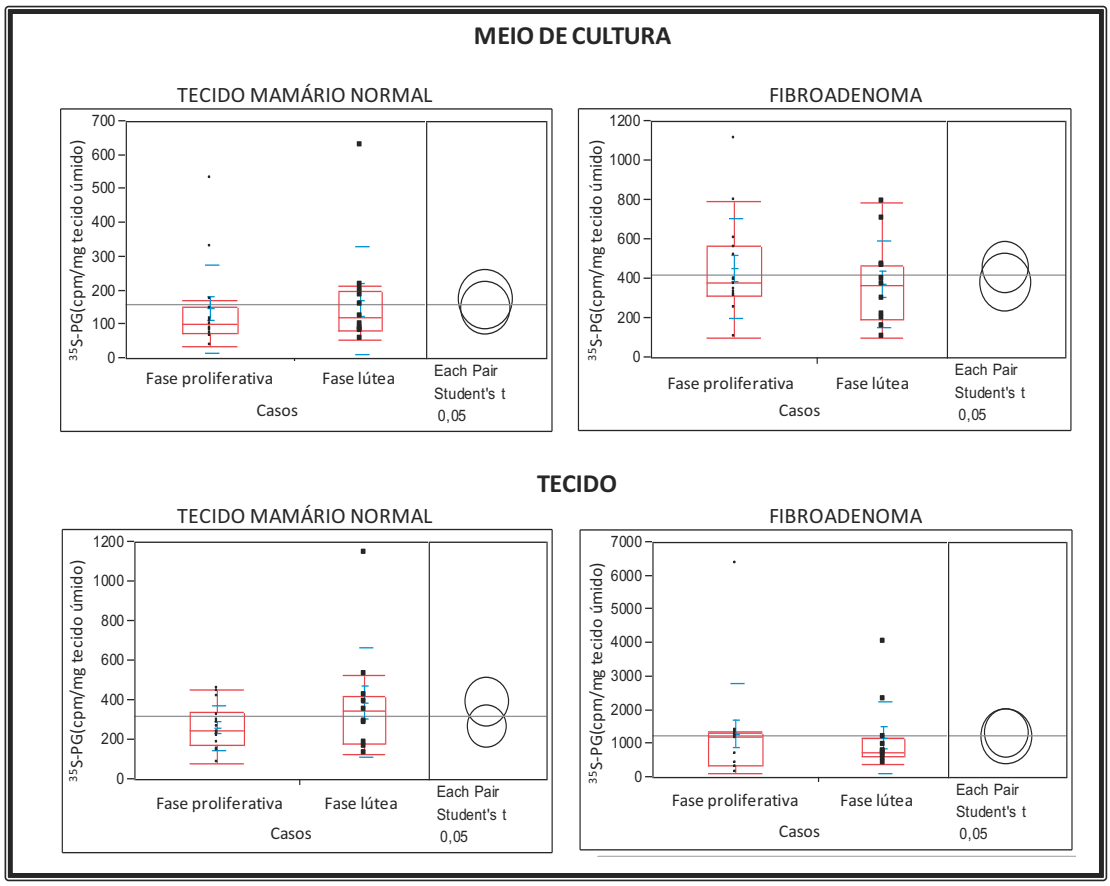


FIGURA 58: ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS DO MEIO DE CULTURA E EXTRAÍDOS DE FRAGMENTOS TECIDUAIS DE TECIDO MAMÁRIO NORMAL E FIBROADENOMA DURANTE O CICLO MENSTRUAL. Foi aplicado o teste T de Student, mostrando que não houve significância nas fases proliferativa e lútea do ciclo menstrual.

Em todos os casos, ^{35}S-dermatam sulfato secretado para o meio de cultura apresentou maiores proporções de ácido β-D-glucurônico do que os retidos nos tecidos. As proporções de ^{35}S-heparam sulfato foram sempre maiores no fragmento tecidual do que no meio de cultura (Figura 59 e dados individuais nas Tabelas 34 a 45 do Anexo). As diferenças em todos os casos são estatisticamente significantes ($p<0,05$) (Figura 60 e 61).

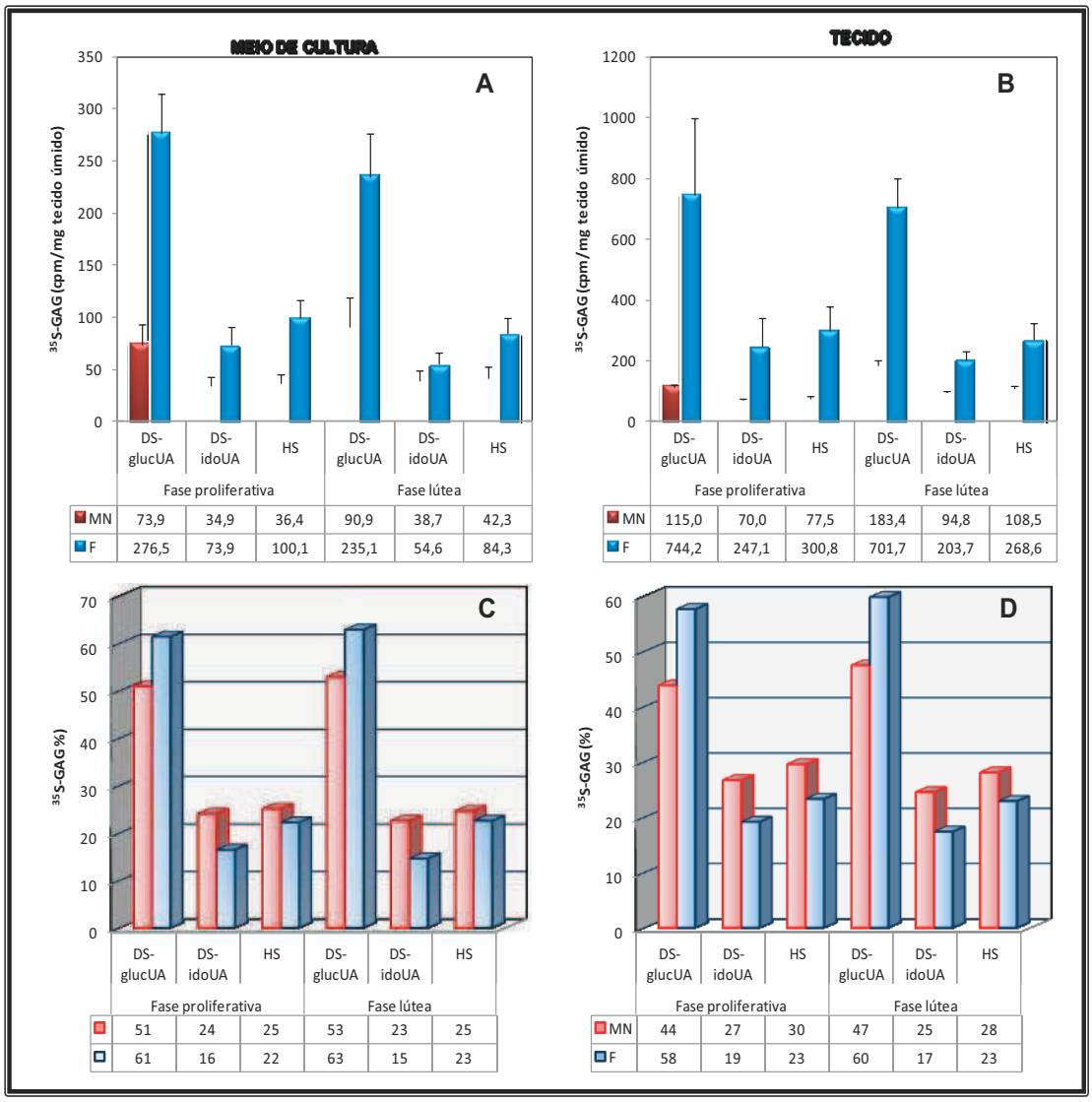


FIGURA 59: DISTRIBUIÇÃO DE ^{35}S-GLICOSAMINOGLICANOS OBTIDOS DO MEIO DE CULTURA E EXTRAÍDOS DOS FRAGMENTOS TECIDUAIS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. Os valores médios das concentrações de cada ^{35}S-glicosaminoglicano obtidos do meio de cultura e tecido (^{35}S-PG degradado + ^{35}S-GAG tecido residual) de fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente nas duas fases do ciclo menstrual são expressos em cpm/mg de tecido úmido (A) e (B) e em % (C) e (D); ^{35}S-GAG: ^{35}S-glicosaminoglicanos; DS-glucUA:^{35}S-dermatam sulfato rico em ácido β-D-glucurônico; DS-idoUA: ^{35}S-dermatam sulfato rico em ácido α-L-idurônico; HS: ^{35}S-heparam sulfato; MN: tecido mamário normal; F: fibroadenoma.

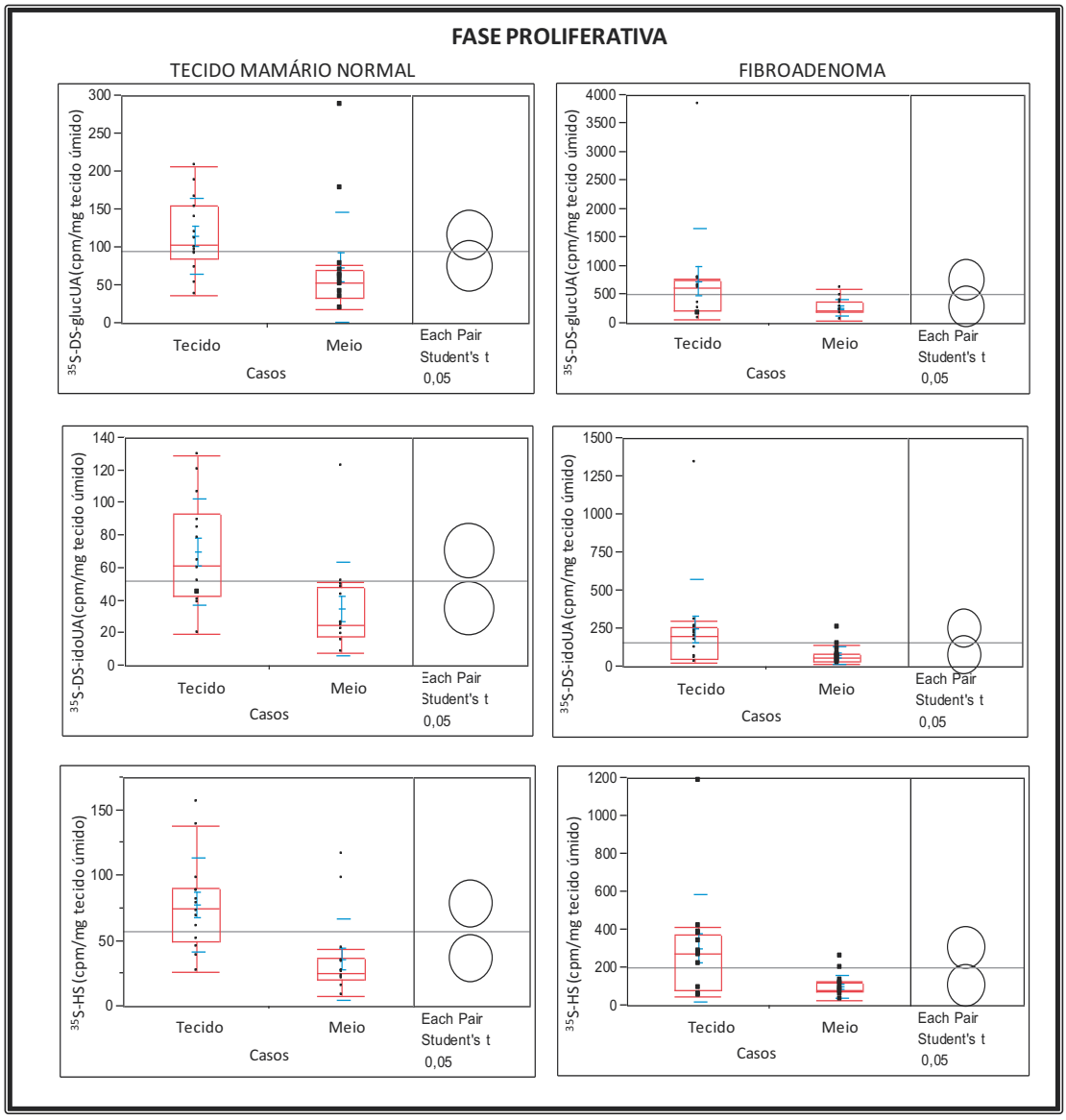


FIGURA 60: ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-GLICOSAMINOGLICANOS DO FRAGMENTO TECIDUAL X MEIO DE CULTURA DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NA FASE PROLIFERATIVA DO CICLO MENSTRUAL. O teste T de Student mostra que as diferenças são estatisticamente significantes para todos os glicosaminoglicanos (dermatam sulfato rico em ácido β-D-glucurônico, $p \leq 0,05$, dermatam sulfato rico em ácido α-L-idurônico e heparam sulfato, $p<0,01$) do tecido mamário normal e do fibroadenoma ($p<0,05$) na fase proliferativa ciclo menstrual.

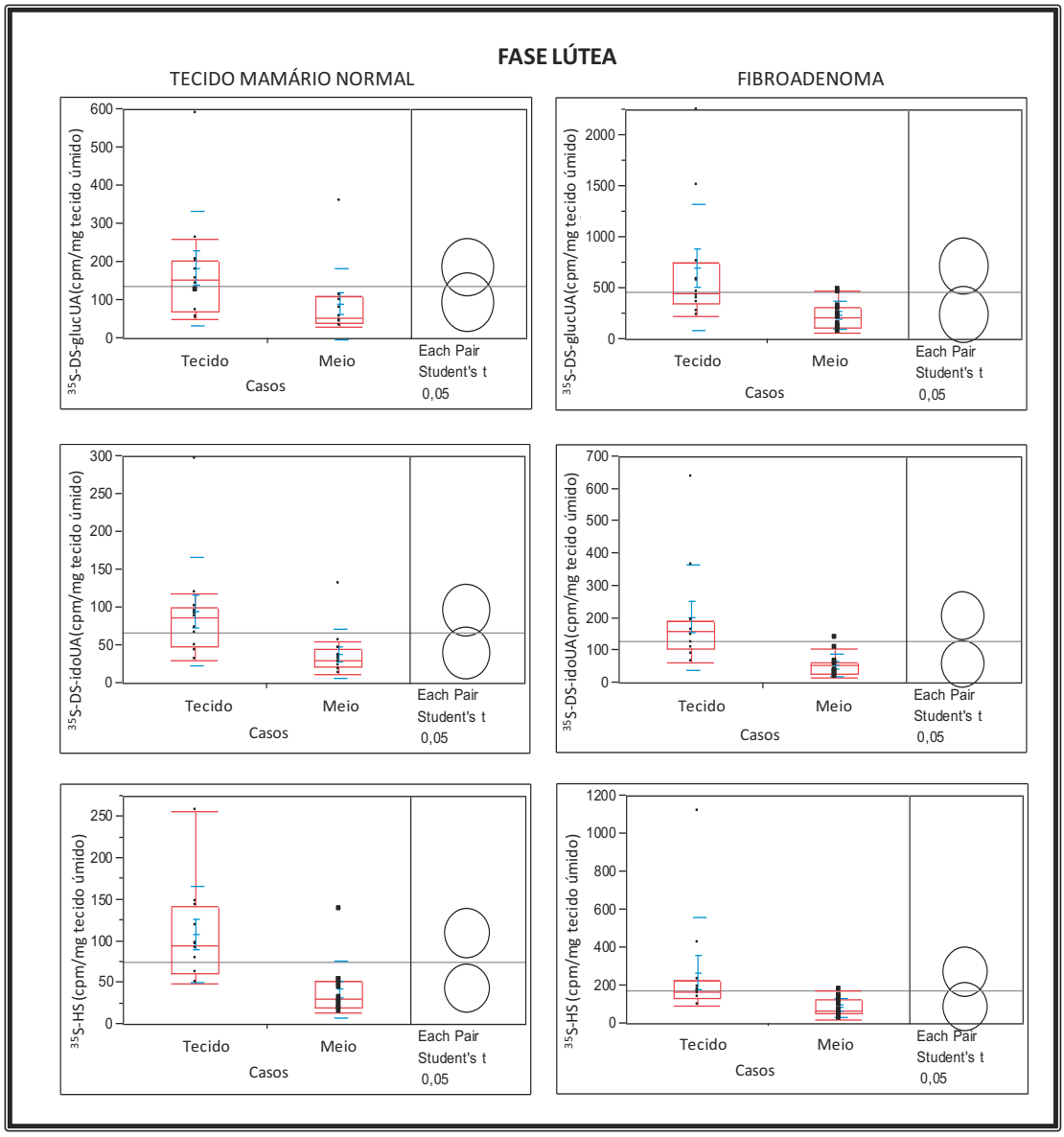


FIGURA 61: ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-GLICOSAMINOGLICANOS DO FRAGMENTO TECIDUAL X MEIO DE CULTURA DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NA FASE LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. O teste T de Student mostra que as diferenças são estatisticamente significantes para todos os glicosaminoglicanos ($p<0,01$) do tecido mamário normal e do fibroadenoma ($p\leq0,01$) na fase lútea do ciclo menstrual.

3.5. ^{35}S-PROTEOGLICANOS E ^{35}S-GLICOSAMINOGLICANOS EXTRAÍDOS DOS FRAGMENTOS TECIDUAIS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL

Durante o processo de extração, parte dos compostos sulfatados foi extraída dos tecidos na forma de ^{35}S-proteoglicanos. Para verificar a eficiência do processo de extração, o tecido residual foi submetido à proteólise, que dissolveu completamente o tecido e permitiu a recuperação dos ^{35}S-glicosaminoglicanos. A Figura 62 mostra os resultados quantitativos obtidos.

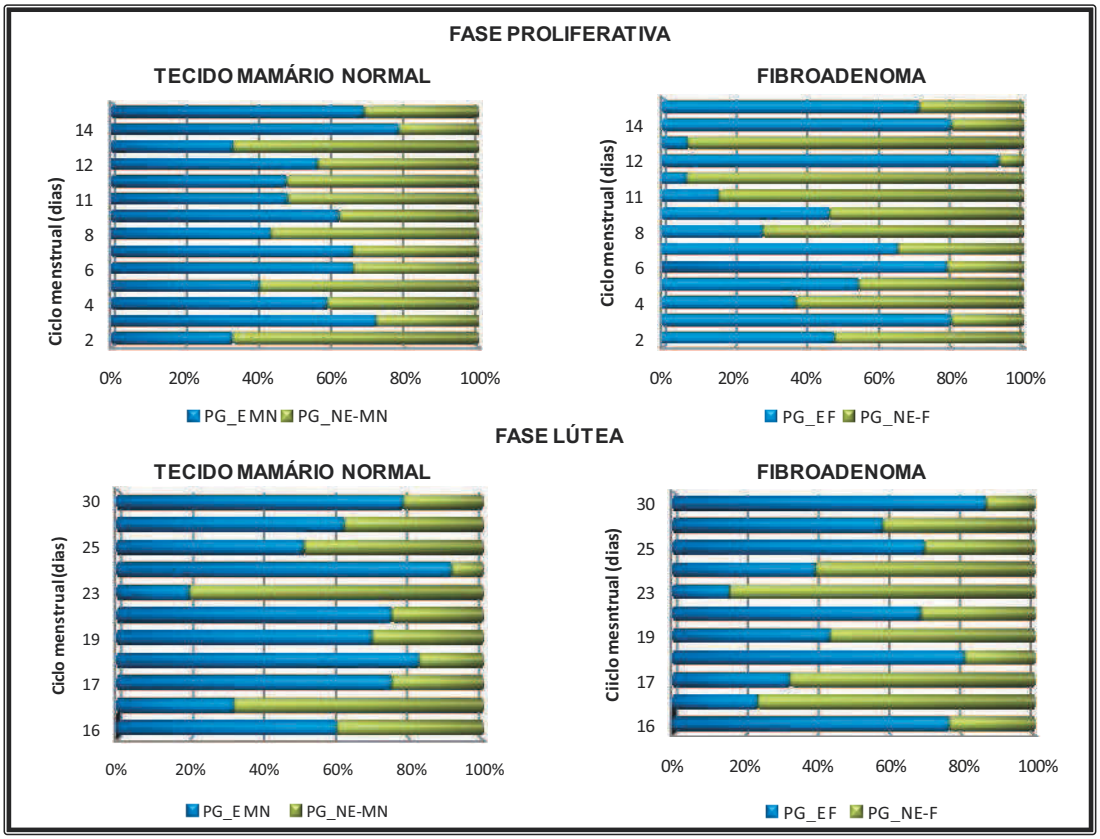


FIGURA 62: DADOS QUANTITATIVOS INDIVIDUAIS DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS E ^{35}S-GLICOSAMINOGLICANOS EXTRAÍDOS DE FRAGMENTOS TECIDUAIS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. Dados quantitativos dos ^{35}S-proteoglicanos e ^{35}S-glicosaminoglicano extraídos dos fragmentos teciduais de fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente nas fases proliferativa e lútea do ciclo menstrual são expressos em %; PG: ^{35}S-proteoglicanos; GAG: ^{35}S-glicosaminoglicanos; MN: tecido mamário normal; F: fibroadenoma.

Observa-se uma grande variação na eficiência de extração entre os diferentes casos, tanto para o fibroadenoma quanto para o tecido mamário normal. Em alguns casos, apenas 10-20% dos proteoglicanos foram extraídos, enquanto em outros casos 80-90% foram extraídos. Observaram-se diferenças tanto no tecido normal como no tumoral em ambas as fases embora as diferenças tenham sido maiores nos tumores. A Tabela 11 e Figura 63 apresentam os valores médios obtidos (os valores individuais são apresentados nas Tabelas 46 e 47 do Anexo).

TABELA 11 – VALORES MÉDIOS DO RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS DE FRAGMENTOS TECIDUAIS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL

EXTRAÇÃO DE PG (%)	TECIDO MAMÁRIO NORMAL		FIBROADENOMA	
	Fase Proliferativa	Fase Lútea	Fase Proliferativa	Fase Lútea
PG EXTRAÍDO	54	66	37	56
PG NÃO EXTRAÍDO	46	34	62	44

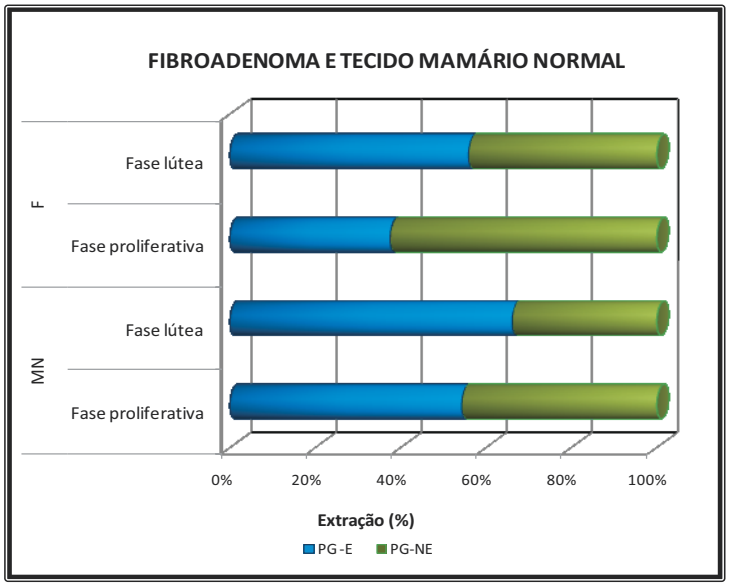


FIGURA 63: RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS DE FRAGMENTOS TECIDUAIS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. Os valores médios são expressos em porcentagem (%); PG-E: ^{35}S-proteoglicanos extraídos; PG-NE: ^{35}S-proteoglicanos não-extraídos (^{35}S-glicosaminoglicanos do tecido residual); MN: tecido mamário normal; F: fibroadenoma.

Apesar das variações, a extração de ^{35}S-proteoglicanos tanto de fibroadenoma quanto de tecido mamário normal adjacente foi em média mais eficiente na fase lútea, sugerindo alterações na arquitetura dos tecidos.

Os valores médios das concentrações de ^{35}S-proteoglicanos e ^{35}S-glicosaminoglicanos (resíduo) destes tecidos nas duas fases são apresentados na Figura 64 (valores individuais nas Tabelas 48 e 49 do Anexo).

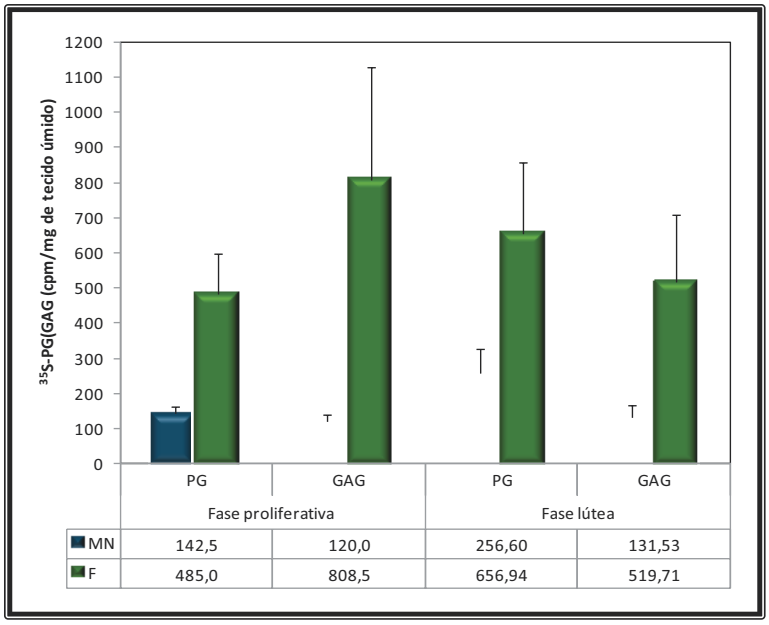


FIGURA 64: CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS E ^{35}S-GLICOSAMINOGLICANOS EXTRAÍDOS DE FRAGMENTOS TECIDUAIS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. Os valores médios das concentrações de ^{35}S-proteoglicanos extraídos e ^{35}S-glicosaminoglicanos do tecido residual de fibroadenoma e tecido mamário normal nas duas fases do ciclo menstrual são expressos em cpm/mg de tecido úmido. A barra de erro indica o erro padrão; PG: ^{35}S-proteoglicanos extraídos; GAG: ^{35}S-glicosaminoglicanos do tecido residual (^{35}S-proteoglicanos não-extraídos); MN: tecido mamário normal; F: fibroadenoma.

Novamente, observam-se concentrações muito mais altas de ^{35}S-proteoglicanos nos tumores. A menor eficiência de extração foi observada nos fibroadenomas durante a fase proliferativa, aumentando durante a fase lútea, nos dois tecidos. A análise dos ^{35}S-glicosaminoglicanos mostrou que a eficiência de extração tende a ser menor para proteoglicanos de heparam sulfato, uma vez que a proporção deste glicosaminoglicano é maior nos proteoglicanos não-extraídos do que nos extraídos por hidrocloreto de guanidina (Figura 65 e Tabelas 50 a 61 do Anexo).

Além disso, a análise enzimática com condroitinases AC e B mostraram que as moléculas de dermatam sulfato mais ricas em ácido α-L-idurônico tendem a ser extraídas com menor eficiência (Figura 65). No entanto, estas diferenças não foram estatisticamente significantes.

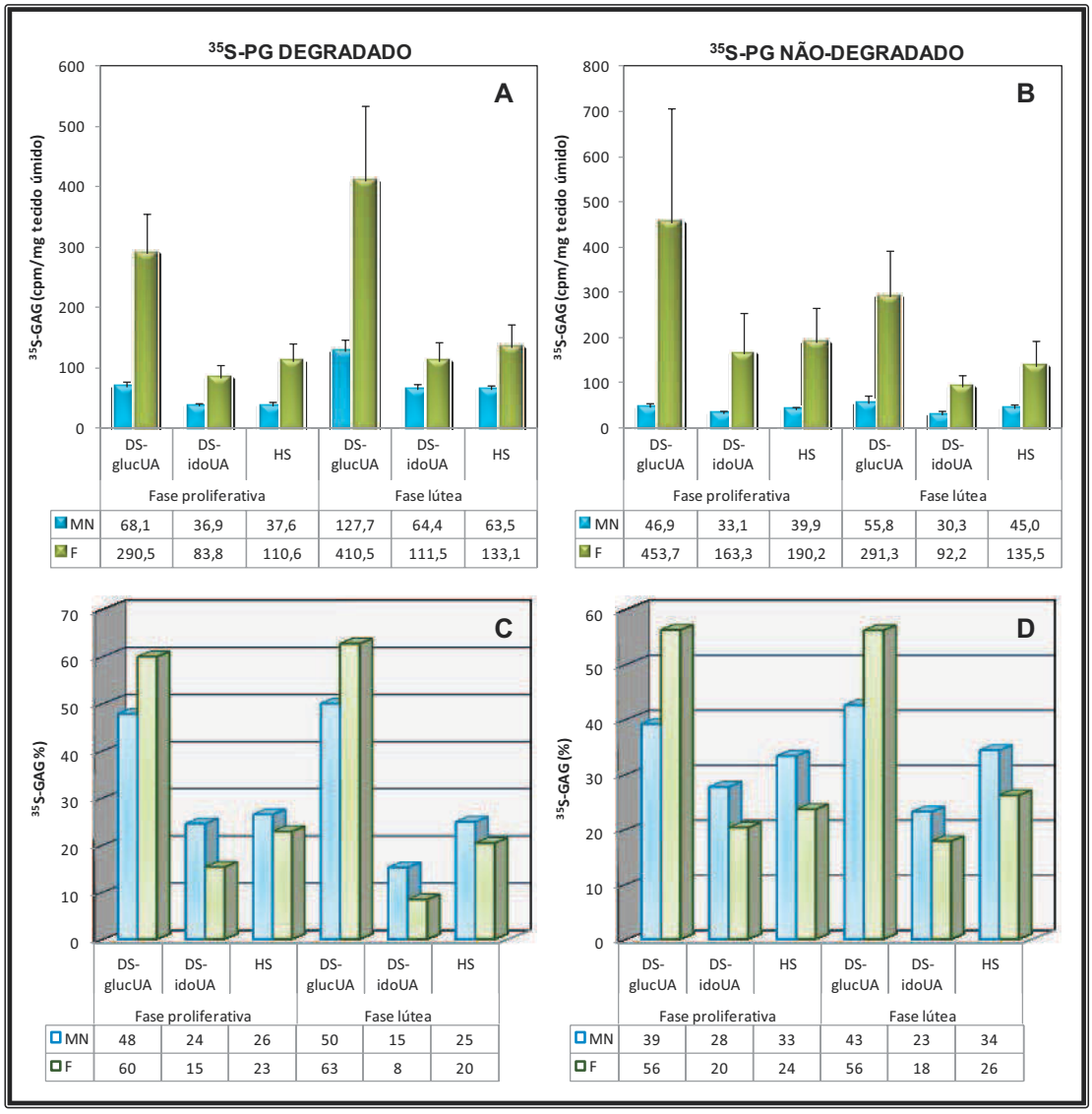


FIGURA 65: DISTRIBUIÇÃO DE ^{35}S-DERMATAM SULFATO (RICO EM ÁCIDO β-D-GLUCURÔNICO E EM ÁCIDO α-L-IDURÔNICO) E ^{35}S-HEPARAM SULFATO OBTIDOS DE FRAGMENTOS TECIDUAIS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. Os valores médios das concentrações de cada ^{35}S-glicosaminoglicano obtido de fragmentos teciduais (^{35}S-PG degradado e ^{35}S-PG não-degradado) de fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente, nas duas fases do ciclo menstrual são expressos em cpm/mg de tecido úmido; ^{35}S-GAG: ^{35}S-glicosaminoglicanos; DS-glucUA: ^{35}S-dermatam sulfato rico em ácido β-D-glucurônico; DS-idoUA: ^{35}S-dermatam sulfato rico em ácido α-L-idurônico; HS: ^{35}S-heparam sulfato; MN: tecido mamário normal; F: fibroadenoma.

A composição em dissacarídeos (ΔDi-4S/ΔDi-6S, contendo ácido β-D-glucurônico e α-L-idurônico) também não foi diferente entre os ^{35}S-proteoglicanos extraídos com hidrocloreto de guanidina e não-extraídos.

3.6 *^{35}S–PROTEOGLICANOS DE MATRIZ – DECORIM E VERSICAM – EM FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL*

Para identificar os ^{35}S-proteoglicanos sintetizados no fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente em condições de cultura de tecidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, transferidos para membrana de nitrocelulose e posteriormente revelados com anticorpos monoclonais anti-decorim e anti-versicam pela técnica de *immunoblotting*, como feito anteriormente para os proteoglicanos não marcados. A Figura 66 mostra os resultados obtidos.

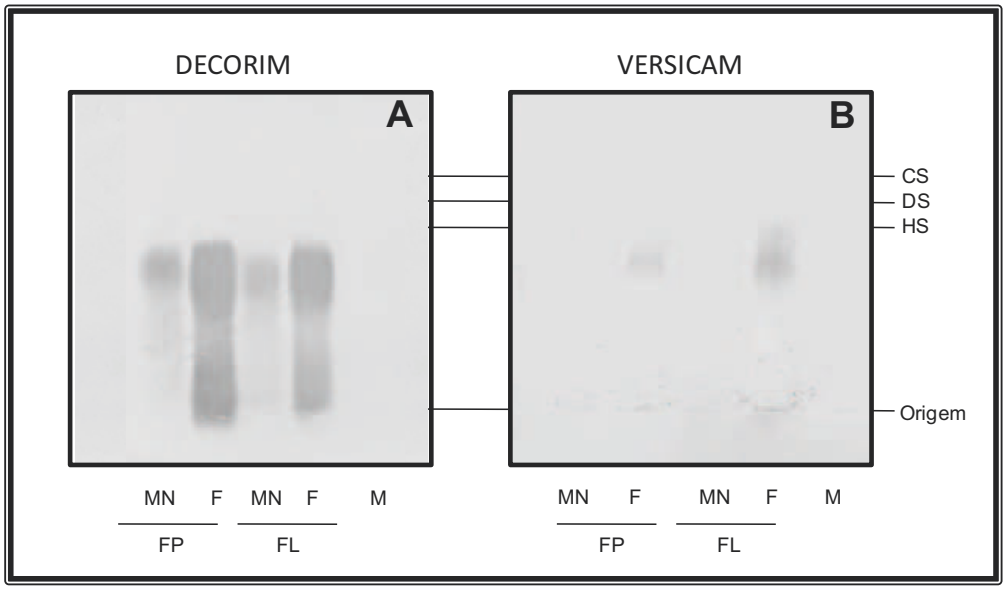


FIGURA 66: *IMMUNOBLOTTING* DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS – DECORIM E VERSICAM – DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE. (A) *Immunoblotting* revelado com anticorpo monoclonal anti-decorim e (B) *immunoblotting* revelado com anticorpo monoclonal anti-proteoglicano humano de alto peso molecular (versicam) dos ^{35}S-proteoglicanos extraídos de fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente na fase proliferativa e fase lútea do ciclo menstrual, após eletroforese em gel de agarose, tampão PDA, como descrito em Métodos. MN: tecido mamário normal; F: fibroadenoma; FP: fase proliferativa do ciclo menstrual; FL: fase lútea do ciclo menstrual.

Decorim foi identificado tanto no fibroadenoma quanto no tecido mamário normal nas duas fases do ciclo pela reação positiva do anticorpo anti-decorim com o esqueleto protéico do ^{35}S-proteoglicano. Já versicam foi detectado somente no fibroadenoma, também nas fases proliferativa e lútea.

Para analisar o esqueleto protéico, ^{35}S-proteoglicanos extraídos do tecido tumoral e normal foram digeridos com condroitinase AC e B para remover a maior parte das cadeias de ^{35}S-glicosaminoglicanos. Os produtos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS/PAGE), revelado com nitrato de prata para visualização das proteínas presentes ou transferidos para membrana de nitrocelulose, posteriormente revelada com anticorpos monoclonais anti-decorim e anti-versicam. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 67.

No tecido mamário normal, observa-se que o anticorpo anti-decorim reconheceu uma banda protéica com cerca de 50 kDa, após a digestão dos ^{35}S-proteoglicanos com condroitinase AC (Figura 67-B-2) e B (Figura 67-B-3) nas fases proliferativa e lútea do ciclo menstrual, o que indica a presença de ^{35}S-dermatam sulfato híbrido (ácido D-glucurônico ácido L-idurônico).

No fibroadenoma, também foi identificado decorim nas duas fases do ciclo menstrual após digestão com as duas enzimas (Figura 67-B-2/3), o que confirma novamente a presença de ^{35}S-dermatam sulfato híbrido neste tecido. A banda de proteína também apresentou peso molecular, com cerca de 50 kDa.

Os mesmos procedimentos experimentais foram realizados para o versicam. Embora tenha sido identificado no fibroadenoma, o ^{35}S-proteoglicano controle (Figura 71-C-1) e o esqueleto protéico após degradação com condroitinase AC (Figura 71-C-2) e B (Figura 71-B-CB) não foram identificados na eletroforese em gel poliacrilamida. Isto se deve ao alto peso molecular da proteína e do próprio proteoglicano.

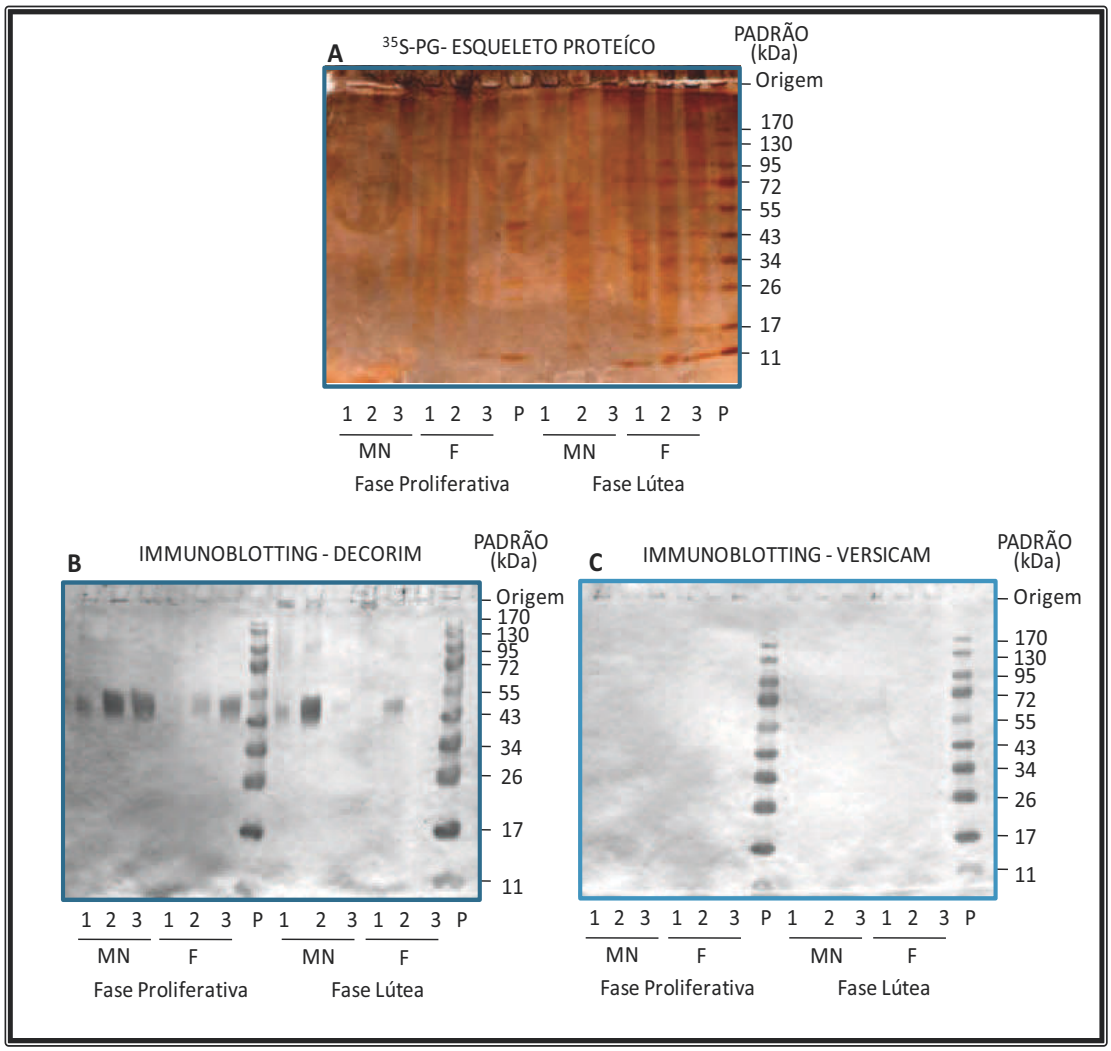


FIGURA 67: ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (GRADIENTE DE 3-20%) E *IMMUNOBLOTTING* DOS ^{35}S-PROTEOGLICANOS – DECORIM E VERSICAM – DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE. SDS/PAGE (gradiente de 3 a 20%) dos ^{35}S-proteoglicanos de fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente nas duas fases do ciclo menstrual após degradação com condroitinases AC e B foi revelado com nitrato de prata (A) para análise do esqueleto protéico ou os ^{35}S-proteoglicanos foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose e revelados com anticorpo monoclonal anti-decorim (B) e com anticorpo monoclonal anti-proteoglicano humano de alto peso molecular – vesicam (C). 1: ^{35}S-proteoglicanos; 2: ^{35}S-proteoglicano degradado com condroitinase AC; 3: ^{35}S-proteoglicano degradado com condroitinase B; P: padrão de peso molecular (kDa).

4 IMUNOLOCALIZAÇÃO DOS PROTEOGLICANOS – DECORIM E VERSICAM – DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL

As análises bioquímicas descritas até aqui demonstraram alterações importantes na composição de proteoglicanos e glicosaminoglicanos nos tecidos estudados. Verificamos não só diferenças importantes entre o fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente nas duas fases do ciclo menstrual, como também variações significativas no tecido mamário normal em função das oscilações hormonais neste período.

Os dados bioquímicos obtidos são de grande importância na compreensão dos níveis de expressão e modificações estruturais destas moléculas, o que contribui para melhor entendimento das alterações fisiológicas/fisiopatológicas dos tecidos. Entretanto, não permitem a obtenção de informações biológicas como, localização, distribuição e interações com outros componentes da matriz extracelular, de modo a proporcionar melhor entendimento das mudanças na arquitetura dos tecidos.

Para analisar a distribuição dos proteoglicanos estudados no fibroadenoma e tecido mamário normal, a técnica de imunofluorescência foi utilizada. Nesta técnica são utilizados anticorpos específicos que reconhecem o esqueleto protéico dos proteoglicanos nos tecidos previamente fixados, congelados e cortados em seções como descrito em Métodos. Foram utilizados anticorpos monoclonais anti-decorim e anti-versicam. Alternativamente, também foram marcadas proteínas de citoesqueleto (filamentos de actina) por incubação dos cortes com faloidina conjugada com Alexa Fluor™ 568 (vermelho) e os núcleos (DNA) com DAPI (azul) também como descrito em Métodos. As imagens obtidas foram digitalizadas por microscopia confocal.

A Figura 68 mostra a imunolocalização de decorim (verde) e versicam (vermelho) no fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente na fase proliferativa do ciclo menstrual, com a marcação dos núcleos das células (azul). Observa-se que apenas decorim foi marcado no tecido mamário normal, com maiores concentrações

nos lóbulos mamários (ductos glandulares), especificamente no estroma intra-lobular, onde há maior concentração de células e, menor no estroma inter-lobular.

No fibroadenoma, os dois proteoglicanos – decorim e versicam – foram detectados, ambos com marcação mais intensa na região glandular (periductal). Diferentemente do tecido mamário normal, o estroma presente no fibroadenoma apresentou maior marcação de decorim e, em quase todas as regiões, colocalização de versicam.

A Figura 69 apresenta a dupla marcação destes mesmos proteoglicanos – decorim e versicam – no tecido tumoral e normal na fase lútea do ciclo menstrual.

O primeiro fato observado no tecido mamário normal foi o aumento significativo no número de células em relação à fase proliferativa, principalmente no estroma intra-lobular. Este dado pode ser também observado com a maior marcação do citoesqueleto (filamentos de actina) pela incubação com faloidina em vermelho nas Figuras 71 e 72.

Semelhante à fase proliferativa, somente decorim apresentou reação positiva no tecido normal. No entanto, a intensidade na marcação foi proporcional as modificações morfofisiológicas do tecido, sugerindo assim, aumento na síntese destes compostos na segunda fase do ciclo menstrual, o que está de acordo com os dados bioquímicos obtidos.

No fibroadenoma, decorim e versicam foram também identificados, como ocorreu na fase proliferativa, principalmente na região dos ductos mamários, onde houve maior co-localização destes proteoglicanos. Entretanto, a marcação de versicam foi maior que a do decorim em regiões mais afastadas dos ductos (região periductal.

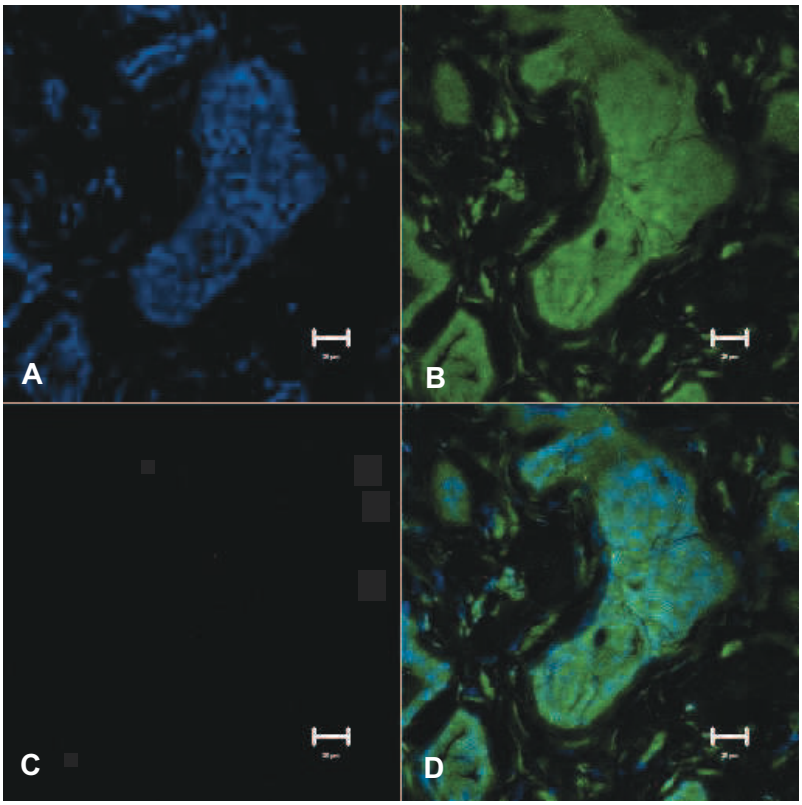
A distribuição dos proteoglicanos nos tecidos nas duas fases pode ser melhor observada na Figura 70, que apresenta projeções com maior aumento.

Nestas imagens, fica mais evidente no tecido mamário normal nas duas fases do ciclo menstrual que a marcação de decorim nos lóbulos mamários foi maior na região periductal, especificamente na matriz que circunda as células desta região. Este dado pode ser também visto na Figura 71, que apresenta à dupla-marcação citoesqueleto/decorim.

Da mesma maneira que no tecido normal, no fibroadenoma ocorreu maior marcação dos proteoglicanos – decorim e versicam – na região periductal, ao redor das células nas duas fases do ciclo menstrual (também apresentados nas Figuras 71 e 72). Verifica-se que a distribuição e colocalização dos dois proteoglicanos na fase proliferativa foram mais organizadas e regulares no estroma intra-lobular, que na fase lútea.

FIGURA 68: MICROSCOPIA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DE PROTEOGLICANOS – DECORIM E VERSICAM – DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NA FASE PROLIFERATIVA DO CICLO MENSTRUAL. Cortes (20µm) obtidos em criostato de fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente na fase proliferativa do ciclo menstrual foram imuno-marcados. Após tratamento inicial como descrito em Métodos, os cortes foram lavados (10 X, PBS) e incubados com anticorpo monoclonal anti-decorim (1:150 em PBS) por 1 hora. Nova lavagem com PBS foi realizada e os tecidos foram incubados com anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor™ 594 (1:150 em PBS, vermelho) por 1 hora. A segunda marcação foi feita seguindo os mesmos procedimentos. Os cortes foram incubação com anticorpo monoclonal anti-versicam e posteriormente com anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor™ 488 (1:150 em PBS, verde) por 1 hora cada. DNA foi marcado com DAPI (1:1000 em PBS, azul) por 5 minutos. Todas as incubações foram realizadas à temperatura ambiente em câmara úmida. Os cortes foram lavados com PBS (10 X) e após uma rápida lavagem com água destilada as lâminas foram montadas com Fluoromount G (2:1). As imagens digitalizadas foram obtidas por microscopia confocal. (A) DAPI (Núcleo); (B) decorim; (C) versicam; (D) Sobreposição de imagens. Barra: 20µm.

TECIDO MAMÁRIO NORMAL
FASE PROLIFERATIVA



FIBROADENOMA
FASE PROLIFERATIVA

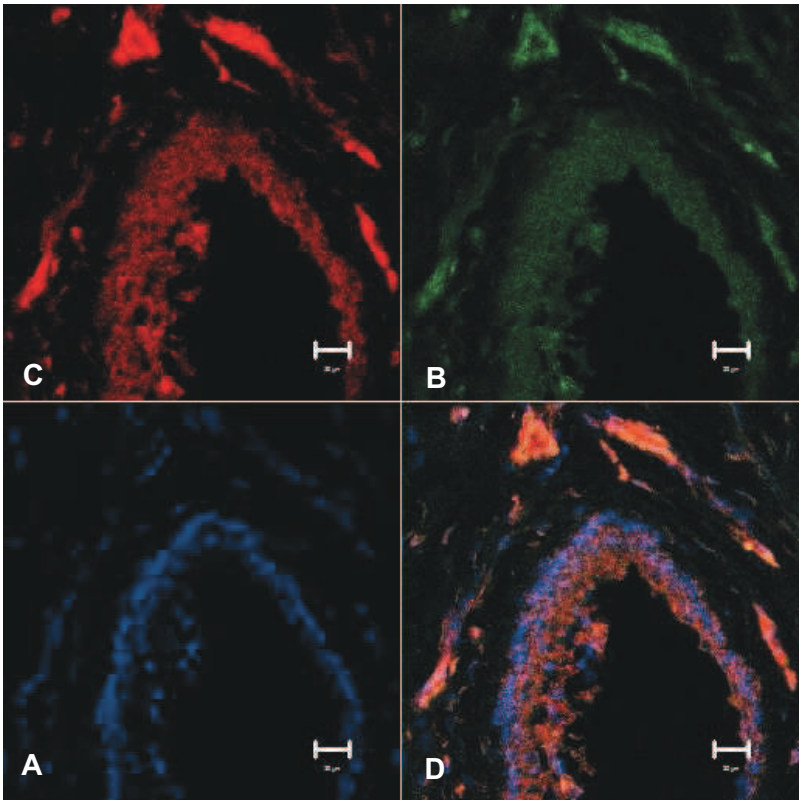
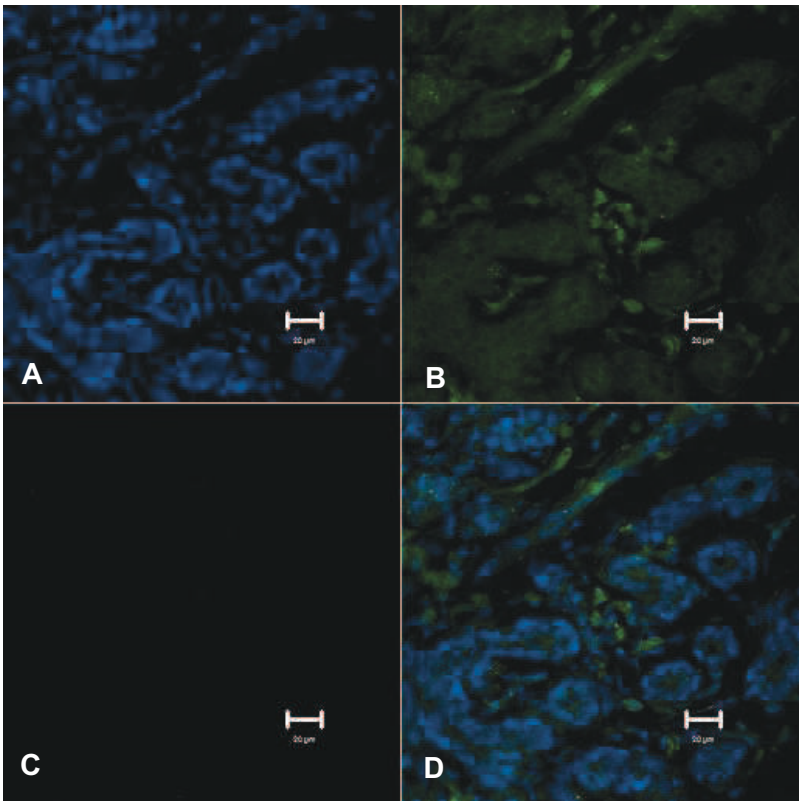


FIGURA 69: MICROSCOPIA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DE PROTEOGLICANOS – DECORIM E VERSICAM – DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NA FASE LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. Os cortes do tecido tumoral e normal obtidos na fase lútea do ciclo menstrual foram submetidos aos mesmos procedimentos experimentais descritos na Figura 68. As imagens digitalizadas também foram obtidas por microscopia confocal. (A) DAPI (Núcleo); (B) decorim; (C) versicam; (D) Sobreposição de imagens. Barra: 20μm.

TECIDO MAMÁRIO NORMAL
FASE LÚTEA



FIBROADENOMA
FASE LÚTEA

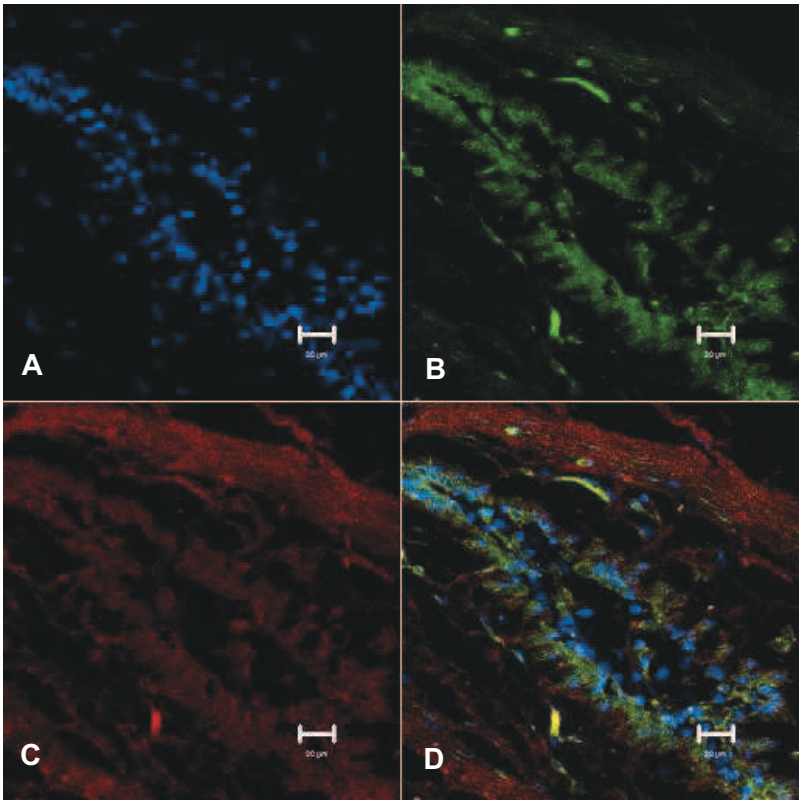
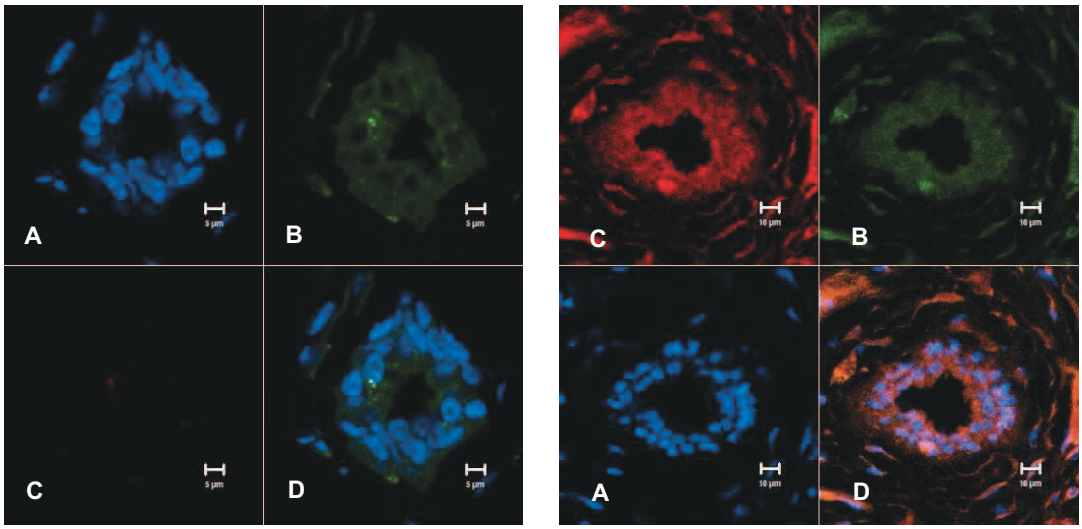


FIGURA 70: MICROSCOPIA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DE PROTEOGLICANOS – DECORIM E VERSICAM – DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NA FASE PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. Os cortes do tecido tumoral e normal obtidos na fase proliferativa e lútea do ciclo menstrual foram submetidos aos mesmos procedimentos experimentais descritos na Figura 68. As imagens digitalizadas também foram obtidas por microscopia confocal. (A) DAPI (Núcleo); (B) decorim; (C) versicam; (D) Sobreposição de imagens. Barra: 5 μm (tecido mamário normal) e 10 μm (fibroadenoma).

TECIDO MAMÁRIO NORMAL **FIBROADENOMA**

FASE PROLIFERATIVA



TECIDO MAMÁRIO NORMAL **FIBROADENOMA**

FASE LÚTEA

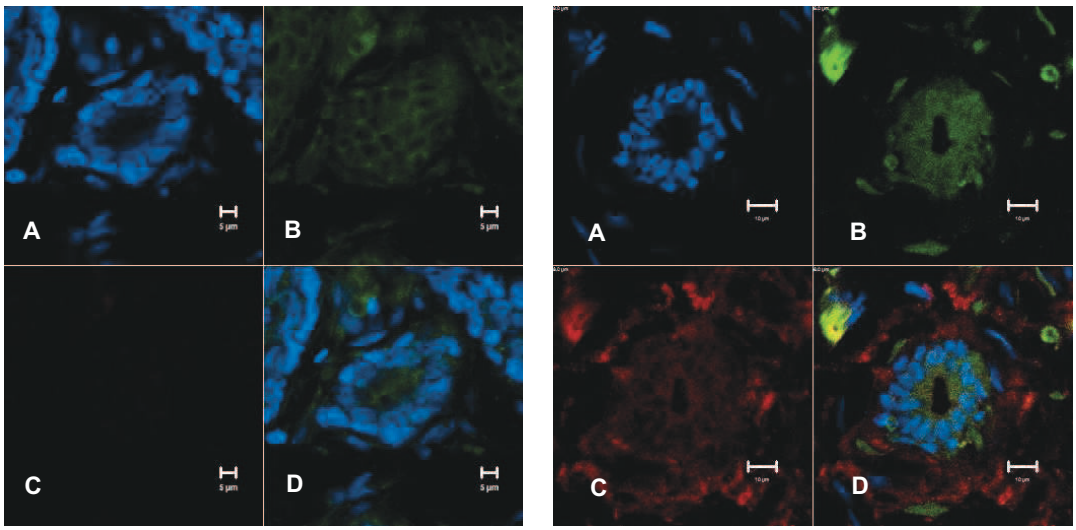


FIGURA 71: ANÁLISE DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE DECORIM E ACTINA NO FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. Inicialmente os cortes (20µm) de fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente na fase proliferativa do ciclo menstrual foram tratados como descrito em Métodos. Os cortes foram lavados (10 X, PBS) e incubados com anticorpo monoclonal anti-decorim (1:150 em PBS) por 1 hora. Nova lavagem com PBS foi realizada e os tecidos foram incubados com anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor™ 488 (1:150 em PBS, verde) por 1 hora. Para marcação do citoesqueleto, os cortes foram incubados com faloidina conjugada com Alexa Fluor™ 568 (1:150 em PBS, vermelho) por 1 hora. Todas as incubações foram realizadas à temperatura ambiente em câmara úmida. Os cortes foram lavados com PBS (10 X) e após uma rápida lavagem com água destilada as lâminas foram montadas com Fluoromount G (2:1). As imagens digitalizadas foram obtidas por microscopia confocal. (A) Decorim; (B) Filamentos de actina (citoesqueleto); (C) Sobreposição de imagens. Barra: 20µm.

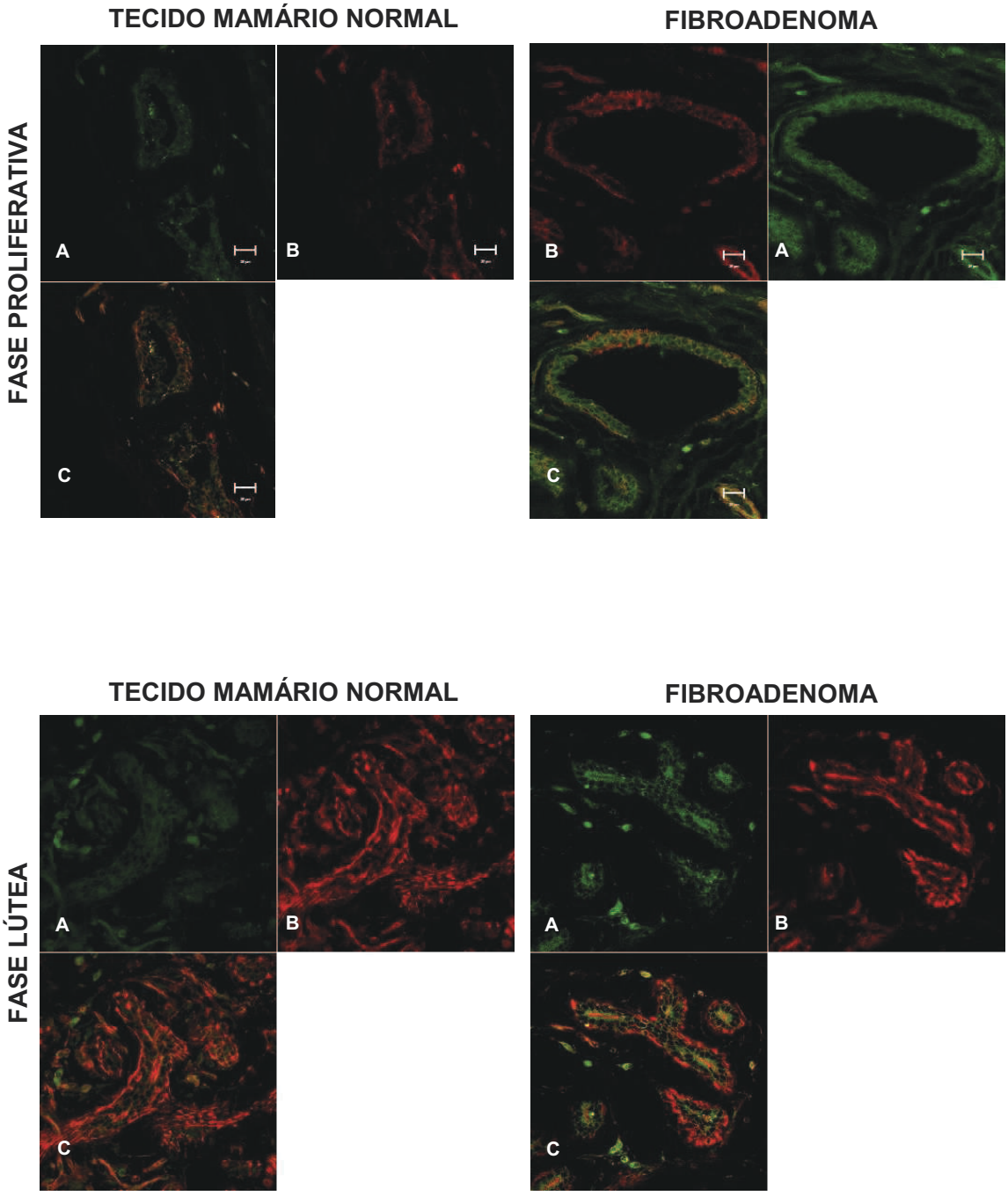
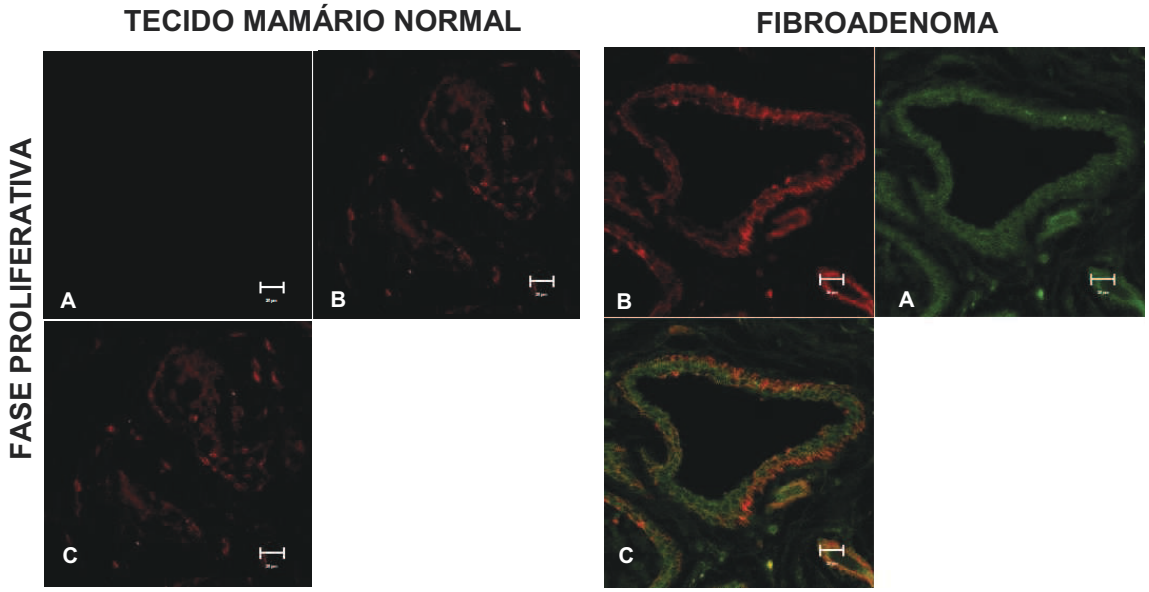
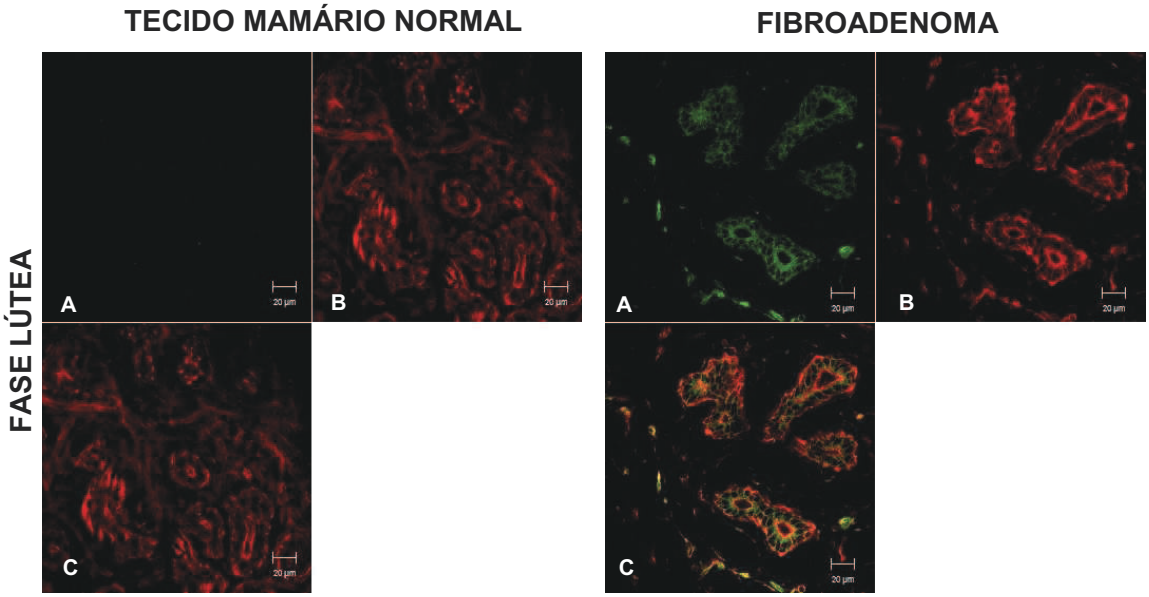

TECIDO MAMÁRIO NORMAL
FIBROADENOMA
FASE PROLIFERATIVA
A
B
C
B
A
C
TECIDO MAMÁRIO NORMAL
FIBROADENOMA
FASE LÚTEA
A
B
C
A
B
C

FIGURA 72: ANÁLISE DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE VERSICAM E ACTINA NO FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL. Os cortes do tecido tumoral e normal obtidos na fase proliferativa e lútea do ciclo menstrual submetidos aos mesmos procedimentos experimentais descritos na Figura 71, com modificação apenas do anticorpo primário usado (anticorpo monoclonal anti-versicam). As imagens digitalizadas também foram obtidas por microscopia confocal. (A) Versicam; (B) Filamentos de actina (citoesqueleto); (C) Sobreposição de imagens. Barra: 20μm.


TECIDO MAMÁRIO NORMAL
FIBROADENOMA
FASE PROLIFERATIVA
A
B
C
B
A
C


TECIDO MAMÁRIO NORMAL
FIBROADENOMA
FASE LÚTEA
A
B
C
A
B
C

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*), cerca de 7,9 milhões de pessoas no mundo morreram devido a algum tipo de câncer em 2007. Entre as mulheres, o câncer de mama é um dos principais responsáveis pelo índice de mortalidade feminina no mundo.

A frequência de tumores benignos também é muito alta. Embora muitas vezes não representem grande problema para os seus portadores, os tumores benignos têm grande interesse prático por sua frequência e pelas consequências que podem ter.

Entre os tumores benignos estão os nódulos mamários, que representam cerca de 80% das massas palpáveis presentes (NAZÁRIO et. al., 2007).

O fibroadenoma, um tumor benigno misto constituído por tecido estromal e glandular, é a segunda neoplasia mais frequente nas glândulas mamárias femininas, precedida apenas pelo carcinoma. É a afecção mais comum entre mulheres jovens, com idades entre 20 e 30 anos, assintomática em 25% dos casos e com múltiplas lesões em 13 a 20% dos casos (COLE et. al., 1991; ALLE et. al., 1997; GREENBERG et. al., 1998). Alguns estudos indicam, ainda, o fibroadenoma como fator de risco para o desenvolvimento de carcinoma mamário, principalmente o fibroadenoma complexo, conceituado como aquele que possui alterações císticas, papilares, adenose esclerosante ou calcificações epiteliais no seu interior (PICK et. al., 1984; DUPONT et. al., 1994). Em decorrência destes fatos justifica-se a importância de seu estudo.

Sabe-se que tanto a mama normal como as neoplasias benignas e malignas sofrem influências de hormônios esteróides – estrógeno e progesterona. Estes regulam o desenvolvimento das glândulas mamárias na puberdade e na gravidez e estão associados com a iniciação, o desenvolvimento e a progressão de câncer de mama (HANSEN & BISSELL, 2000).

Estrogênios, de um modo geral, estão envolvidos com a proliferação celular e, portanto, com o desenvolvimento de órgãos sexuais e de tecidos relacionados à reprodução. Já progesterona está relacionada com o controle da proliferação e adesão celulares e da apoptose (DESREUX et. al., 2001; WIEBE et. al., 2006).

Estes hormônios, produzidos em períodos cíclicos durante a fase reprodutora feminina, exercem suas funções ligando-se a seus receptores intracelulares ERs e PRs, presentes nos diferentes tecidos, desencadeando uma série de eventos bioquímicos que resultam na indução ou na inibição da transcrição de genes específicos. Entretanto, a expressão destes receptores varia de acordo com o tipo celular (TUNG et. al., 1993; VEGETO et. al., 1993).

Embora os hormônios esteróides tenham grande importância, o controle da proliferação e da diferenciação, tanto de células mamárias normais quanto de neoplasias, não é regulado exclusivamente por eles. Há também a participação de outros fatores como componentes da matriz extracelular (HOWLETT & BISSELL, 1993) e fatores de crescimento, o que evidencia o alto grau de complexidade no controle das sinalizações (IGNOTZ & MASSAGUE, 1986; YAMAGUTHI et. al., 1990; STREULI et. al., 1993; BERTHOIS et. al., 1989; HASLAN et. al., 1992; CHRYOGELOS et. al., 1994).

Proteoglicanos, importantes componentes da superfície celular e da matriz extracelular, participam dos processos de organização, desenvolvimento e manutenção destes tecidos, mediando interações célula-célula e célula-matriz extracelular (FERNIG et. al., 1994; PENC et. al., 1998; GALAGHER & LION, 2000). Vários trabalhos têm relatado o envolvimento direto ou indireto (modulando a atividade de fatores de crescimento) de proteoglicanos e glicosaminoglicanos na diferenciação, adesão e migração celular (DIETRICH et. al., 1982; ADAMS et. al., 1993; WIGHT et. at., 1991).

Para aumentar ainda mais o grau de complexidade, estudos têm demonstrado que componentes de matriz extracelular na glândula mamária também sofrem influência de hormônios ovarianos. Ferguson et. al. (1992), por imunofluorescência indireta com anticorpos específicos, demonstraram que laminina, fibronectina e colágeno tipos IV e V sofrem alterações na sua distribuição durante o ciclo menstrual, enquanto colágeno tipos I, III, VI e VII permanecem inalterados. No entanto, poucos trabalhos são encontrados na literatura analisando os efeitos de estrógeno e progesterona sobre a síntese de glicosaminoglicanos em glândulas mamárias (FERGUSON et. al., 1992; SUNIL et. al., 2000). Nenhum trabalho foi encontrado em fibroadenoma.

Com o objetivo de investigar os efeitos de hormônios sobre os níveis de expressão e as possíveis modificações estruturais destas macromoléculas no fibroadenoma e no tecido mamário normal, o presente trabalho teve por objetivo analisar os proteoglicanos presentes nos tecidos e sintetizados durante a fase proliferativa e a fase lútea do ciclo menstrual.

Inicialmente, os proteoglicanos presentes em ambos os tecidos – fibroadenoma e tecido mamário normal – de 12 casos foram extraídos, analisados e quantificados. Em todos os casos, as concentrações de proteoglicanos estavam aumentadas no tecido tumoral, em comparação com o tecido normal (controle pareado). Entretanto, as razões entre tumor e controle normal pareado variaram muito entre os diferentes casos. Essa variação não é função do tamanho do tumor, nem da idade das pacientes, nem do índice de massa corpórea, nem dos níveis séricos de progesterona.

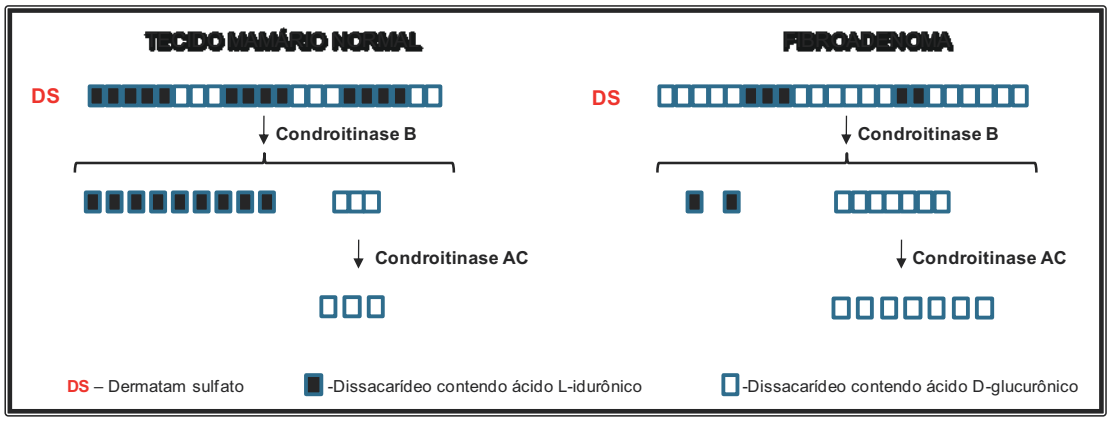
Em 16 dos nossos casos, o tamanho do tumor não permitiria a análise dos proteoglicanos presentes, porque ficaria abaixo do nível de detecção do método de coloração com azul de toluidina (0,5 µg de proteoglicano). Além disso, havia interesse em determinar quais os proteoglicanos sintetizados naquele momento nos tecidos. Por isso, explantes de tecidos (25 casos) foram colocados em condições de cultura, e os proteoglicanos sintetizados foram metabolicamente marcados pela incorporação de ^{35}S-sulfato. Novamente, a velocidade de síntese foi maior no fibroadenoma do que no tecido mamário normal pareado.

Aumento na concentração de proteoglicanos foi descrito em tumores malignos (SAMPAIO et. al., 1977; OLSEN et. al., 1988; IOZZO 1993; VIJAYAGOPAL et. al., 1998) e benignos (TAKEUCHI et. al., 1976; SOBUE et. al., 1987; BERTO et. al., 2003). Em leiomioma humano, há cerca de 1,7 vezes mais proteoglicanos do que no miométrio normal. Portanto, os nossos resultados estão de acordo com os encontrados na literatura, embora para fibroadenoma não tenhamos conhecimento de nenhum trabalho caracterizando as alterações quantitativas destas moléculas.

Nosso trabalho demonstrou também que os principais glicosaminoglicanos do tecido mamário normal e do fibroadenoma são dermatam sulfato e heparam sulfato. Dermatam sulfato é um glicosaminoglicano constituído por unidades dissacarídicas formadas por N-acetilgalactosamina e ácido α-L-idurônico ou ácido β-D-glucurônico, em maior ou menor proporção. Dermatam sulfato e condroitim sulfato são

chamados, em conjunto galactosaminoglicanos, porque sua hexosamina é N-acetilgalactosamina. As vias biossintéticas de ambos seguem as mesmas etapas, exceto que, para a síntese de dermatam sulfato alguns resíduos de ácido β-D-glucurônico são epimerizados a ácido α-L-idurônico, reação esta catalisada pela C5 epimerase (IOZZO, 1998).

O grau de epimerização varia muito, dependendo do tecido, espécie animal e condição fisiopatológica (POBLACION & MICHELACCI, 1986). Em nenhum caso descrito até o momento, a epimerização foi completa (ou seja, dermatam sulfato contendo apenas ácido α-L-idurônico) (POBLACION & MICHELACCI, 1986). Também no nosso caso, o dermatam sulfato de ambos os tecidos foi susceptível à ação de condroitinases AC e B de *F. heparinum*, indicando que se trata de um polissacarídeo híbrido contendo resíduos de ácido β-D-glucurônico (regiões susceptíveis à ação de condroitinase AC) e de ácido α-L-idurônico (regiões susceptíveis à ação de condroitinase B) no mesmo polímero. Porém, o dermatam sulfato do fibroadenoma contém menos ácido α-L-idurônico, indicando menor grau de epimerização.



Este resultado é semelhante ao obtido em leiomioma humano (BERTO et. al., 2001, 2003).

Entre os resíduos contendo ácido β-D-glucurônico e α-L-idurônico, as maiores diferenças entre tumor e tecido normal foram obtidas nas proporções de dissacarídeos 4-sulfatado.

Dissacarídeo 6-sulfatado só foi detectado nas moléculas marcadas, e apenas nas regiões contendo β-D-glucurônico (susceptível a condroitinase AC). Como este tipo de sulfatação não foi encontrado nos polímeros não-marcados (sintetizados *in vivo*), é possível que a 6-sulfatação só tenha acontecido nas condições de cultura. Outra possibilidade é que as quantidades de ΔDi6S formadas estivessem abaixo do nível de detecção da reação com prata em meio alcalino (cromatografia em papel). Não foram detectados dissacarídeos 6-sulfatados contendo ácido α-L-idurônico em nenhum dos tecidos analisados.

O aumento da proporção de unidades dissacarídicas contendo ácido D-glucurônico nos glicosaminoglicanos já foi descrito em diferentes tumores (principalmente malignos), entre eles carcinoma mamário, liposarcoma e leiomioma (SOBUE et. al., 1987; ALINI et. al., 1991; FERGUSON et. al., 1992; IOZZO & COHEN, 1993; VIJAYAGOPAL et. al., 1998; DELEHEDDE et. al., 2001; BERTO et. al., 2001; 2003; SUWIWAT et. al., 2004). A presença de resíduos 4- e 6-sulfatados em maior ou menor proporção variam entre os tecidos e também com o estágio de desenvolvimento tumoral (HAUSSER et. al., 1993; TSARA et. al., 2002; BERTO et. al., 2001; 2003; SKAANDALIS et. al., 2007).

O menor grau de epimerização dos galactosaminoglicanos no fibroadenoma pode ser devido a dois fatores: (a) aumento na síntese dessas macromoléculas – neste caso, a C5-epimerase poderia estar em concentração limitante, levando à queda na proporção de resíduos de ácido α-L-idurônico nos polímeros (TIEDEMANN et.al., 2001); (b) queda na expressão de C5-epimerase no tumor. É possível, ainda, que ambos os fatores, combinados, respondam pelas alterações de estrutura aqui descritas. De fato, estudos recentes demonstraram que a expressão da D-glucuronil C5-epimerase está reduzida em câncer mamário (ESHECHENKO et.al., 2007, GRIOGORIEVA et.al., 2008). Entretanto, este ponto ainda deve ser esclarecido.

Essas alterações na composição química de glicosaminoglicanos nos tecidos tumorais, como as observadas em nossos resultados e em outros trabalhos, podem levar a mudanças nas vias bioquímicas e, em conjunto com outros fatores, promover o desenvolvimento de patologias (PENC et. al., 1998; FERNIG et. al., 2000; PYE & GALLAGHER, 1999). Isto porque, nos últimos anos, têm-se demonstrado que as sequências dissacarídicas das cadeias de glicosaminoglicanos servem como regiões de ligação para muitas proteínas regulatórias como, por exemplo, fatores de

crescimento, desencadeando importantes processos celulares, como diferenciação, proliferação e apoptose (FERNIG & GALLAGHER, 1994; LYON et. al., 1998; PENC et. al., 1998; DEAKIN et. al., 1999). Por exemplo, o HGF que é produzido por fibroblastos do estroma mamário, e tem importante função na comunicação entre estroma e epitélio mamário, bem como na proliferação celular, pode ativar vias de sinalização ligando-se a cadeias de dermatam sulfato e heparam sulfato, em sequência dissacarídicas específicas (LYON et. al., 1994; 1998; SERGEANT et. al. 2000). Entretanto, apesar do progresso nestes estudos, muito ainda precisa ser estudado.

O esqueleto protéico de dois proteoglicanos de matriz extracelular foi pesquisado por *immunoblotting* e por imunofluorescência. Decorim está presente no tecido mamário normal e no fibroadenoma, enquanto versicam só foi identificado no tecido tumoral.

O esqueleto protéico do decorim presente em ambos os tecidos apresentaram o mesmo peso molecular (cerca de 50 kDa).

Por imunofluorescência, verificou-se que a marcação de decorim no tecido mamário normal foi mais intensa nas regiões dos lóbulos mamários (estroma intra-lobular), especialmente nas regiões periductais.

Já no fibroadenoma, foi observada a marcação de ambos os proteoglicanos – decorim e versicam – na região periductal, especificamente no estroma e, menor nas regiões mais afastadas. A marcação de decorim apresentou maior intensidade que a do versicam, e maior que a do tecido normal, o que está de acordo com os dados bioquímicos obtidos.

Decorim é um membro da classe das proteínas ricas em leucina (*SLRPs*), que tem importante papel na organização e acomodação de fibras de colágeno na matriz extracelular de diferentes tecidos (IOZZO, et. al., 1998) e nos processos de proliferação e controle do ciclo celular (YAMAGUCHI, et. al., 1990).

Alteração na expressão deste proteoglicano já foi descrita em vários tumores, entre eles carcinoma mamário (LEYGUE et. al., 2000), câncer de pâncreas (KONINGUER et. al., 2004), e leiomioma (BERTO, et. al., 2001; 2003). Também já foram descritas alterações na estrutura deste proteoglicano nos tumores. Berto et. al. (2003) demonstraram que o decorim presente em leiomioma é glicosilado com cadeias de dermatam sulfato mais longas e mais ricas em ácido β-D-glucurônico.

Versicam é um reconhecido modulador de interações célula-célula e célula matriz extracelular, bem como nos processos de adesão, migração e proliferação celular. A expressão elevada de versicam foi descrita em vários tumores malignos (adenocarcinoma em mama, próstata e colón), principalmente em regiões com grandes quantidades de ácido hialurônico e, está associada com o grau de malignidade do tumor (YAMAGATA et. al., 1989; BROWN et. al., 1999; RICCIARDELLI et. al., 2002; SUWIWAT et. al., 2004).

A expressão de todas as isoformas de versicam está aumentada em câncer de mama (KISCHEL et. al., 2009) e o domínio G3 do seu esqueleto protéico parece ser importante na invasão local e sistêmica de câncer de mama (YEE et. a., 2007). Versicam também é superexpresso em leiomioma uterino (OHARA et. al., 2009).

Demonstrou-se que em útero de camundongo, a expressão e a distribuição de versicam são reguladas por hormônios esteróides ovarianos, tendo sido detectadas as isoformas V0, V1 e V3 (SALGADO et. al., 2009).

Versicam parece se ligar ao receptor de superfície celular TLR2 (*Toll-Like Receptor 2*) e seus correceptores TLR6 e CD14, desencadeando a produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF-α, que aumenta metástase tumoral (WANG et. al., 2009).

Estes dados mostram que a superexpressão de versicam está bem documentada em câncer (revisão em RICCIARDELLI et. al., 2009), mas há poucos trabalhos demonstrando a expressão de versicam em tumores benignos (NORIAN et. al., 2009). Em fibroadenoma, até o sabemos, este é o primeiro trabalho a documentar a expressão de versicam.

A presença de heparam sulfato foi confirmada em ambos os tecidos, normal e tumoral, após incubação com heparitinase II. As concentrações de heparam sulfato foram também superiores no fibroadenoma em relação ao tecido mamário normal. Entretanto, a proporção deste glicosaminoglicano no tumor é menor do que a do tecido normal. Como proteoglicanos de heparam sulfato estão presentes principalmente em superfície celular e membrana basal, estes resultados sugerem que a síntese de componentes de matriz extracelular é ainda maior que a proliferação celular, em relação ao tecido normal, o que pode justificar os resultados obtidos.

Entre os ^{35}S-proteoglicanos do tecido mamário normal, metade foi secretada para o meio de cultura e o restante permaneceu no fragmento tecidual, enquanto no tumor essa proporção foi de 1/3. As moléculas do meio continham maiores proporções de dermatam sulfato mais rico em ácido β-D-glucurônico (principalmente Di4S) que as extraídas dos fragmentos teciduais em ambos os tecidos. Já as proporções de ^{35}S-heparam sulfato foram maiores nos fragmentos.

Além de indicar maior velocidade de síntese no tumor, como visto, esta distribuição sugere que o aumento na concentração de proteoglicanos nos fragmentos de fibroadenoma seja em decorrência da presença de versicam (que possivelmente é glicosilado com condroitim sulfato ou dermatam sulfato rico em ácido D-glucurônico), que não está presente no tecido normal.

Durante os processos de extração dos fragmentos teciduais de ambos os tecidos, ocorreu grande variação na extração das moléculas marcadas com ^{35}S-sulfato, sendo que parte foi extraída na forma de ^{35}S-proteoglicanos e parte foi extraída na forma de ^{35}S-glicosaminoglicanos (^{35}S-proteoglicanos não extraídos com hidrocloreto de guanidina). Este rendimento foi menor no tecido tumoral do que no tecido normal. Em ambos, a extração de proteoglicanos contendo dermatam sulfato mais rico em ácido α-L-idurônico foi menor, assim como os proteoglicanos de heparam sulfato.

Em ambos os tecidos, o dermatam sulfato mais rico em ácido α-L-idurônico foi extraído com menor eficiência, possivelmente representando moléculas de decorim (que contém dermatam sulfato), já que estas ficam agregadas às fibras de colágeno, participando da organização da matriz (IOZZO, et. al., 1998). Em oposição, os compostos mais ricos em ácido β-D-glucurônico extraídos com mais eficiência, possivelmente representem, no tumor, as moléculas de versicam.

A menor eficiência de extração de heparam sulfato possivelmente deve-se a sua localização. Os proteoglicanos de heparam sulfato estão preferencialmente em superfície celular ou em membrana basal, o que dificultou a liberação intacta do proteoglicanos.

A menor extração dos proteoglicanos nos tecidos tumorais bem como a grande variação obtida, possivelmente esteja relacionada com a sua estrutura mais fibrosa. Mello-Junior et. al. (2008) demonstraram que o aumento de fibras de colágeno no tumor benigno humano varia muito. Martins et. al. (2002) demonstraram

que há uma grande variação na quantidade e distribuição de componentes da matriz extracelular (colágenos tipo I e III, fibras reticulares e elásticas) de tumores benignos de mama. Além disso, também demonstraram que as fibras de colágeno são mais espessas e com organização irregular em comparação ao tecido normal, mas mais organizada que em tumor maligno da mama. Portanto, o aumento dos componentes da matriz e a distribuição irregular, sugerem diferenças na interação com proteoglicanos, o que poderia justificar a menor extração destas macromoléculas.

A análise dos proteoglicanos ao longo do ciclo menstrual mostrou que o controle hormonal foi mais pronunciado sobre o tecido mamário normal do que sobre o fibroadenoma. Portanto, discutiremos no tecido mamário normal, comparando-se as fases proliferativa e lútea, quanto aos seguintes parâmetros:

a-) concentração de proteoglicanos

b-) velocidade de síntese

c-) tipos de proteoglicanos

d-) tipos de glicosaminoglicanos

e-) estrutura do dermatam sulfato

f-) secreção e extração

Em seguida, considerações serão feitas sobre o fibroadenoma nessas fases do ciclo menstrual.

Na fase lútea, a concentração de proteoglicanos e a velocidade de síntese foram mais elevadas do que na fase proliferativa. Essa diferença foi maior para o heparam sulfato (quanto se analisou a concentração de proteoglicanos totais), mas a velocidade de síntese foi igual para todos os proteoglicanos (nas condições *in vitro*).

A estrutura do dermatam sulfato também não se alterou nas diferentes fases do ciclo menstrual, indicando que a expressão de enzimas biossintéticas também parece não se alterar.

Por outro lado, a eficiência de extração dos proteoglicanos foi maior na fase lútea do ciclo. Isto pode ser devido ao maior grau de hidratação do tecido nesta fase (PITELKA et. al., 1983; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Em ambas as fases, imunofluorescência mostrou a presença de decorim, concentrado nos lóbulos e, principalmente nas regiões periductais.

Quanto ao fibroadenoma, embora as concentrações e velocidade de síntese tenham sido maiores do que no tecido normal, praticamente não foram observadas

diferenças entre as fases proliferativa e lútea do ciclo menstrual. Ao contrário do tecido normal, houve uma tendência a queda na concentração de proteoglicanos, especialmente proteoglicanos de heparam sulfato. Por isso, as relações tumor/normal foram maiores na fase proliferativa.

Além de decorim, como já mencionamos, versicam também foi identificado em ambas as fases, nas regiões periductais.

Os hormônios esteróides são produzidos principalmente nos ovários e somente terão efeito sobre os diferentes tecidos em presença de receptores hormonais para desencadear inúmeras respostas celulares.

No tecido mamário normal a expressão e a distribuição de receptores variam ao longo do ciclo. ERs são expressos em maiores níveis na fase proliferativa, enquanto PRs têm expressão aumentada na fase lútea (MARKOPOLOUS et. al., 1988; RICKETTS et. al., 1991; PETERSON et. al. 1987; SODERQVIST et. al., 1993; SEAGROVES et. al., 2000; ISMAIL et. al., 2002). Estas informações podem ter alguma correlação com as oscilações nas concentrações de proteoglicanos ao longo do ciclo menstrual.

Porém, o efeito hormonal sobre a síntese destas moléculas no tecido mamário foi pouco investigada (FERGUSON et. al., 1992; SUNIL et. al., 2000).

Sunil et. al. (2000) avaliaram as concentrações de glicosaminoglicanos em tecido mamário de ratas normais, após a administração de estradiol, progesterona e combinação de ambos os hormônios. Demonstraram que, após a administração de estradiol, ocorreu uma diminuição das concentrações de heparam sulfato em relação ao controle, enquanto a administração somente de progesterona promoveu aumento de condroitim sulfato. Ocorreu ainda um aumento de todos os glicosaminoglicanos com a administração de ambos os hormônios. Estes resultados sugerem influência de estrógeno sobre a síntese de proteoglicanos de heparam sulfato, enquanto progesterona parece estar relacionada com síntese de proteoglicanos de condroitim sulfato/dermatam sulfato. Entretanto, a elevação na concentração de todos os glicosaminoglicanos com a presença dos dois hormônios mostra a integração de ambos no controle da expressão destas moléculas.

Outro fato que também reforça a influência hormonal sobre a síntese de proteoglicanos e as variações nos tecidos ao longo do ciclo referem-se à influência destes esteróides sobre a expressão de uma série de fatores de crescimento, os

quais, por sua vez, também regulam a expressão de receptores hormonais em um complexo sistema de sinalização celular (KRESSE et. al., 2001). Como citado anteriormente, alguns destes fatores de crescimento estão relacionados com o controle de expressão de proteoglicanos (BASSOLS et. al., 1988; IOZZO et. al., 1998; VELLEMAN et. al., 2008) como, por exemplo TGF-β, importante fator de estímulo na síntese de proteoglicanos de condroitim sulfato/dermatam sulfato em diferentes tipos celulares (BASSOLS & MASSAGUÉ, 1988).

Assim, hormônios esteróides podem regular a síntese se proteoglicanos, em função das variações na expressão de receptores hormonais ao longo do ciclo, gerando diferentes respostas celulares (direta ou indireta) e atuando no controle da biossíntese destas macromoléculas no tecido mamário normal.

O mesmo poderia estar ocorrendo no fibroadenoma. Estudos demonstraram um aumento significativo na expressão de receptores hormonais no fibroadenoma, em comparação com o tecido normal. Sapino et. al. (2006) analisaram a presença de ERs no fibroadenoma por imuno-histoquímica. ER-α foi detectado somente nas células epiteliais, enquanto ER-β em ambos os tipos celulares, epiteliais e estromais. Demonstraram, ainda que a expressão de ER-β no estroma do tumor benigno está aumentada. Não só os níveis de ER-β, mas também os de ER-α estão aumentados segundo CERICATTO et. al. (2005). Embora um maior número de estudos focalize os receptores de estrógenos, também foi descrito importante aumento nos níveis de PRs no fibroadenoma (KUTTENN, et. al., 1981; BRANCHINI, G., 2007).

Com o aumento do número de receptores hormonais, os hormônios esteróides desencadeiam maior número de respostas intracelulares. Em modelos experimentais de câncer de mama humano *in vivo* e *in vitro* demonstrou-se que estrogênios podem promover a expressão alterada de fatores de crescimento, tais como TGF-α (BATES et. al., 1988) e TGF-β (GOLD et. al., 1999), IGF-II (BRUNNER et. al., 1993) e receptores de fatores de crescimento como EGFR e IGF-IR (BERTHOIS et. al., 1989; CHRYSOGELOS et. al., 1994).

No fibroadenoma, alterações na expressão de fatores de crescimento também foram descritos (GOMM et. al., 1991; FEAKINS et. a.l, 2000). Como exemplo, podemos citar o TGF-β citado anteriormente como importante fator de estímulo na síntese de proteoglicanos de condroitim sulfato/dermatam sulfato (GOMM et. al., 1991; BASSOLS & MASSAGUÉ, 1988; PILICHOWSKA et. al., 1997).

Apesar do aumento na expressão dos receptores de estrógeno e progesterona, em fibroadenoma comparado ao tecido mamário normal, não há dados quanto a possíveis variações na expressão desses receptores em fibroadenoma ao longo do ciclo.

Outro fato observado durante nossos estudos foi o melhor rendimento na extração de ^{35}S-proteoglicanos na fase lútea do ciclo menstrual para ambos os tecidos. Este fato possivelmente seja decorrente das alterações morfofisiológicas que ocorrem na fase lútea em decorrência de influências hormonais. São observadas pequenas variações histológicas das glândulas mamárias, que se caracterizam por uma proliferação de ductos e maior hidratação do tecido conjuntivo ao longo do ciclo menstrual (mais evidente no período pré-menstrual). Os lóbulos mamários são mais desenvolvidos e figuras de mitose são geralmente observadas, o que indica maior atividade metabólica e mitótica nesta fase (SHIMOMOTO et. al.,1999).

Todos os nossos resultados demonstram, portanto, que hormônios esteróides podem exercer influência sobre a síntese de proteoglicanos e glicosaminoglicanos no tecido mamário normal, uma vez que sua concentração e velocidade de síntese variaram ao longo do ciclo menstrual. Essas diferenças não foram observadas no fibroadenoma, que parece menos sensível ao controle hormonal. Entretanto foi evidente o aumento na concentração de proteoglicanos (bem como na velocidade de síntese), a expressão de versicam e a mudança de estrutura do dermatam sulfato no tumor em relação ao tecido normal.

A grande importância dos proteoglicanos nos tecidos tem sido elucidada ao longo dos anos, com as descobertas de sua importante participação em inúmeros processos celulares. Desta maneira, estudos sobre alterações na expressão bem com a identificação de fatores que regulam a biossíntese destes compostos em processo fisiológicos e fisiopatológicos fornecem informações valiosas para esclarecer ainda mais as funções realizadas por elas. Os resultados deste trabalho forneceram importantes informações dos efeitos hormonais sobre a síntese destas moléculas nestes tecidos. Entretanto, o grau de complexidade que envolve tais efeitos é muito maior, o que sugere a necessidade de novos estudos.

ABSTRACT / RESUMO

ABSTRACT

Proteoglycans are important component of the extracellular matrix, which are involved in its organization and function, as well as in many biological processes. The aim of the present study was to investigate the changes that occur in proteoglycans of human fibroadenoma in comparison to proteoglycans of human normal breast tissue during the menstrual cycle. Tissue samples were collected during surgery, and both the concentration and the synthesis rate of the proteoglycans were analyzed. Fibroadenomas contained more, and synthesized more, proteoglycans than their paired normal controls, both in proliferative and secretory phases of the menstrual cycle. Normal breast tissue has shown an important increase in proteoglycan concentration during the secretory phase. In contrast, a small decrease was observed in the same period for tumors. Concerning the glycosaminoglycan chains, heparan sulfate and a hybrid dermatan sulfate containing both β-D-glucuronic and α-L-iduronic acid residues, were found in both normal and tumoral tissues. The concentration of both was increased in tumors, in comparison to normal tissue, but the dermatan sulfate increased more. The structure of this compound was also modified, with a higher proportion of β-D-glucuronic acid. Nevertheless, no differences were observed in dermatan sulfate composition comparing the proliferative to the secretory phase of the menstrual cycle. Decorin was identified in both normal and tumoral tissues, while versican was found only in fibroadenoma. By immunofluorescence, it was shown that decorin occurs mainly in peritubular regions. Versican, which again appeared only in fibroadenoma, also was concentrated in the peritubular regions. Our results clearly demonstrate that the synthesis rate and concentration of proteoglycans, especially decorin and versican, is increased in fibroadenoma in comparison to normal breast tissue. In normal breast tissue, the concentration of proteoglycans is higher during the secretory phase, but the tumor seems to be less sensitive to hormonal control.

RESUMO

Proteoglicanos são importantes componentes da matriz extracelular, que estão envolvidos na sua organização e funcionamento, bem como em muitos processos biológicos. O objetivo do presente estudo foi investigar as mudanças que ocorrem nos proteoglicanos de fibroadenoma em comparação com o tecido mamário humano normal durante o ciclo menstrual. Foram coletadas amostras de tecido durante cirurgias, e a concentração e a velocidade de síntese de proteoglicanos foram analisadas. Fibroadenoma contém mais proteoglicanos e sintetizou mais proteoglicanos em condições de cultura de tecido do que seus respectivos controles normais pareados, tanto na fase proliferativa quanto na fase lútea do ciclo menstrual. O conteúdo de proteoglicanos foi mais alto no tecido normal durante a fase lútea (ou secretória) do ciclo menstrual, enquanto no tumoral foi mais elevada na fase proliferativa. Quanto às cadeias de glicosaminoglicanos, heparam sulfato e dermatam sulfato híbrido foram encontrados em ambos os tecidos, normal e tumoral. A concentração de ambos estava aumentada no tumor em comparação com o tecido normal, mas o galactosaminoglicano aumentou mais. Além disso, a estrutura desse composto também se modificou com uma proporção maior de ácido β-D-glucurônico no fibroadenoma. Contudo, diferenças na composição dos glicosaminoglicanos não foram observadas comparando-se as fases proliferativa e secretória do ciclo menstrual. Decorim foi identificado nos tecidos normal e tumoral, enquanto versicam só estava presente no fibroadenoma. Por imunofluorescência, demonstrou-se que decorim ocorre preferencialmente nas regiões peritubulares de ambos os tecidos. Versicam, que só foi identificado em fibroadenoma, também se concentra nas regiões peritubulares. Em conclusão, nossos dados demonstram que a velocidade de síntese e a concentração de proteoglicanos, especialmente decorim e versicam, estão aumentadas no fibroadenoma, em comparação com o tecido mamário normal. No tecido mamário normal, a concentração de proteoglicanos é mais alta durante a fase secretória, enquanto o tumor parece ser menos sensível ao controle hormonal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J. C., WATT, F. M. (1993) – Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. **Development, 117:** 1183-1198.

AGUIAR, J. A. K., MICHELACCI, Y. M. (1999) – Preparation and purification of *Flavobacterium heparinum* chondroitinases AC and B by hydrophobic interaction chromatography. **Braz. J. Med. Biol. Res., 32**: 545-550.

AGUIAR, J. A. K.; LIMA, C. R.; BERTO A. G. A.; MICHELACCI, Y. M. (2003) – An improved methodology to produce *Flavobacterium heparinum* chondroitinases, important instruments for diagnosis of diseases. **Biotech. Appl. Biochem. 37**: 115-127.

ALI, S., METZGER, D., BORNERT, J.M., CHAMBON, P. (1993) – Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the human oestrogen receptor A/B region. **EMBO Journal, 12:** 1153-1160.

ALINI, M., LOSA, G.A. (1991) – Partial characterization of proteoglycans isolated from neoplasic and nonneoplasic human breast tissues. **Cancer Research, 51:**

1443-1447. ALLE, K. M., MOSS, J., VENEGAS, R. J., KHALKHALI, I., KLEIN, S. R. (1996) – Conservative management of fibroadenoma of the breast. **Br. J Surg., 83(7):** 992-993.

ANDRADE, W., BRANDAM, E. (1991) – Isolation and characterization of rat skeletal muscle proteoglycan decorin and comparison with the human fibroblast decorin. **Comp. Biochem. Physiol. B., 100(3)**: 565-570.

ANGERTH, T., HUANG, R. Y., AVESKOGH, M., PETTRISSON, I., KJELLÉN, L., HELLMAN, L. (1990) – Cloning and structural analysis of a gene encoding a mouse mastocytoma proteoglycan core protein. Analysis of its evolutionary relation of three cross hybridizing regions in the mouse genome. **Gene, 93(2)**: 235-240.

AONO, S., KEINO, H., ONO, T., YASUDA, Y., TOKITA, Y., MATSUI, F., TANIGUCHI, M., SONTA, S., OOHIRA, A. (2000) – Genomic organization and expression pattern of mouse neuroglycan C in the cerebellar development. **J. Biol. Chem., 275:** 337-342.

ARNOLD, S.F., MELAMED, M., VOROJEIKINA, D.P., NOTIDES, A.C., SASSON, S. (1997) – Estradiol-binding mechanism and binding capacity of the human estrogen receptor is regulated by tyrosine phosphorylation. **Molecular Endocrinology, 11:** 48-53.

AVIEZER, D., HECHT, D., SAFRAN, M., EISINGER, M., DAVID, G., YAYON, A. (1994) – Perlecan, basal lamina proteoglycan, promotes basic fibroblast growth factor-receptor binding, mitogenesis, and angiogenesis. **Cell, 79:** 1005-1013.

AVRAHAM, S., STEVENS, R. L., GARTNER, M. C., AUSTEN, K. F., LALLEY, P. A., WEIS, J. H. (1988) – Isolation of the cDNA that encodes the peptide core of the secretory granule proteoglycan of rat basophilic leukemia-1 cells and assessment of its homology to the human analogue. **J. Biol. Chem., 263(15)**: 7292-7296.

BAKER, J. R., CIFONELLI, J. A., RODÉN, L. (1975) – The linkage of corneal keratan sulfate to protein. **Connect. Tis. Res., 3(2)**: 149-156.

BARBER, A.J., LIETH, E. (1997) – Agrin accumulates in the brain microvascular basal lamina during development of the blood–brain barrier**. Dev. Dyn., 208:** 62–74.

BASSOLS, A., MASSAGUE, J. (1988) – Transforming growth factor B regulates the expression and structure of extracellular matrix chondroitin/dermatan sulphate proteoglycans. **The Journal of Biological Chemistry., 236(6):** 3039-3045.

BATES, S. E., DAVIDSON, N. E., VALVERIUS, E. M., FRETER, C. E., DICKSON, R. B., TAM, J. P., KUDLOW, J. E., LIPPMAN, M. E., SALOMON, D. S. (1988) – Expression of transforming growth factor α and its messenger ribonucleic acid in human breast cancer: its regulation by estrogen and its possible functional significance. **Molecular Endocrinology Vol. 2(6):** 543-555.

BEATO, M., SANCHEZ-PACHECO, A. (1996) – Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. **Endocr. Rev., 17:** 587-609.

BENAUD, C., DICKSON, R.B, THOMPSON, E.W. (1998) – Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. **Breast Cancer Research and Treatment, 50:** 97–116.

BERNFIELD, M., KOKENYESI, R., KATO, M., HINKES, M. T., SPRING, J., GALLO, R. L., LOSE, E. J. (1992) – Biology of the syndecans, a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. **Annu. Rev. Cell. Biol., 8**: 365-393.

BERTHOIS, Y., DONG, X.F., MARTIN, P.M. (1989) – Regulation of epidermal growth factor-receptor by estrogen and antiestrogen in the human breast cancer cell line MCF-7. **Biochemical and Biophysical Research Communications, 159:** 126-131.

BERTO A. G., MICHELACCI, Y.A., SAMPAIO, L.O. (2001) – Galactosaminoglycans from normal myometrium and leiomyoma. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research., 34:** 633-637.

BERTO, A. G. A., SAMPAIO, L. O., FRANCO, C. R. C., CESAR-JR, R. M., MICHELACCI, Y. M. (2003) – A comparative analysis of structure and spatial distribution of decorin in human leiomyoma and normal myometrium. **Biochim. Biophys. Acta., 1619(1)**: 98-112.

BIANCO, P., FISHER, L. W., YOUNG, M. F., TERMINE, J. D., ROBEY, P. G. (1990) – Expression and localization of the two small proteoglycans biglycam and decorin in developing human skeletal and nonskeletal tissues**. J. Histochem. Cytochem., 38(11)**: 1549-1563.

BIDANSET, D. J., GUIDRYLL, C., ROSENBERGLL, L., CHOIII, H., TIMPL, R., HOOK, M., (1992) – Binding of the proteoglycan decorin to collagen type VI, **The Journal of Biological Chemistry, 267(8):** 5250-5256.

BLOCHBERGER, T. C., VERGNES, J., HEMPEL, J., HASSEL, J. R. (1992) – cDNA to chick lumicam (corneal keratan sulfate proteoglycan) revels homology to small interstitial proteoglycan gene family and expression in muscle and intestine. **J. Biol. Chem., 267(1)**: 347-352.

BODE-LESNIEWSKA, B., DOURS-ZIMMERMANN, M. T., ODERMATT, B. E., BRINER, J., HEITZ, P. U., ZIMMERMANN, D. R. (1996) – Distribution of the large aggregating proteoglycan versican in adult human tissues the journal of histochemistry and cytochemistry, 44(4): 303-312.

BOURIN, M. C., LINDAHL, U. (1993) – Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation. **Biochemical Journal, 289:** 313-330.

BOYD, F.T., CHEIFETZ, D., ANDRES, J., LAIHO, M., MASSAGUÉ, J. (1990) – Transforming growth factor-β receptors and biding proteoglycans. **J. Cell. Sci. Suppl., 13**: 131-138.

BRANCHINI, G. (2007) – Expressão gênica e protéica das isoformas a e b do receptor de progesterona e expressão protéica do receptor de estrógenos alfa em amostras de tecido mamário normal e fibroadenomas – tese.

BRAY, B. A., LEEBERMAN, R., MEYER, K. (1967) – Structure of human skeletal keratosulfate. The linkage region. **J. Biol. Chem., 242(14)**: 3373-3380.

BRISSETT, N. C., PERKINS, S. J. (1998) – Conserved basic residues in the C-type lectin and short complement repeat domains of the G3 region of proteoglycans**. Biochem. J., 32:** 415- 424.

BROWN, G. M., HUCKERBY, T. N., NIEDUSZYNSKI, I. A. (1994) – Oligosaccharides derived by keratanase II digestion of bovine articular cartilage keratan sulphates. **Eur. J. Biochem., 224**: 281-308.

BROWN, L. F., GUIDI, A. J., SCHNITT, S. J., VAN DE WATER, L., IRUELA-ARISPE, M. L., YEO, T. K., TOGNAZZI, K., DVORAK, H. F. (1999) – Vascular stroma formation in carcinoma *in situ*, invasive carcinoma, and metastatic carcinoma of the breast. **Clin. Cancer Res., 5:** 1041-1056.

BRUNNER, N., YEE, D., KERN, F.G., SPANG, T.M., LIPPMAN, M.E., CULLEN, K.J. (1993) – Effect of endocrine therapy on growth of T61 human breast cancer xenografts is directly correlated to a specific down-regulation of insulin-like growth factor II (IGFII). **Eur. J. Cancer 29A:** 562–569.

BUNONE, G., BRIAND, P.A., MIKSICEK, R.J., PICARD, D. (1996) – Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. **EMBO Journal, 15:** 2174-2183.

CADAVAL, R. A. M., KOHLMAN, O., MICHELLACI, Y. M. (2000) – Urinary excretion of glycosaminoglycans and albumin in experimental diabetes mellitus. **Glycobiology, 10(2):** 185-192.

CAREY, D. J., STAHL, R. C., ASUNDI, V. K., TUCKER, B. (1993) – Processing and subcellular distribution of the Schwann cell lipid-anchored heparan sulphate proteoglycan and identification as glypican. **Exp. Cell Res. 208:** 10-18.

CAREY, D. J., STAHL, R. C., CIZMECI-SMITH, G., ASUNDI, V. K. (1994) – Syndecam-1 expressed in Schwann cells causes morphological transformation and cytoeskeletal reorganization and associates with actin during cell spreading. **J. Cell. Biol., 124(1-2)**: 161-170.

CAREY, D.J., EVANS, D. M. (1989) – Membrane anchoring of heparan sulfate proteoglycans by phosphatidylinositol and kinetics of synthesis of peripheral and detergent-solubilized proteoglycans in Schwann cells. **J Cell Biol., 108(5):** 1891-1897.

CÁSSARO, C. M. F., DIETRICH. C. P. (1977) – Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates. **J. Biol. Chem., 252(7)**: 2254-2261.

CERICATTO, R., POZZONBON, A., MORSCH, D. M., MENKE, I. S., MRUN, I. S., SPRITZER, P. M. (2005) – Estrogen receptor α, bcl-2 and c-myc gene expression in fibroadenomas and adjacent normal breast: association with nodule size, hormonal and reproductive features. **Steroids, 70:** 153-160.

CHAMBERS, A.F., MATRISIAN, L.M. (1997) – Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. **Journal of the National Cancer Institute, 89:** 1260-1270.

CHAVANTE, S. F., SANTOS, E. A., OLIVEIRA, F. W., GUERRINI, M., TORRI, G., CASU, B., DIETRICH, C. P. & NADER, H. B. (2000) – A novel heparan sulfate with high degree of N-sulfation and high heparin cofactor-II activity from the brine shrimp *Artemia franciscana*. **Int. J. Biol. Macromol., 27(1):** 49-57.

CHEIFETZ, S., MASSAGUÉ, J. (1989) - Transforming growth factor-β (TGF-β) receptor proteoglycan. Cell surface expression and ligand binding in the absence of glycosaminoglycans chains. **J. Biol. Chem., 264(20):** 12025-12028.

CHRYSOGELOS, S. A., YARDEN, R. I., LAUBER, A. H., MURPHY, J. M. (1994) – Mechanisms of EGF receptor regulation in breast cancer cells. **Breast Cancer Research and Treatment, 31:** 227-236.

CINTRON, C., HASSINGER, L. C., KUBLIN, C. L., CANNON, D. J. (1978) – Biochemical and ultrastructural changes in collagen during corneal wound healing. **J. Ultrastruct. Res., 65(1):** 13-22.

COLE, P., ELWOOD, J. M., KAPLAN, S. D. (1991) – Incidence rates and risk factors of benign breast neoplasms. **N. Engl. J. Med., 108(2)**: 112-120.

CORPUS, L. M., FUNDERBURGH, J. L., FUNDERBURGH, M. L., BOTTOMLEY, G. S., PRAKASH, S., CONRAD, G. W. (1996) – Molecular cloning and tissue distribution of keratocan. Bovine corneal keratan sulfate proteoglycan. **Journal of Biological Chemistry, 271:** 9759-9763.

COTRAN, R. S., KUMAR, V., COLLINS, T. (2000) – Pathologic Basis of Disease. **6ª edição, W. B. Saunders Company.**

COUCHMAN, J. R., HOOK, M., REES, D. A., TIMPL, R. (1983) – Adhesion, growth and matrix production by fibroblast on laminin substrates. **J. Cell. Biol., 96:** 177-183.

COUCHMAN, J.R., WOODS, A. (1993) – Structure and biology of pericellular proteoglycans. In: Roberts DD, Mecham RP (eds) **Cell surface and extracellular glycoconjugates,** 33-67.

CUNHA, G. R., YOUNG, P., HOM, Y. K., COOKE, P. S., TAYLOR, J. A, LUBAHN, D. B. (1997) – Elucidation of a role of estromal steroid hormone receptors in mammary gland growth and development by tissue recombination experiments. **J. Mamm. Gland. Biol. Neoplasia. 2:** 393-402.

DAVID, G., VAN DER SCHUREN, B., MARYNEN, P., CASSIMAN, J. J., VAN DER BERGHE, H. (1992) – Molecular cloning of amphiglycan, a novel integral membrane heparan sulfate proteoglycan expressed by epithelial and fibroblastic cells. **J. Cell Biol., 118(4):** 961-969.

DAY, A. J., PRESTWICH, G. D. (2002) – Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant. **J. Biol. Chem., 277:** 4585-4588.

DEAKIN, J. A., LYON, M. (1999) – Differential regulation of hepatocyte growth factor/scatter factor by cell surface proteoglycans and free glycosaminoglycan chains. J. Cell Sci., **112:** 1999-2009.

DELEHEDDE, M., MALCOM, L., NICOLAS, S., HASSAN, R., FERNIG, D. (2001) – Proteoglycans: pericellular an cell surface multireceptors that integrate external stimuli in the mammary gland. **J. of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 6(3):** 253-273.

DENZER, A. J., GESEMANN, M., RUEGG, M. A. (1996) – Diverse functions of the extracellular matrix molecule agrin., **Semin. Neurosci., 8:** 357-366.

DESREUX, J., DELANSORNE, R., FOIDART, J. M., NOEL, A., VAN DEN BRULE, F. (2001) – The effects of progesterone on breast tissue. **Journal für Menopause, 8 (2):** 14-18.

DEVLIN, T.M. (2007) – Manual de bioquímica com correlações clínicas. **Tradução da 6° ed. Americana.**

DIETRICH, C. P. (1984) – A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. **Braz. J. Med. Biol. Res., 17:** 5-15.

DIETRICH, C. P., ARMELIN, H. A., NOGUEIRA, Y. L., NADER, H. B., MICHELACCI, Y. M. (1982) – Turnover, changes of composition with rate of cell growth and effect of phenylxyloside on synthesis and structure of cell surface sulfated glycosaminoglycans of normal and transformed cells. **Biochim. Biophys. Acta., 717(3):** 387-397.

DIETRICH, C. P., DIETRICH, S. M. C. (1976) – Eletrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Anal. Biochem., 70(2):** 645-647.

DIETRICH, C. P., NADER, H .B. (1974) – Fractionation and properties of four heparitin sulfates from beef lung tissue. Isolation and partial characterization of a homogeneous species of heparitin sulfate. **Biochim. Biophys. Acta, 343**: 34-44.

DIETRICH, C. P., NADER, H. B., PAIVA, J. F., SANTOS, E. A., HOLME, K. R., PERLIN, A. S. (1989) – Heparin in molluscs: chemical, enzimatic degradation and 13C and 1H n.m.r. Spectroscopical evidence for the maintenance of the structure through evolution. **Int. J. Biol. Macromol., 11(6):** 361-366.

DIETRICH, C. P., NADER, H. B., STRAUS, A. H. (1983) – Structural differences of heparan sulfates according to the tissue and species of origin. **Biochem. Biophys. Res. Commun., 111(3):** 865-871.

DIETRICH, C. P., TERSARIOL, I. L., TOMA, L., MORAES, C. T., PORCIONATTO, M. A., OLIVEIRA, F. W., NADER, H. B. (1998) – Structure of heparan sulfate: identification of variable and constant oligosaccharide domains in eight heparan sulfates of different origins. **Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand), 44(3):** 417-429.

DIETRICH, C.P., SAMPAIO, L. O., TOLEDO, O.M. (1976) – Characteristic distribution of sulfated mucopolysaccharides in different tissues and in their respective mitochondria. **Biochem Biophys Res Commun., 71(1)**: 1-10.

DUPONT, W. D., PAGE D. L., PARL, F. F., VNENCAK-JONES, C. L., PLUMMER, W. D. JR., RADOS, M. S. (1994) – Long-term risk of breast cancer in women with fibroadenoma. **N. Engl. J. Med., 331(1)**: 10-5.

ESHECHENKO, T. Y, RYOKAVA, V. I., CHERNAKOV, A., SIDOROV, S. V., GRIOGORIEVA, E. (2007) – Expression of different proteoglycans in human breast tumors. **Biochemistry., 72(9):** 1016-1020.

FEAKINS, R. M, MRCPATH, M.B., WELLS, C. A., YOUNG, K.A., SHEAFF, M. T. (2000) – Platelet-derived growth factor expression in phyllodes tumors and fibroadenomas of the breast. **Human pathology, 31(10):**1012-1022.

FERGUSSON, J. E., SCHOR, A. M., HOWELL, A., FERGUSSON, M. W. (1992) – Changes in the extracellular matrix of the normal human breast during the menstrual cycle. **Cell Tissue Res., 268:**167-177.

FERNIG, D. G., CHEN, H. L., RAHMOUNE, H. DESCAMPS, S. BOILLY, B. HONDERMARCK, H. (2000) – Differential regulation of FGF-1 and FGF-2 mitogenic activity is related to their kinetics of binding to heparan sulphate in MDA-MB 231 human breast cancer cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, **267:** 770–776.

FERNIG, D. G., GALLAGHER, J. T (1994) – Fibroblast growth factors: An information network controlling tissue growth, morphogenesis and repair. **Prog Growth Factor Res., 5(4):** 353-377.

FILHO, G. B. (2004) – Patologia geral. **3° ed. Guanabara Koogan.**

FILMUS, J., SHI, W., WONG, Z. M., WONG, M. J. (1995) – Identification of a new membrane-bound heparan sulfate proteoglycan. **Biochem. J., 311(Pt 2):** 561-565.

FISHER, L.W., TERMINE, J.D., DEJTER, S.W.JR., WHITSON, S.W., YANAGISHITA, M., KIMURA, J.H., HASCALL, V.C., KLEINMAN, H.K., HASSELL, J.R., NILSSON, B. (1983) – Proteoglycans of developing bone. **J. Biol. Chem., 258(10):** 6588-6594.

FOX, S.B., HARRIS, A.L. (1997) – The epidermal growth factor receptor in breast cancer. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 2:** 131-141.

FRANSSON, L. Å. (1968) – Structure of dermatan. III. The hybrid structure of dermatan sulfate from umbilical cord. **J. Biol. Chem., 243(7):** 1504-1510.

FRANSSON, L. Å., HAVSMARK, B. (1970) – Structure of dermatan sulfate. VII. The copolymeric structure of dermatan sulfate from horse aorta. **J. Biol. Chem., 245(18):** 4770-4783.

FRANSSON, L. Å., SILVERBERG, I., CARLSTRED, I. (1985) – Structure of heparan sulfate protein linkage region: demonstration of the sequence galactosyl-galactosyl-xylose-2-phosphate. **J. Biol. Chem., 260(27):** 14722-14726.

FRANTZ, V. K., PIAKERN, J. W., MELCHER, G. W., AUTOCHINCOLOSS, J. R. (1951) – Incidence of chronic cystic disease in so-called normal breast: a study based on 225 post mortem examinations. **Cancer., 4(4):** 762-783.

FRIEDLANDER, D. R., MILEV, P., KARTHIKEYAN, L., MARGOLIS, R. K., MARGOLIS, R. U., GRUMET, M. (1994) – The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and Inhibits Neuronal Adhesion and Neurite Outgrowth- **The Journal of Cell Biology, 125:** 660-680.

FUKI, I. V., KUHN, K. M., LOMAZOV, I. R., ROTHMAN, V. L., TUSZYNSKI, G. P., IOZZO, R. V., SWENSON, T. L., FISHER, E. A., WILLIAMS, K. J. (1997) – The syndecan family of proteoglycans: novel receptors mediating internalization of atherogenic lipoproteins in vitro**. J. Clinic Invest., 100(6):** 1611-1622.

FUNDERBURGH, J. L., CORPUZ, L. M., ROTH, M. R., FUNDERBURGH, M. L., TASHEVA, E. S., CONRAD, G. W. (1997) – Mimecan, the 25-kDa corneal keratan sulfate proteoglycan, is a product of the gene producing osteoglycin. **J Biol Chem, 272(44):** 28089-28095.

FUNDERBURGH, J. L., FUNDERBURGH, M. L., MANN, M. M., CONRAD, G. W. (1991) – Unique glycosylation of three keratan sulfate proteoglycan isoforms. **J Biol Chem., 266(22):** 14226-14231.

GALLAGHER, J. T., LYON, M. (2000) – Molecular structure of heparan sulfate and interactions with growth factors and morphogens. **In *Proteoglycans: structure, biology and molecular interactions* by R.V. Iozzo**.

GAUB, M. P., BELLARD, M., SCHEUER, I., CHAMBON, P., SASSONE-CORSI, P. (1990) – Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the fos-jun complex. **Cell., 63(6):** 1267-1276.

GLASS C. K. (1996) – Some new twists in the regulation of gene expression by thyroid hormone and retinoic acid receptors. **J Endocrinol., 150:** 349-57.

GOLD, L. I. (1999) – The role for transforming growth factor-beta (TGF) in human cancer. **Crit. Rev. Oncog., 10:** 303–360.

GOMM, J. J., SMITH, J., RYALL, G. K., BAILLIE, R., TURNBULL, L., COOMBES, R. C. (1991) – Localization of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor β1 in the human mammary gland. **Cancer Research, 51:** 4685-4692.

GOWDA, D. C., HOGUE-ANGELETTI, R., MARGOLIS, R. K., MARGOLIS, R.U. (1990) – Chromaffin granule and PC 12 cell chondroitin sulfate proteoglycans and their relation to chromogranin-A. **Arch. Biochem. Biophys., 281(2):** 219-24.

GREENBERG, R., SKORNICK, Y., KAPLAN, O. (1998) – Management of breast fibroadenomas. **J. Gen. Intern. Med., 13(9):** 640-645.

GREENE, G. L., GILNA, P., WATERFIELD, M. (1986) – Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. **Science, 231:** 1150-1154.

GREILING H. (1994) – Structure and biological functions of keratan sulfate proteoglycans. **EXS., 70:** 101-122.

GRIGORIEVA, E., ESHCHENKO, T., RYKOVA, V. I., CHERNAKOV, A., ZABAROVSKY, E., SIDOROV, S.V. (2008) – Decreased expression of human D-glucuronyl C5-epimerase in breast câncer. **Int. J. Cancer: 122:** 1172–1176.

GUTIERREZ, P., OBRIEN, K. D., FERGUSON, M., NIKKARI, S. T., ALPERS, C. E., WIGHT, T. N. (1997) – Differences in the distribution of versican, decorin, and biglycan in atherosclerotic human coronary arteries. **Cardiovasc Pathol ., 6:** 271-278.

HAAGENSEN, C. D. (1986) – Apocrine epithelium. In: Disease of the breast. **3rd ed. Philadelphia: W.B.Saunders.,** p. 82-101.

HAGEN, S. G., MICHAEL, A. F., BUTKOWSKI, R. J., (1993) – Immunochemical and biochemical evidence for distinct basement membrane heparan sulfate proteoglycans. **J. Biol. Chem., 268:** 7261-7269.

HAGIHARA, K., WATANABE, K., CHUN, J., YAMAGUCHI, Y. (2000) – Glypican-4 is an FGF2-binding heparan sulfate proteoglycan expressed in neural precursor cells. **Dev. Dyn., 219:** 353-367.

HANSEN, R.K., AND BISSELL, M. J. (2000) – Tissue architecture and breast cancer: the role of extracellular matrix and steroid hormones. **Endocrine Related Cancer., 7:** 95-113.

HARDINGHAM, T. E., FOSANG, A. J. (1992) – Proteoglycans: many forms and many functions. **FASEB J. 6:** 861-870.

HASLAM, S. Z., COUNTERMAN, L. J., NUMMY, K. A. (1992) – EGF receptor regulation in normal mouse mammary gland. **Journal of Cellular Physiology, 152:** 553-557.

HAUSSER, H., SCHÖNHERR, E., KRESSE, H. (1993) – Different galactosaminoglycan composition of small proteoglycans from osteosarcoma cells. **Glycobiology, 3(6):** 557-562.

HAYASHI, K., MADRI, J. A., YURCHENCO, P. D. (1992) – Endothelial cells interact with the core protein of basement membrane perlecan through b1 and b3 integrins: an adhesion modulated by glycosaminoglycans. **The Journal of Cell Biology, 119(4):** 945-959.

HEDBOM, E., HEINEGKD, D. (1993) – Binding of fibromodulin and decorin to separate sites on fibrillar collagens. **The Journal of Biological Chemistry, 268(36):** 27307-27312.

HILDEBRAND, A., ROMARÍS, M., RASMUSSEN, L. M., HEINEGÅRD, D., TWARDZIK, D. R., BORDER, W. A., RUOSLAHTI, E. (1994) – Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. **Biochem J., 302(2):** 527-534.

HOWLETT, A. R., BISSELL, M. J. (1993) – The influence of tissue microenvironment (stroma and extracellular matrix) on the development and function of mammary epithelium. **Epithelial Cell Biology, 2:** 79-89.

HUNTER, T. B., ROBERTS, C. C., HUNT, K. R., FAJARDO, L. L. (1996) – Occurrence of Fibroadenomas in Postmenopausal Women Referred for Breast Biopsy. **J. Am. Geriatric. Soc., 44(1):** 61-64.

IGNAR-TROWBRIDGE, D.M., NELSON, K.G., BIDWELL, M.C., CURTIS, S.W., WASHBURN, T.F., MCLACHLAN, J.A., KORACH, K.S. (1992) – Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. **PNAS, 89:** 4658-4662.

IGNOTZ, R. A., MASSAGUE, J. (1986) – Transforming growth factor-2 stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation to the Extracellular Matrix. **J. Biol. Chem., 261(9):** 4337-4345.

INATANI, M., TANIHARA, H. OOHIRA, A. , HONJO, M., HONDA, Y. (1999) – Identification of a nervous tissue–specific chondroitin sulfate proteoglycan, neurocan, in developing rat retina **Investigative Ophthalmology & Visual Science, 40(10):** 2350-2359.

IOZZO RV. (1988) – Proteoglycans and neoplasia. Cancer Metastasis Rev., 7: 39-50.

IOZZO, R. V. (1994) - Perlecan: a gem of a proteoglycan. **Matrix Biol., 14(3):** 203-208.

IOZZO, R. V. (1998) – Matrix Proteoglycans: From Molecular Design to Cellular Function. **Annu. Rev. Biochem., 67:** 609-652.

IOZZO, R. V. (2000) – Proteoglycans: Structure, biology, and molecular interactions. **Book Reviews of proteoglycans.**

IOZZO, R. V., CLARK, C. C. (1986) – Biosynthesis of proteoglycans by rat embryo parietal yolk sacs in organ culture. **J. Biol. Chem., 261(15):** 6658-6669.

IOZZO, R. V., COHEN, I. (1993) – Altered proteoglycan gene expression and the tumor stroma. **Experientia., 49(5):** 447-455.

IOZZO, R. V., MOSCATELLO, D. K., MCQUILLANI, D. J., EICHSTETTER, I. (1999) – Decorin is a biological ligand for the epidermal growth factor receptor. **The Journal of Biological Chemistry., 274(8):** 4489-4492.

ISMAIL, P. M., LI J., DEMAYO, F. J., O'MALLEY, B. W., LYDON, J. P. (2002) – A novel LacZ reporter mouse reveals complex regulation of the progesterone receptor promoter during mammary gland development. **Molecular Endocrinology., 16:** 2475-2489

ITO, K., SHINOMURA, T., ZAKO, M., UJITA, M., KIMATA, K. (1995) – Multiple forms of mouse PG-M, a large chondroitin sulfate proteoglycan generate by alternative splicing. **J. Biol. Chem., 270:** 958–965.

JACKSON, R. L., BUSCH, S. J., CARDIN, A. D. (1991) – Glycosaminoglycans: Molecular Properties, Protein interactions, and Role in Physiological Processes. **Physiological. Rev., 71(2):** 481-539.

JALKANEN, S., BARGATZE, R. F., TOYOS, J., BUTCHER, E. C. (1987) – Lymphocyte recognition of high endothelium: antibodies to distinct epitopes of an 85-95 kD glycoprotein antigen differentially inhibit lymphocyte binding to lymph node, mucosal, or synovial endothelial cells. **J. Cell Biol., 105:** 983-990.

JAMNONGJIT M., HAMMES, S. R. (2006) – Ovarian steroids: the good, the bad, and the signals that raise them. **Cell Cycle, 5:** 1178-183.

JAQUES, L. B., BALLIEUX, R. E., DIETRICH,C. P., KAVANAGH, L. W. (1968) – A microeletrophoresis method for heparin. **Can. J. Physiol. Pharmacol., 46(3):** 351-360.

JEANLOZ, R. W. (1960) – The nomenclature of mucopolysaccharides. **Arthritis Rheum., 3:** 233-237.

JERÔNIMO, S. M. B., SALES, A. O., FERNANDES, M. Z., MELO, F. P., SAMPAIO, L. O., DIETRICH, C. P., NADER, H. B. (1994) – Glycosaminoglycan structure and content differ according to the origins of human tumors. **Braz. J. Med. Biol. Res., 27:** 2253-2258.

JOHNSON, H. J., ROSENBERG, L., CHOI, H. U., GARZA, S., HOOK, M., NEAME, P. J. (1997) – Characterization of epiphycan, a small proteoglycan with a leucine-rich repeat core protein. **Journal of Biological Chemistry, 272(30):** 18709-18717.

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. (2004) – Histologia básica 10 ed. Guanabara Koogan, p 449.

KAHARI, V. M., LARJAVA, H., UITOO, J. (1991) – Differential regulation of extracelullar matrix proteoglycan (PG) gene expression. Transforming growth factor-beta 1 up-regulates biglycan (PGI), and versican (large fibroblast PG) but down-regulates decorin (PGII) mRNA levels in human fibroblast in culture. **J. Biol. Chem., 266(16):** 10608-16615.

KARIHALOO, A., KALE, S., ROSENBLUM, N. D., CANTLEY, L. G. (2004) **–** Hepatocyte Growth Factor-mediated renal epithelial branching morphogenesis is regulated by glypican-4 expression. **Molecular and Cellular Biology, 24 (19):** 8745-8752.

KATZENELLENBOGEN, B. S., KENDRA, K. L., NORMAM, M. J., BERTHOIS, Y. (1987) – Proliferation, hormonal responsiveness and estrogen receptor content of MCF-7 human breast cancer cells growth in the short-term and long-term absence of estrogens. **Cancer research., 45:** 4355-4360.

KISCHEL, P., WALTREGNY, D., DUMONT, B., TURTOI, A., GREFFE, Y., KIRSCH, S., PAUW, E., CASTRONOVO, V. (2009) – Versican overexpression in human breast cancer lesions: known and new isoforms for stromal tumortargeting. International Journal of Cancer, 1-40.

KJELEÉN, L., LINDAHL, U. (1991) – Proteoglycans: Structures and Interactions. **Annu. Rev. Biochem., 60:** 443-475.

KJELLÉN, L., OLDBERG, A., HÖÖK, M. (1980) - Cell-surface heparan sulfate. Mechanisms of proteoglycan-cell association. **J. Biol. Chem., 255(21):** 10407-10413.

KJELLÉN, L., PETTERSSON, I., HOOK M. (1981) – Cell-surface heparan sulfate: an intercalated membrane proteoglycan. ***Proc. Natl. Acad. Sci.,* 78:** 5371-5375.

KODA, J. E., RAPRAEGER, A., BERNFIELD, M. (1985) – Heparan sulfate proteoglycans from mouse mammary epithelial cells: Cell surface proteoglycan as a receptor for interstitial collagens. **J. Biol. Chem., 260(13):** 8157-8162.

KOENDERS, P. G., FAVERLY, D., BEEX, L. V., BRUGGINK, E. D., KIENHUIS, C. B., BENRAAD, T. J. (1992) – Epidermal growth factor receptors in human breast cancer: a plea for standardization of assay methodology. **European Journal of Cancer., 28:** 693-697.

KOJIMA, T., SCHWORAK, N. W., ROSENBERG, R. D. (1992) – Molecular cloning and expression of two distinct cDNA-encoding heparan-sulfate proteoglycan core proteins from a rat endothelial cell line. **J. Biol. Chem., 267(7):** 4870-4877.

KOKENYESI, R., WOESSNER, F. (1989) – Purification and characterization of a small dermatan sulphate proteoglycan implicated in the dilatation of the rat uterine cervix. **Biochem. J., 260(2):** 413-419.

KONINGER, J. , GIESE, N. A., DI MOLA, F. F. , BERBERAT, P., GIESE, T., ESPOSITO, I., BACHEM, M. G., BUCHLER, M. W., FRIESS, H. (2004) – Overexpressed Decorin in pancreatic Cancer: Potential Tumor Growth Inhibition and Attenuation of Chemotherapeutic Action. **Clinical Cancer Research, 4776 (10):** 4776-4783.

KORNFELD, S. (1982) – Oligosaccharide processing during glycoprotein biosynthesis. In: HOROWITZ, I. M., ed. **The Glycoconjugates., 3:** 3-23.

KORNFELD, S. (1987) – Trafficking of lysosomal enzyme. **FASEB J., 1(6):** 462-469.

KRAEMER, P. M. (1971) – Heparan sulfates of cultured cells (I & II). **Biochemistry, 10:** 1437-1451.

KRESSE, H., HAUSSER, H., SCHONHERR, E. (1993) – Small proteoglycans. **Experientia, 49(5):** 403-416.

KRESSE, H., SCHOÈNHERR, E. (2001) – Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. **Journal of Cellular Physiology, 189:** 266-274

KRUMDIECK, R., HÖÖK, M., ROSENBERG, L.C., VOLANAKIS, J.E. (1992) – The proteoglycan decorin binds C1q and inhibits the activity of the C1 complex. **J. Immunol., 149(11):** 3695-701.

KUIJPER A., MOMMERS, E. C., VAN DER WALL, E., VAN DIEST, P. J. (2001) – Histopathology of fibroadenoma of the breast. **Am. J. Clin. Pathol., 115:** 736-742.

KUIPER, G. G. J. M., ENMARK, E., PELTO-HUIKKO, M., NILSSON, S., GUSTAFSSON, J. A. (1996) – Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proc Natl Acad Sci USA, 93:** 5925-5930.

KUTTENN, F., FOUNIER, S., DURAND, J. C., MAUVAIS, J. P (1981) – Estradiol and progesterone receptors in human breast fibroadenoma. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 52 (6):** 1225-1229.

LAPIDUS, R. G., NASS, S. J., DAVIDSON, N. E. (1998) –The loss of strogen and progesterone receptor gene expression in human breast cancer. **Journal of Mammary Gland na Neoplasia. 3(1):** 85-96.

LEYGUE, E., SNELL, L., DOTZLAW, H., TROUP, S., HILLER-HITCHCOCK, T., MURPHY, L. C., ROUGHLEY, P. J., WATSON, P. H. (2000) – Lumican and decorin are differentially expressed in human breast carcinoma. **J. Pathol., 192:** 313-320.

LIMA, C. R., AGUIAR, J. A. K., MICHELACCI, Y. M. (2005) – Reduced urinary excretion of sulfated polysaccharides in diabetic rats. **Biochimica et Biophysica Acta, 1741:** 30- 41.

LINDAHL, U. (1966a) – Further characterization of the heparin-protein linkage region. **Biochim. Biophys. Acta., 130(2):** 368-382.

LINDAHL, U. (1966b) – The structures of xylosilserine and galactosylxylosilserine from heparin. **Biochim. Biophys. Acta., 130(2):** 361-367.

LINDAHL, U., AXELSSON, O. (1971) – Identification of iduronic acid as the major sulfated uronic acid of heparin. **J. Biol. Chem., 246(1):** 74-82.

LOHMANDER, L. S., DE LUCA, S., NILSSON, B., HASCALL, V. C., CAPUTO, C. P., KIMURA, J. H,, HEINEGARD, D. (1980) – Oligosaccharides on proteoglycans from the swarm rat chondrosarcoma. **J. Biol. Chem., 255(13):** 6084-6091.

LYON, M., DEAKIN, J. A., MIZUNO, K., NAKAMURA, T., GALLAGHER, J. T. (1994) – Interaction of hepatocyte growth factor with heparan sulfate – elucidation of the major heparan sulfate structural determinants. **J. Biol. Chem. 269:** 11216-11223.

LYON, M., DEAKIN,J. A., RAHMOUNE, H., FERNIG, D.G., NAKAMURA, T, GALLAGHER, J.T. (1998) – Hepatocyte growth factor/scatter factor binds with high affinity to dermatan sulphate. **The Journal of Biological Chemistry, 273(1):** 271-278.

MAcCORMICK, D., VAN DER REST, M., GOODSHIP, J., LOZANO, G., NINOMIYA, Y., OLSEN, B. R. (1987) – Structure of the glycosaminoglycans domain in the type IX collagen–proteoglycan. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84(12):** 4044-4048.

MALET, C., GOMPEL, A., YANEVA, H., CREN, H., FIDJI, N., MOWSZOWICZ, I. (1991) – Estradiol and progesterone receptors in cultured normal human breast epithelial cells and fibroblasts: Immunocytochemical studies. **J. Clin. Endocrinol. Metab., 73:** 8-17.

MANSOUR, E. G., RAVDIN, P. M., DRESSLER, L. (1994) – Prognostic factors in early breast carcinoma. **Cancer, 74:** 381-400.

MARKOPOULOS, C., BERGER, U., WILSON, P. (1988) – Oestrogen receptor content of normal breast cells and breast carcinomas throughout the menstrual cycle. **Br. Med. J., 296:** 1349-1351.

MARTIN, T. A., HARRISON, G., MANSEL, R. E., JIANG, W. G. (2003). – The role of the CD44/ezrin complex in cancer metastasis. **Crit. Rev. Oncol.Hematol., 46:** 165-186.

MARTINS, A. M. C., TAMASOII, E., GUERRAII, J. L. (2002) – Histochemical study of fibrillar proteins of the extracellular matrix in benign and malignant mammary neoplasms in dogs. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., 39(1): 43-49.

McGUIRE, W. L., CLARK, G. M. (1992) – Prognostic factors and treatment decisions in axillary-node-negative breast cancer. **N. Engl. J. Med., 326:**1756-1761.

MEDEIROS, G. F., MENDES, A., CASTRO, R. A. B., BAÚ, E. C., NADER, H. B., & DIETRICH, C. P. (2000) - Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. **Biochim. Biophys. Acta., 1475(3):** 287-294.

MELO-JUNIOR, M. R., MACHADO, M. C., ARAÚJO-FILHO, J. L. S., MALTA-PATU, V. J. R., TELLES, A. M. S. (2008) – Análise morfométrica de micronúcleos e colágeno intersticial em tumores de mama. **The Journal of Medical and Biological Science, 7(1):** 545-562.

MERLE, B., DURUSSEL, L., DELMAS, P. D., CLEZARDIN, P. (1999) – Decorin inhibits cell migration through a process requiring its glycosaminoglycan side chain. **J. Cell. Biochem., 75:** 538-546.

MICHELACCI, Y. M., DIETRICH, C. P. (1974) – Isolation and partial characterization of an induced chondroitinase B from *Flavobacterium heparinum*. **Biochem. Biophys. Res. Commun., 56(4)**: 973-980.

MICHELACCI, Y. M., DIETRICH, C. P. (1975) – A comparative study between a chondroitinase B and a chondroitinase AC from *Flavobacterium heparinum*. Isolation of a chondroitinase AC-susceptible dodesaccharide from a chondroitin sulphate B. **Biochem. J., 151(1)**: 121-129.

MICHELACCI, Y. M., DIETRICH, C. P. (1976) – Structure of chondroitin sulfates. Analyses of the products formed from chondroitin sulfates A and C by the action of the chondroitinases A and AC from *Flavobacterium heparinum*. **Biochimica. et Biophysica. Acta., 451(2)**: 436-443.

MICHELACCI, Y. M., DIETRICH, C. P. (1986) – Structure of chondroitin sulphate from whale cartilage: distribution of 6- and 4-sulphated oligosaccharides in the polymer chains. **Int. J. Biol. Macromol., 8:** 108-113.

MICHELACCI, Y. M., GLASHAN, R.Q., SCHOR, N. (1989) – Urinary excretion of glycosaminoglycans in normal and stone forming subjects. **Kidney International, 36:** 1022-1028.

MICHELACCI, Y. M., LAREDO, J., DIETRICH, C. P. (1981) – Proteoglycans and chondroitin sulfates from human multiple chondroma (enchondromatosis). **Braz. J. Med. Biol. Res., 14(2-3):** 161-172.

MICHELACCI, Y. M., MOURÃO, P. A. S., LAREDO, J., DIETRICH, C. P. (1979) – Chondroitin sulfates and proteoglycans from normal and arthrosic human cartilages**. Connect. Tis. Res., 7(1):** 29-36.

MICHELACCI, Y.M. (2003) – Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. **Braz J Med Biol Res**, **36(8):** 1037-1046.

MORGELIN, M., PAULSSON, M., MALSMSTROM, A., HEINEGARD, D. (1989) – Shared and distinct structural features of interstitial proteoglycans from different bovine tissues revealed by electron microscopy. **J. Biol. Chem., 264(20):** 12080-12090.

MOURÃO, P. A. S., MICHELACCI, Y. M., TOLEDO, O. M. S. (1979) – Glycosaminoglycans and proteoglycans of normal and tumoral cartilages of humans and rats. **Cancer Res., 39(7):** 2802-2806.

NADER, H. B. (1991) – Characterization of a heparan sulfate and a peculiar chondroitin 4-sulfate proteoglycan from platelets. Inhibition of the aggregation process by platelet chondroitin sulfate proteoglycan. **J. Biol. Chem., 266(16):** 10518-10523.

NADER, H. B., DIETRICH, C. P. (1989) – Natural occurrence and possible biological role of heparin. In: LANE, D.A. & LINDAHL, U. (Eds),– **Heparin: chemical and biological properties, clinical applications**, p. 81.

NADER, H. B., DIETRICH, C. P., BUONASSISI, V., COLBURN, P. (1987) – Heparin sequences in the heparan sulfate chains of an endothelial cell proteoglycan. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84(11):** 3565-3569.

NADER, H. B., PORCIONATTO, M. A., TERSARIOL, I. L., PINHAL, M. A., OLIVEIRA, F. W., MORAES, C. T., DIETRICH, C. P. (1990) – Purification and substrate specificity of heparitinase I and heparitinase II from Flavobacterium heparinum. Analyses of the heparin and heparan sulfate degradation products by ^{12}C NMR spectroscopy. **J Biol Chem., 265(28):** 16807-16813.

NARA, Y., KATO, Y., TORII, Y., TSUJI, Y., NAKAGAKI, S., GOTO, S., ISOBE, H., NAKASHIMA, N., AND TAKEUCHI, J. (1997) – Immunohistochemical localization of extracellular matrix components in breast tumors with special reference to PG-M/versican. **Histochem. J., 29:** 21-30.

NAZÁRIO, A. C. P., REGO, M. F., OLIVEIRA, V. M. (2007) – Nódulos benignos da mama: uma revisão dos diagnósticos diferenciais e conduta. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet., (29):** 211-219.

NICHOLSON, R. I., McCLELLAND, R. A., ROBERTSON, J. F. R., GEE, J. M. W (1999) – INVOLVEMENT OF STEROID HORMONE AND GROWTH FACTOR CROSS-TALK IN ENDOCRINE RESPONSE IN BREAST CANCER. **Endodrine-Related Cancer., 6:** 373-387.

NILSSON, B., DE LUCA, S., LOHMANDER, S. (1982) – Structure of N-linked and O-linked oligosaccharides on proteoglycan monomer isolated from the swarm rat chondrosarcoma. **J. Biol. Chem., 257(18):** 10920-10927.

NISHIYAMA, A., DAHLIN, K. J., STALLCUP, W. B. (1991) – The expression of NG2 proteoglycan in the developing rat limb. **Development, 111(4):** 933-944.

NOONAN, D. M., FULLE, A., VALENTE, P., CAI, S., HORIGAN, E., SASAKI, M., YAMADA, Y., HASSELL, J. R. (1991) – The complete sequence of perlecan, a basement membrane heparan sulfate proteoglycan, reveals extensive similarity with laminin A chain, LDL-receptor and NCAM, J**. Biol. Chem., 266:** 22939-22947.

NORIAN, J. M., MALIK, M., PARKER, C. Y., JOSEPH, D., LEPPERT, P. C., SEGARS, J. H., CATHERINO, W. H. (2009) – Transforming growth factor B3 regulates versican variants in the extracellular matrix-rich uterine leiomyoma. Reprod. Sci. [Epub ahead of print].

OEBEN, M., KELLER, R., STUHLSATZ, H. W., GREILING H. (1987) – Constant and variable domains of different disaccharide structure in corneal keratin sulphate chains. **J. Biochem., 248**: 85-93.

OEGEMA E., KRAFT, E. L., JOURDIANLL, G. W., VANVALEN, T. R. (1984) – Phosphorylation of chondroitin sulfate in proteoglycans from the swarm rat chondrosarcoma. **J. Biol. Chem., 259(63):**1720-1726.

OHARA N. (2009) – A putative role of versican in uterine leiomyomas. **Clin Exp Obstet Gynecol., 36(2):** 74-75.

OLDBERG, D., ANTONSSON, P., LINDBLOM, K., HEINEGARD, D. (1989) – A collagen-biding 59-kd protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial proteoglycans PG-S1 and PG-S2 (decorin). **EMBO. J., 8(9):** 2601-2604.

OLSEN, B. R. (1999) – Life without perlecan has its problems. **The Journal of Cell Biology, 147(5):** 909-911.

OLSEN, E. B., TRIER, K., ELDOV, K., AMMITZBOLL, T. (1988) – Glycosaminoglycan in human breast cancer. **Acta. Obstet. Gynecol. Scand., 67(6):** 539-542.

OSBORNE, C. K., HOBBS, K AND CLARK, G.M. (1985) – Effect of estrogens and antiestrogens on growth of human breast cancer cells in athymic nude mice. **Cancer research., 45:** 584-590.

PALMIERI, C., LAM, E.W.-F., MANSI, J., MACDONALD, C., SHOUSHA, S., MADDEN, P., OMOTO, Y., SUNTERS, A., WARNER, M., GUSTAFSSON, JAN-ÅKE, COOMBES, R. C. (2004) – The Expression of ERcx in Human Breast Cancer and the Relationship to Endocrine Therapy and Survival. **Clinical Cancer Research., (10):** 2421–2428.

PARRY, G., LEE, E.Y, FARSON, D., KOVAL, M., BISSELL, M.J. (1985) – Collagenous substrata regulate the nature and distribution of glycosaminoglycans produced by differentiated cultures of mouse mammary epithelial cells. **Exp. Cell. Res., 156(2):** 487-499.

PAVÃO, M. S. G., MOURÃO, P. A. S., MULLOY, B., TOLLEFSEN, D. M. (1995) - A unique dermatan sulfate-like glycosaminglycan from ascidian: its structure and the effect of its unusual sulfation patterns on anticoagulant activity. **J. Biol. Chem., 270(52):** 31027-31036.

PYE, D. A., GALLAGHER, J. T. (1999) – Monomer complexes of basic fibroblast growth factor and heparan sulfate oligossacharides are the minimal functional unit for the cell activation. **The Journal of Biological Chemistry, 274 (19):** 13456-13461.

PEJLER, G., DAVID, G. (1987) – Basement membrane heparan-sulfate with high affinity for antithrombin synthesized by normal and transformed mouse mammary epithelial cells. **Biochem. J., 248**, 69-77.

PENC, S. F., POMAHAC, B., WINKLER, T, DORSCHNER, R. A., ERIKSSON, E. HERNDON, M. GALLO, R. L. (1998) – Dermatan sulfate released after injury in a potent promoter of fibroblast growth factor-2 function. **J. Biol. Chem., 273(43):** 28116-28121.

PEREIRA, D. A., AGUIAR, J. A. K., HAGIWARA M. K., MICHELACCI, Y. M. (2004) – Changes in cat urinary glycosaminoglycans with age and in feline urologic syndrome. **Biochimica et Biophysica Acta, 1672:** 1-11.

PETERSEN, D. N., TKALCEVIC, G. T., KOZA-TAYLOR, P. H., TURI, T. G., BROWN, T. A. (1998) – Identification of estrogen receptor b2, a functional variant of estrogen receptor b expressed in normal rat tissues. **Endocrinology, 139:** 1082–1092.

PETERSON, O. W., HOYER, P. E., DEURS, B. VAN (1987) – Frequency and distribution of estrogen receptor-positive cells in normal nonlactating human breast tissue, **Cancer Res., 47:** 5748-5751.

PHILIPS, A., CHALBOS, D., ROCHEFORT, H. (1993) – Estradiol increases and antiestrogens antagonize the growth factor- induced activator protein-1 activity in MCF7 breast cancer cells without affecting c-fos and cjun synthesis. **J. Biol. Chem., 268:** 14103-14108.

PICK, P. W., IOSSIDIFIDES, I. A. (1984) – Ocurrence of breast carcinoma within a fibroadenoma. A review. **Arch. Pathol Lab. Med., 108(7):** 590-594.

PILICHOWSKA M, KIMURA N, FUJIWARA H, NAGURA H. (1997) – Immunohistochemical study of TGF-alpha, TGF-beta1, EGFR, and IGF-1 expression in human breast carcinoma. **Mod Pathol., 10(10):** 969-75.

PITELKA, D.R., HAMAMOTO, S.T. (1983) – Ultrastructure of the mammary secretory cells. In: Biochemistry of Lactation. Methan TB. Elselvier.(10): 5024-5031.

PLAAS, A. H. K., ISON, A. L., ACKLAND, J. (1989) – Synthesis of small proteoglycans substituted with keratan sulfate by rabbit articular chondrocytes. **J. Biol. Chem., 264(24):** 14447-14454.

PLAAS, A. H. K., NEAME, P. J., NIVENS, C. M., REISS, L. (1990) – Identification of the keratan sulfate attachment sits on bovine fibromodulin. **J. Biol. Chem., 265(33):** 20634-20640.

POBLACIÓN, C. A., MICHELACCI, Y. M. (1986) – Structural differences of dermatan sulfates from different origins. **Carbohyd. Res., 147:** 87-100.

PONTA, H. (2003) – CD44: from adhesion molecules to signaling regulators. **Nature Reviews in Molecular Cell Biology, 4:** 33-45.

POOLE, A. R., MATSUI, Y., HINEK, A., LEE, E. R. (1989) – Cartilage macromolecules and the calcification of cartilage matrix. **Anatomical Record, (224):** 167-179.

REED, C. C., IOZZO, R. V., (2003) – The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. **Glyconjugate J., 19:** 249-255.

RICCIARDELLI, C., BROOKS, J. H., SUWIWAT, S., SAKKO, A. J., MAYNE, K., RAYMOND, W. A., SESHANDRI, R., LEBARON, R. G., HORSFALL, D. J. (2002) – Regulation of stromal versican expression by breast cancer cells and importance to relapse-free survival in patients with node-negative primary breast cancer. **Clinical Cancer Research, 1054(8):** 1054-1060.

RICCIARDELLI, C., MAYNE, K., SYKES, P. J., RAYMOND, W. A., McCAUL, K. MARCHALL, V. R., TILLEY, W. D., SKINNER, J. M., HORSFALL, D. J. (1997) – Elevated estromal chondroitin sulfate glycosaminoglycans predicts progression in early-stage prostate cancer. **Clin. Cancer Res., 3:** 983-992.

RICCIARDELLI, C., SAKKO, A. J., WEEN, M. P., RUSSELL, D. L. HORSFALL, D.J. (2009) – The biological role and regulation of versican levels in cancer. **Cancer Metastasis Rev., 28:** 233–245.

RICKETTS, D., TURNBULL, L., RYALL, G., BAKHSHI, R., RAWSON, N. S. B., GAZET, J. C., NOLAN, C., COOMBES, R. C. (1991) – Estrogen and Progesterone Receptors in the Normal Female **Breast Cancer Research, 51:** 1817-1822.

ROSEN, P. P. (2001) – Rosen´s breast pathology. **2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven,** p.143-55.

ROSENBERG, L.C., CHOI, H.U., TANG, L.H., JOHNSON, T.L., PAL, S., WEBBER, C., REINER, A., POOLE, A.R. (1985) – Isolation of dermatan sulphate proteoglycans from mature bovine articular cartilages. **J. Biol. Chem., 260(10):** 6304-6313.

ROTHENBERG, M. E., POMERANTZ, J. L., OWEN, W. F., AVRAHAM, S., SOBERMAN, R. J., AUSTEN, K. F., STEVENS, R. L. (1988) – Characterization of a human eosinophil proteoglycan, and augmentation of its biosynthesis and size by interleukin 3, interleukin 5, and granulocyte / macrophage colony stimulation factor. **J. Biol. Chem., 263(27):** 13901-13908.

ROUGHLEY, P. J., WHITE, R. J., MORT, J. S. (1996) – Presence of pro-forms of decorin and biglycan in human articular cartilage**. Biochem J., 318(3):** 779–784.

ROUSLAHTI, E., YAMAGUCHI, Y. (1991) – Proteoglycan as modulatorsof growth factor activities. **Cell Press, 64:** 867-869.

RUEGG, M. (1996) – Agrin, laminin b2 (s-laminin) and ARIA: their role in neuromuscular development. **Curr. Opin. Neurobiol., 6:** 97-103.

SADLONOVA, A., NOVAK, Z., JOHNSON, M. R., BOWE, D. B, GAULT, S. R., PAGE, G. P., THOTTASSERY, J. V., WELCH, D. R., FROST A. R. (2005) – Breast fibroblasts modulate epithelial cell proliferation in three-dimensional *in vitro* co-culture. **Breast Cancer Res., 7:**46-59.

SALGADO, R. M., CAPELO, L. P., FAVARO, R. R., GLAZIER, J. D., APLIN, J. D., ZORN, T. M. (2009) – Hormone-regulated expression and distribution of versican in mouse uterine tissues. **Reprod Biol Endocrinol.;7 (60):**1-10.

SALMIVIRTA, M., ELENIUS, K., VAINIO, S., HOFER, U., CHIQUET-EHRISMANN, R. (1991) – Syndecan from embryonic tooth mesenchyme binds tenascin. **J. Biol. Chem., 266 (12):** 7733-7739.

SAMPAIO, L. O., BAYLISS, M. T., HARDINGHAM, T. E., MUIR H. (1988) – Dermatan sulphate proteoglycan from human articular cartilage. Variation in its contents with age and structural comparison with a small chondroitin sulfate proteoglycan from pig laryngeal cartilage. **Biochem. J., 254(3):** 757-764.

SAMPAIO, L. O., DIETRICH, C. P., GIANOTTI FILHO, O. (1977) – Changes in sulfated mucopolysaccharide composition of mammalian tissues during growth and cancerization. **Biochim. Biophys. Acta, 448**: 123-131.

SANTOS, E. A, PEREIRA, N. M. L., SILVA, E. L., ROCHA, L. R. M., PAIVA, J. F., DIETRICH, C. P., NADER, H. B. (1996) – Distribution of heparin and “mast cells” in tissue of the mollusc *Anomalocardia brasiliana*. XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu, MG, **Livro de Resumos**, (L-18), p.109.

SAPINO, A. (2006) – Routine assessment of prognostic factors in breast cancer using a multicore tissue microarray procedure. **Virchows Arch., 449(3):** 288-296.

SAUDERS, S., PAINE-SAUDERS, S., LANDER, A. D. (1997) – Expression of cell surface proteoglycan k-glypican 5 is developmentally regulated kidney, limb and brain. **Dev. Biol., 190:** 78-93.

SAUNDERS, S., BERNFIELD, M. (1988) – Cell surface proteoglycan binds mouse mammary epithelial cells to fibronectin and behaves as a receptor for interstitial matrix. **J. Cell Biol., 106(2):** 423-430.

SCHMIDT, G., ROBENEK, H., HARRACH, B. (1987) – Interaction of small dermatan sulfate proteoglycans from fibroblasts with fibronectin. **J. Cell Biol., 104:** 1683-1691.

SCHVERCH, C. III, ROSEN, P. P., HIROTA, T. (1982) – A pathological study of benign breast diseases in Tokyo and New York. **Cancer., 50(9):** 1899-1903.

SCHWARTZ, N. B., DOMOWICZ, M., KRUEGER, R. C., LI, H., MANGOURA, D. (1996) – Brain aggrecan. **Perspectives on developmental neurobiology, 3(4):** 291-306.

SCHWARTZ, N. B., RODÉN, L. (1975) – Biosynthesis of chondroitin sulfate. Solubilization of chondroitin sulfate glycosultransferases and partial purification of uridine diphosphate-D-galactose: D-galactose:D-xylose galactoyltrans. **J. Biol. Chem., 250(13):** 5200-5207.

SCOTT, J. E. (1992) – Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, *in vitro* and in the tissues. **FASEB J., 6:** 2639-2645.

SCOTT, J. E., ORFORD, C. R. (1981) – Dermatan sulphate-rich proteoglycan associates with rat tail-tendon collagen at the D band in the gap region. **Biochem. J., 197(1):** 213-316.

SEAGROVES, T. N., LYDON, J. P., HOVEY, R. C., VONDERHAAR, B. K., ROSEN, J. M. (2000) –C/EBPβ (CCAAT/enhancer binding protein) controls cell fate determination during mammary gland development. **Mol. Endocrin., 14:** 359-368.

SEIDENBECHER, C. I., RICHTER, K., RAUCH, U., FASSLER, R., GARNER, C. C.,GUNDELFINGER, E.D. (1995) – Brevican, a chondroitin sulfate proteoglycan of rat brain, occurs as secreted and cell surface glycosylphosphatidylinositol-anchored isoforms **The Journal Of Biological Chemistry., 270(45):** 27206-27212.

SERGEANT, N., LYON, M., RUDLAND, P. S., FERNIG, D. G. , DELEHEDDE , M. (2000) – Stimulation of DNA synthesis and cell proliferation of human mammary myoepithelial-like cells by hepatocyte growth factor/scatter factor depends on heparan sulfate proteoglycans and sustained phosphorylation of mitogen-activated protein kinases p42/44. **J. Biol. Chem. 275:** 17094-17099.

SHENG, W., WANG, G., LA PIERRE, D. P., WEN, J., DENG, Z., WONG, C. K. A., LEE, D. Y., YANG, B.B. (2006) –Versican Mediates Mesenchymal-Epithelial Transition. 2009-2020.

SHIEH, M. T., WUDUNN, D., MONTGOMERY, R. Y., ESKO, J. D., SPEAR, P. G. (1992) – Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. **J. Cell Biol., 116(5):** 1273-1281.

SHINOMURA, T., NISHIDA, Y., ITO, K., AND KIMATA, K. (1993) – DNA cloning of PG-M, a large chondroitin sulfate proteoglycan expressed during chondrogenesis in chick limb buds. Alternative spliced multiforms of PG-M and their relationships to versican. **J. Biol. Chem. 268:** 14461-14469.

SHIOI, J., ANDERSON, J. P., RIPELLINO, J. A., ROBAKIS N. K. (1992) – Chondroitin Sulfate proteoglycan form of the Alzheimer's β-amyloid precursor **The Journal of Biological Chemistry, 267(20):** 13819-13822.

SILVA, M. E., DIETRICH, C. P. (1975) - Structure of heparin. Characterization of the products formed from heparin by the action of a heparinase from *Flavobacterium heparinum*. **J. Biol. Chem., 250(17):** 6841-6846.

SILVA, M. E.; DIETRICH, C. P. (1974) – Isolation and partial characterization of three induced enzymes from Flavobacterium heparinum involved in the degradation of heparin and heparitin sulfate. **Biochim. Biophys. Res. Commun., 56**: 965-971.

SIMOMOTO, M. M. , NAZÁRIO, A. C. P., GEBRIM, L. H., SIMÕES, M. J., BARACAT, E. C., LIMA, G.R. (1999) – Morphometric analysis of the epithelium of mammary fibroadenomas during the proliferative and secretory phases of the menstrual cycle. The Breast Journal, 5(4): 256–261.

SKANDALIS, S. S., STYLIANOU, M., VYNIOS, D. H., PAPAGEORGAKOPOULOU, N., THEOCHARIS, D. S. (2007) – The structural and composition changes of glycosaminoglycans are associated with tissue type in human laryngeal cancer. **Biochimie., 89:** 1573-1580.

SOBUE, M., TAKEUCHI, J., YOSHIDA, K., AKAO, S., FUKATSU, T., NAGASAKA, T., NAKASHIMU, N. (1987) – Isolation and characterization of proteoglycans from human nonepithelial tumors. **Cancer Research, 47:** 160-168.

SODERQVIST, G., VON SCHOULTZ, B. O., TANI, E., SKOOG, L. (1993) – Estrogen and progesterone receptor content in breast epithelial cells from healthy women during the menstrual cycle. **Am. J. Obstet. Gynecol., 168:** 874-879.

SOMMARIN, Y., WENDEL, M., SHEN, Z., HELLMAN, U., HEINEGÅRD, D. (1998) – Osteoadherin, a Cell-binding Keratan Sulfate Proteoglycan in Bone, Belongs to the Family of Leucine-rich Repeat Proteins of the Extracellular Matrix, **Journal of Biological Chemistry, 273(27):** 1672-16729.

SORIANO, E. S., CAMPOS, M. S., AGUIAR, J. A., MICHELACCI, Y. M. (2001) – Effect of epithelial debridement on human cornea proteoglycans. **Braz. J. Med. Biol. Res., 34(3):** 325-331.

SORIANO, E. S., CAMPOS, M. S., MICHELACCI, Y. M. (2000) – Effect of epithelial debridement on glycosaminoglycan synthesis by human corneal explants. **Clin Chim Acta., 295(1-2):** 41-62.

STALLCUP, W. B. (1981) - The NG2 antigen, a putative lineage marker: immunofluorescent localization in primary cultures of rat brain. **Dev. Biol., 83(1):** 154-165.

STEVENS, R. L., KAMADA, M. M., SERAFIN, W. E. (1989) – Structure and function of the family of proteoglycans that reside in the secretory granules of natural killer cells of the immune response. **Curr. Top. Microbiol. Immunol., 140:** 94-108.

STIPP, C. S., LITWARCK, E. D., LANDER, A. D. (1994) – Cerebroglycan: an integral membrane heparan sulfate proteoglycan that is unique to developing nervous system and expressed specifically during neuronal differentiation. **J. Cell Biol., 124(1-2):** 149-60.

STÖCKER, G., MEYER, H. E., WAGENER, C., AND GREILING, H. (1991) – Purification and *N*-terminal amino acid sequence of a chondroitin sulphate/dermatan sulphate proteoglycan isolated from intima/media preparations of human aorta. **Biochem. J., 274:** 415 –420.

STRAUS, A. H., NADER, H. B., TAKAHASHI, H. P., DIETRICH, C. P. (1982) – Ontogeny of heparin in mammals: a correlation with the appearance of mast cells in tissues. **An. Acad. Brasil. Cienc., 54(2):** 439-448.

STREULI, C. H., SCHMIDHAUSER, C., KOBRIN, M., BISSELL, M. L., DERYNCK, R. (1993) – Extracellular matrix regulates expression of the TGF-beta 1 gene. **Journal of Cell Biology., 120:** 253-260.

SUN, X., MOSHER, D. F., RAPRAEGER, A. (1989) – Heparan sulfate-mediated binding of epithelial cell surface proteoglycan to thrombospondin. **J. Biol. Chem., 264(5):** 2885-2889.

SUNIL, N., SRINIVASAN, N., ARULDHAS, M. M., GOVINDARAJULU, P. (2000) – Impacto f oestradiol and progesterone on the glycosaminoglycans and their depolymerizing enzymes of the rat mammary gland. **Acta Physiol Scand., 168:** 385-392.

SUWIWAT, S., RICCIARDELLI, C., TAMMI, R., TAMMI, M., AUVINEN, P., KOSMA, V. M., LEBARON, R. G., RAYMOND, W. A., TILLEY, W. D., HORSFALL, D. J. (2004) – Expression of extracellular matrix components versican, chondroitin sulfate, tenascin, and hyaluronan, and their association with disease outcome in node-negative breast cancer. **Clinical Cancer Research, 10:** 2491- 2498.

SVENNEVIG, K., PRYDZ, K., KOLSET, S. O. (1995) – Proteoglycans in polarized epithelial Madin-Darby canine. **kidney cells Biochem. J., 311(3):** 881-888.

TAKEUCHI, J., SOBUE, M., SATO, E., SHAMOTO, M., MIURA, K., NAKAGAKI, S. (1976) – Variation in glycosaminoglycan components of breast tumors. **Cancer Research, 36:** 2133-2139.

TANTRAVAHI, R. V., STEVENS, R. L., AUSTEN, K. F., WEIS, J. (1986) – A single gene in mast cells encodes the core peptides of heparin and chondroitin sulfate proteoglycans. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83(23):** 9207-9210.

TERSARIOL, I. L. S., FERREIRA, T. M. P. C., MEDEIROS, M. G. L., PORCIONATTO, M. A., MORAES, C. T., ABREU, L. R. D., NADER, H. B., DIETRICH, C. P. (1994) - Sequencing of heparan sulfate proteoglycans: identification of variable and constant oligosaccharide regions in eight heparan sulfate proteoglycans of different origins. **Braz. J. Med. Biol. Res., 27(9):** 2097-2102.

THONAR, E. J., SWEET, M. B. E. (1979) – An oligossaccharide component in proteoglycans of articular cartilage. **Biochim. Biophys. Acta., 584(84):** 353-357.

TIEDEMANN, K., LARSSON, T., HEINEGARD, D., MALMSTRÖM, A. (2001) – The glucuronyl C5-epimerase activity is the limiting factor in the dermatan sulphate biosynthesis. **Arch. Biochem. Biophys., 391**: 65-71.

TSARA, M. E. , THEOCHARIS, A. D., THEOCHARIS, D. A. (2002) – Compositional and structural alterations of proteoglycans in human rectum carcinoma with special reference to versican and decorin, **Anticancer Res.,** 22**:** 2893-2898.

TSEN, G., NAPIER, A., HALFTER, W., AND COLE, G. J. (1995) – Identification of a novel alternatively spliced agrin mRNA that is preferentially expressed in non-neuronal cells. **J. Biol. Chem., 270:** 15934-15937.

TUNG, L., MOHAMED, M. K., HOEFFLER, J. P., TAKIMOTO, G. S., HORWITZ, K. B. (1993) – Antagonist-occupied human progesterone B-receptors activate transcription without binding to progesterone response elements and are dominantly inhibited by A-receptors. **Mol Endocrinol., 10:** 1256-1265.

TURNBULL, J. E., GALLAGHER, J. T. (1991) – Sequence analysis of heparan sulphate indicates defined location of N-sulphated glucosamine and iduronate 2-sulphate residues proximal to the protein-linkage region. **Biochem. J., 277(2):** 297-303.

VAN PUTTEN, J.P., PAUL, S.M. (1995) - Binding of syndecam-like cell surface proteoglycan receptors is required for *Neisseria gonorrhoeae* entry into human mucosal cells. **EMBO J., 14(10):** 2144-2154.

VEGETO, E., SHAHBAZ, M. M., WEN, D. X., GOLDMAN, M. E., O'MALLEY, B. W., MCDONNELL, D. P. (1993) – Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. **Mol Endocrinol., (10):** 1244-1255.

VELLEMAN, S. G., LI, X., COY, C. S., MCFARLAND, D. C. (2008) – The effect of fibroblast growth factor 2 on the in vitro expression of syndecan-4 and glypican-1 in turkey satellite cells. **Poult Sci ., 87:** 1834-1840.

VEUGELERS, M., CAT, B. DE, CEULEMANS, H., BRUYSTENS, A. M., COOMANS, C., DURR, J., VERMEESCH, J., MARYNEN, P. DAVID, G. (1999) – Glypican-6, a new member of the glypican family of cell surface heparan sulfate proteoglycans. **The Journal of Biological Chemistry, 274(38):** 26968-26977.

VIJAYAGOPAL, P., FIGUEROA, J. E., LEVINE, A. E. (1998) – Altered composition and increased endothelial cell proliferative activity of proteoglycans isolated from breast carcinoma. **J. Surg. Oncol., 68(4):** 250-254.

VOGEL K.G. (1996) – The effect of compressive loading on proteoglycan turnover in cultured fetal tendon. **Conn. Tissue Res., 34:** 227-237.

VOGEL, K. G., SANDY, J. D., POGANY, G., ROBBINS, JR. (1994) – Aggrecan in bovine tendon. **Matrix Biology, 14:** 171-179.

WANG, W., XU, G. L., JIA, W. D., MA, J.L., LI, J.S., SHENG GE, Y., REN, W.H., JI-HAI YU, WEN-BIN LIU (2009) – Ligation of TLR2 by versican: a link between inflammation and metastasis**. Archives of Medical Research 40:** 321-323.

WANG, X.F., LIN, H. Y., NG-EATON, E., DOWNWARD, J., LODISH, H. F., WEINBERG, R. A. (1991) – Expression cloning and characterization of the TGF-b type III receptor, **Cell, 67:** 797-805.

WARBURTON, M. J., KIMBELL, R. A., FERNS, S. A., HAYMAN, A. R., PERUNSINGHE, N, MONAGHAN, P. (1992) – Characterization of chondroitin/dermatam sulfate proteoglycans synthesized by rat mammary mioepithelial and fibroblastic cell lines. **Biochimica et Biophysica Acta, 1117(3):** 291-300.

WATANABE, E., MAEDA, N., MATSUI, F., KUSHIMA, Y., NODA, M., OOHIRA, A. (1995) – Neuroglycan C, a novel membrane-spanning chondroitin sulfate proteoglycan that is restricted to the brain. **J. Biol Chem., 270(45):** 26876-26882.

WENDEL, M., SOMMARIN, Y., AND HEINEGÅRD, D. (1998) – Bone Matrix Proteins: Isolation and Characterization of a Novel Cell-binding Keratan Sulfate Proteoglycan (Osteoadherin) from Bovine Bone., **J. Cell Biol., 141:** 839-847.

WIEBE, J. P. (2006) – Progesterone metabolites in breast cancer – review. **Endocrine-Related Cancer 13(3):** 717 -738.

WIGHT, T. N., HEINEGÅRD, D. K., HASCALL, V. C. (1991) – Proteoglycans: Structure and Function. In: HAY, E. D. (Ed.) **Cell Biology of Extracellular Matrix**, 2nd Edition, Plenum Press, p. 45-78.

WIGHT, T. N., LARA, S., RIESSEN, R., LEBARON, R., ISNER, J. (1997) – Selective deposits of versican in the extracellular matrix of restenotic lesions from human peripheral arteries. **Am. J. Pathol., 151:** 963-973.

WILSIE, L. C., CHANCHANI, S., NAVARATNA, D., ORLANDO, R.A. (2005) – Cell surface heparan sulfate proteoglycans contribute to intracellular lipid accumulation in adipocytes. **Lipids in Health and Disease 4(2):** 1-15.

WINNEMÖLLER, M., SCHÖN, P., VISCHER, P., KRESSE, H. (1992) – Interactions between thrombospondin and the signal proteoglycan decorin: interference with cell attachment. **Eur. J. Cell Biol.,** 59**:** 47-55.

WOODS, A., COUCHMAN, J. R. (1994) – Syndecam-4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component. **Mol. Biol. Cell., 5(2):** 183-192.

WU, R. R., COUCHMAN, J. R. (1997) - cDNA cloning of the basement membrane chondroitin sulfate proteoglycan core protein bamacan: a five distinct domain structure including coiled-coil motifs. **J. Cell Biol., 136(2):** 433-444.

YAMAGATA, M., SUZUKI, S., AKIYAMA, S. K., YAMADA, K. M., KIMATA, K. (1989) – Regulation of cell substrate adhesion by proteoglycans immobilized on extracellular substrates. **J. Biol. Chem., 264:** 8012-8018.

YAMAGATA, T., SAITO, H., HABUCHI, O., SUZUKI, S. (1968) – Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. **J. Biol. Chem., 243(7):**1523-1535.

YAMAGUCHI, Y., MANN, D. M., RUOSLAHTI, E. (1990) – Negative regulation of transforming growth factor-b by the proteoglycan decorin. **Nature, 346:** 281-284.

YANG, B. L., ZHANG, Y., CAO, L., YANG, B. B. (1999) – Cell adhesion and proliferation mediated through the G1 domain of versican. **Journal of Cellular Biochemistry, 72:** 210-220.

YASUDA, Y., TOKITA, Y., AONO, S., MATSUI, F., ONO, T., SONTA, S., WATANABE, E., NAKANISHI, Y., OOHIRA, A. (1998) – Cloning and chromosomal mapping of the human gene of neuroglycan C (NGC), a neural transmembrane chondroitin sulfate proteoglycan with an EGF module. **Neurosci Res., 32:** 313-322.

YAYON, A., KLAGSBRUN, M., ESKO, J. D., LEDER, P. & ORNITZ, D. M. (1991) – Cell surface, heparin-like molecules are required for biding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. **Cell, 64(4):** 841-848.

YEE, A. J.M., AKENS, M., YANG, B.L., FINKELSTEIN, J., ZHENG, P. S., DENG, Z. YANG, B. (2007) – The effect of versican G3 domain on local breast cancer invasiveness and bony metastasis. **Breast Cancer Research, 9(4):** 1 -11.

ZIMMERMAN, D. R., RUOSLAHTI, E. (1989) – Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versicam. **EMBO J., 8(10):** 2975-2981.

ZIMMERMANN, D. R., DOURS-ZIMMERMANN, M. T., SCHUBERT, M., BRUCKNER-TUDERMAN, L. (1994) – Versican is expressed in the proliferating zone in the epidermis and in association with the elastic network of the dermis. **J Cell Biol., 124:** 817-825.

APÊNDICE

APÊNDICE

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS:

- LIMA, C.R.; BACCARIN, R.Y.A; MICHELACCI, Y.M. – 1,9 dimethylmethylene blue tests in comparison to agarose gel electrophoresis for quantification of urinry glycosaminoglycans. Clinica Chimica Acta, v. 378, p. 206-215, 2007 *(Premiação PIC – FMVZ-USP-Trabalho com maior índice de impacto no Journal Citation Report do International Scientific Information 2007/2008).*

- LIMA, C. R., AGUIAR, J. A. K., MICHELACCI, Y. M. – Reduced urinary excretion of sulfated polysaccharides in diabetic rats. Biochimica et Biophysica Acta, Molecular Basis of Disease, v. 1741, p 30-41, 2005.

- AGUIAR, J. A. K., LIMA, C. R., BERTO, A.G.A., MICHELACCI, Y. M. - An improved methodology to produce *Flavobacterium heparinum* chondroitinases, important instruments for diagnosis of diseases. Biotechnology and Applied Biochemistry, v.37, n.2, p.115 - 127, 2003.

RESUMOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS:

- SANTOS JUNIOR, J. A. S.; LIMA, C. R.; NAZÁRIO, A. C. P.; MICHELACCI, Y. M. – Quantificação e qualificação de proteoglicanos e glicosaminoglicanos em tecido mamário normal nas fases folicular e lútea do ciclo menstrual. In: III Congresso Paulista de Mastologia, São Paulo, SP, 2007 *(Premiação de melhor tema livre).*

- LIMA, C. R.; BACCARIN, R. Y. A.; MICHELACCI, Y. M. – 1,9 Dimethylmethylene blue tests are unreliable to quantify urinary glycosaminoglycans. In: 10^{th} IUBMB Conference, 2007, Salvador, BA. Livro de resumos: M-5, 2007.

- LIMA, C. R.; JUNIOR, J. A. S.; NAZÁRIO, A. C. P.; MICHELACCI, Y. M. – Changes in human breast proteoglycans and fibroadenoma with the menstrual cycle. In: 10th IUBMB Conference, 2007, Salvador, BA. Livro de resumos: M-17, 2007.

- MICHELACCI, Y. M.; LIMA, C. R.; AGUIAR J. A. K.; BACCARIN,R. Y. A.; – Changes in extracellular matrix proteoglycans and urinary glycosaminoglycans in chronic diseases. In: 5th International Conference on Proteoglycans, 2007, Mangaratiba, RJ. Proceeding of the 5 th International Conference of Proteoglycans. Livro de resumos: p16-17, 2007.

- LIMA, C. R.; JUNIOR, J. A. S.; NAZÁRIO, A. C. P.; MICHELACCI, Y. M. – Changes in proteolgycans from human breast and fibroadenoma during menstrual cycle. In: 5th International Conference on Proteoglycans, 2007, Mangaratiba, RJ. Proceeding of the 5 th International Conference of Proteoglycans. Livro de resumos: p16-17, 2007.

- LIMA, C. R.; SEIXAS, M. D. T. C.; BACCARIN, R. Y. A.; MICHELACCI, Y. M. – Reliability of 1,9 dimethylmethylene blue tests in comparison to agarose gel electrophoresis for quantification of urinary glycosaminolgycans. In: XIII Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, IV International Symposium on Extracellular matrix (SBBC SIMEC), 2006, Búzios, RJ. Livro de resumos: P-29, 2006.

- LIMA, C. R.; MICHELACCI, Y. M. – Renal permeselectivity of dextran sulfate in normal and diabetic rats. In: 3rd International Symposium on Extracellular matrix (SIMEC), 2004, Angra dos Reis, RJ. Livro de resumos: F-17, 92, 2004.

- LIMA, C. R.; MICHELACCI, Y. M. – Impaired renal excretion of dextran sulfate polysaccharides in diabetic rats. In: XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileia de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2004, Caxambú, MG. Livro de resumos: M1, 2003.

- LIMA, C. R.; MICHELACCI, Y. M. – Urinary excretion of dextran sulfate in normal and diabetic rats. In: XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileia de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2003, Caxambú, MG. Livro de resumos: M26, p155, 2003.

- FLORINDO, N. M.; LIMA, C. R.; MICHELACCI, Y. M.; MARTINS, D. M. F. S. – Estudo histoquímico de cicatrização em pele de rato tratada com calêndula (Cirurgia Plástica). In: X Congresso de Iniciação Científica da UNIFESP, 2002, São Paulo, SP. Livro de resumos, p 48, 2002.

- LIMA, C. R.; MICHELACCI, Y. M. – Renal permselectivity in diabetes mellitus. Evalution by urinary excretion of the charged polysaccharide dextran sulfate. In:SIMEC – INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EXTRACELLULAR MATRIX and VI BRAZILIAN SYMPOSIUM ON EXTRACELLULAR MATRIX, 2002, Angra dos Reis, RJ. Livro de resumos, E-31, 2002.

- LIMA, C. R.; LUZ. J.; MICHELACCI, Y. M. – Renal permselectivity of sulfated polysaccharides by normal and diabetic rats. In: XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileia de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2001, Caxambú, MG. Livro de resumos: p151, 2001.

- LIMA, C. R.; LUZ. J.; MICHELACCI, Y. M. – Glicosaminoglicanos teciduais e urinários em modelo experimental de diabetes mellitus. Filtração renal de dextran sulfato. In: IX Congresso de Iniciação Científica – PIBIC, 2001, São Paulo, SP. Livro de resumos, p16, 2001.

- AGUIAR, J. A. K.; LIMA, C. R.; MICHELACCI, Y. M. – Purification of chondroitinases from *Flavobacterium heparinum.* In: XXIX Reunião Annual da sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2000, Caxambú, MG. Livro de resumos, p110, 2000.

- AGUIAR, J. A. K.; LIMA, C. R.; MICHELACCI, Y. M. - Bacterial chondroitinases: Important instruments for the study of extracellular matrix. In: International Symposium on Extracellular Matrix – SIMEC 2000, Angra dos Reis – RJ. Livro de resumos, p1-02, 2000.

- LIMA, C. R.; AGUIAR, J. A. K.; MICHELACCI, Y.M. - An improved method for preparation of chondroitinase AC and B from *Flavobacterium heparinum.* In: XXVIII Reunião Annual da sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 1999 Caxambú, MG. Livro de resumos, p111, 1999.

An improved methodology to produce *Flavobacterium heparinum* chondroitinases, important instruments for diagnosis of diseases

Jair A. K. Aguiar, Cilene R. Lima, Alessandra G. A. Berto and Yara M. Michelacci[1]

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, Rua Três de Maio, 100, 04044-020 São Paulo, SP, Brazil

Chondroitinases are very important tools for the identification and structural analysis of proteoglycans. Enzymic analysis with *Flavobacterium heparinum* chondroitinases has shown that chondroitin sulphate and dermatan sulphate structures are modified in many human diseases, suggesting a diagnostic value for these enzymes. Furthermore, it was recently shown that *F. heparinum* chondroitinases AC and B inhibit tumoural cell growth, invasion and angiogenesis. Due to the increasing importance of *F. heparinum* chondroitinases, we investigated optimized conditions for preparation and assay of chondroitinases AC, B and C. The Dimethylmethylene Blue assay was modified and fully developed to measure the chondroitinase activities of crude extracts of *F. heparinum*. This method estimates chondroitin sulphate or dermatan sulphate depolymerization upon the digestion of chondroitinase, and was compared with A_{232}, which measures the unsaturated products formed. Trypticase was the best culture medium, both for bacterial growth and enzyme induction. The chondroitinases were solubilized by ultrasound under conditions that do not completely disrupt the cells, suggesting that they are located at the periplasmic space. Maximum chondroitinase induction occurred in the presence of 0.2–1.0 g/l chondroitin sulphate. Chondroitin sulphate-degradation products were also inducers, but heparin and heparan sulphate were not. Chondroitinases AC, B and C were separated from each other by hydrophobic-interaction chromatography on Phenyl-Sepharose HP. When contaminant proteins were first removed from crude extract by Q-Sepharose, the chondroitinases could be purified to homogeneity in this phenyl-Sepharose chromatographic step.

Introduction

Proteoglycans are glycoconjugates composed by a protein core with at least one covalently linked glycosaminoglycan side chain. They are ubiquitous compounds present at the cell surface and extracellular matrix of both vertebrates and invertebrates. Individual proteoglycans interact specifically with other matrix components, such as collagen, laminin and fibronectin, as well as with growth factors and cytokines [1,2]. These interactions may affect cell growth, migration, adhesiveness and differentiation, and many of these functions seem to be dependent on the glycosaminoglycan side chains [3].

Glycosaminoglycans are a family of polydisperse, highly sulphated complex mixtures of linear polysaccharides. Defining the structure of glycosaminoglycans is an important task in elucidating their structure-activity relationship. Structural analysis of glycosaminoglycans revealed that they are very complex polymers, and their structures are cell- and tissue-specific [4–7]. Furthermore, it is now apparent that cells dynamically regulate the structure of their glycosaminoglycan chains to differentially control extracellular signals [8,9]. Anomalous glycosaminoglycan structures have been found both in tissues and urine samples from patients with many diseases, including mucopolysaccharidoses [10], cancer [11,12], arthrosis [13] and aortic dissection [14]. In many cases, such as mucopolysaccharidoses and cancer, structural analysis of urinary glycosaminoglycans permits the early diagnosis of the disease.

Most of these structural analyses were performed through enzymic methods, using bacterial mucopolysaccharidases. Among them, *Flavobacterium heparinum* chondroitinases, heparinase and heparitinases are especially important. *F. heparinum* chondroitinases are very useful tools for identification and structural analysis of chondroitin sulphate and dermatan sulphate from different origins [15–18]. Furthermore, it was recently shown that *F. heparinum* chondroitinases B and AC have anti-tumour activities, causing inhibition of angiogenesis, cell proliferation and

Key words: chondroitin sulphate, dermatan sulphate, glycosaminoglycan, mucopolysaccharidase, proteoglycan.

Abbreviation used: HIC, hydrophobic-interaction chromatography.

[1] To whom correspondence should be addressed (e-mail yara.bioq@epm.br).

ΔDi0S, unsaturated non-sulphated disaccharide; ΔDi4S, unsaturated 4-sulphated disaccharide; ΔDi6S, unsaturated 6-sulphated disaccharide; ΔdidiS, unsaturated disulphated disaccharide; GalNAc, *N*-acetylgalactosamine; GalNAc6S, *N*-acetylgalactosamine 6-sulphate; Tetra, tetrasaccharides; Oligos, oligosaccharides;

© 2003 Portland Press Ltd

invasion [19,20]. The present interest in the use of *F. heparinum* chondroitinases AC, C and B for studies on glycosaminoglycans and proteoglycans led us to improve the methods for production of these enzymes.

F. heparinum (*Cytophaga heparinia*) is a micro-organism originally selected from the soil by its ability to utilize heparin as its sole source of carbon, nitrogen and sulphur [21]. Heparin- and heparan sulphate-degrading enzymes have been purified and characterized from heparin-induced bacteria [22–24]. Furthermore, *F. heparinum* synthesizes enzymes that degrade chondroitin sulphate, dermatan sulphate and hyaluronic acid [25]. Chondroitinases (or chondroitin lyases) catalyse the depolymerization of these glycosaminoglycans into disaccharides and oligosaccharides with Δ4,5-unsaturated uronic acid residues at their non-reducing ends. These products are further degraded by glycuronidases and sulphatases.

Three chondroitinases were first isolated and characterized in our laboratory: chondroitinase B [26], chondroitinase C [27] and chondroitinase ABC [28]. Chondroitinase AC was isolated by Yamagata et al. [29]. Chondroitinases AC, B and C are endoglycosidases with different specificities: chondroitinase AC acts upon chondroitin 4-sulphate, chondroitin 6-sulphate, hyaluronic acid and the glucuronic acid-containing regions of dermatan sulphate; chondroitinase C acts upon the 6-sulphated and non-sulphated regions of chondroitin sulphates as well as upon hyaluronic acid; chondroitinase B degrades the iduronic acid-containing regions of dermatan sulphate. In contrast, chondroitinase ABC cleaves the glycosidic linkages of chondroitin sulphates and dermatan sulphate in an exolytic fashion, forming unsaturated disaccharides from the reducing end of the polymer [28]. It is known that chondroitinases B and ABC are induced when the micro-organism is grown in the presence of either chondroitin sulphate or dermatan sulphate. Chondroitinases AC and C are present in non-induced cells but the specific activities of these enzymes also increase when the bacteria were grown in the presence of chondroitin sulphate or dermatan sulphate, suggesting that their expression is also regulated by the inducer [27,30]. Chondroitin sulphate is unable to induce heparinase and heparitinases and heparin is incapable of inducing chondroitinases, suggesting that their expressions are independently regulated [31].

F. heparinum is a fastidious organism, usually cultured in complex media such as meat peptone (peptone) or tryptic soy broth (trypticase). For enzyme preparation, crude extracts are obtained through cell disruption by ultrasound and removal of debris by centrifugation. Nevertheless, the chondroitinase yields vary a lot among different preparations, especially for cells grown in peptone.

These chondroitinases have been purified from crude extracts either by agarose-gel electrophoresis [22,26,27] or by column chromatography based on ion exchange [25,32], gel permeation [25,28], adsorption on hydroxyapatite [33] or affinity chromatography [34]. However, agarose-gel electrophoresis is very time consuming and gives low yields of pure enzymes whereas poor reproducibility has been obtained for column chromatography, especially on hydroxyapatite and ion-exchange media.

Thus the objective of the present paper was to investigate the factors that influence the chondroitinase yields in *F. heparinum* crude extracts, and to establish a simple and reliable method for chondroitinase purification. We studied the effects of broth composition and presence of inducer upon the kinetics of bacterial growth and chondroitinase production, as well as the consequences of ultrasound application upon chondroitinase solubilization. We also established a simple method for the purification of chondroitinases AC, B and C based on hydrophobic-interaction chromatography (HIC) and developed an enzyme assay suitable for detection of chondroitinases in both crude extracts and purified preparations.

Materials and methods

Materials

Chondroitin 4-sulphate (from whale cartilage), chondroitin 6-sulphate (from shark cartilage), dermatan sulphate (from pig skin), meat peptone and protein molecular-size markers (prestained SDS molecular-mass markers) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.). Heparan sulphate (from bovine pancreas) was prepared by methods described previously [35,36]. Tryptic soy broth without dextrose and bacto-agar were purchased from Difco Laboratories (Detroit, MI, U.S.A.). Agarose (standard, low molecular mass) and protein molecular-size markers were purchased from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, U.S.A.). Acrylamide, *N*,*N*-methylenebisacrylamide, *N*,*N*′,*N*′-tetramethylethylenediamine, 1,3-diaminopropane and ethylenediamine were from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, U.S.A.). $(NH_4)_2MoO_4$, $CoCl_2$, $MnSO_4$, $CuSO_4$, $FeSO_4$, $CaCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$, K_2HPO_4, Na_2HPO_4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, L-histidine, L-methionine and glucose were purchased from E. Merck (Darmstadt, Germany). HiTrap HIC Test Kit, Phenyl-Sepharose High Performance (HP) and Q-Sepharose Fast Flow were purchased from Amersham Biosciences (São Paulo, Brazil). 1,9-Dimethylmethylene Blue chloride (Taylor's Blue) was from Serva Feinbiochemica (Heidelberg, Germany).

Micro-organism

F. heparinum (ATCC 13,125) was maintained in agar slopes containing 2.7% tryptic soy broth without dextrose (tryp-

© 2003 Portland Press Ltd

ticase) and 1 % bacto-agar. This bacterium is a Gram-negative rod (approx. 1 μm $\times$ 0.3 μm), non-motile and non-spore-forming. A pure culture was achieved by serial dilution of shake-flask culture and subsequent plating to isolate single colonies. These colonies were streaked on to individual slants, grown for 2–3 days at room temperature (approx. 25 °C) and stored at 4 °C for 4 weeks.

F. heparinum culture

Experiments were conducted in shake flasks and the micro-organism was always grown at 28 °C. One defined medium and two complex media were used, with or without addition of inducer (chondroitin sulphate, unless otherwise stated). The complex media were peptone (10 g/l meat peptone) and trypticase (27 g/l tryptic soy broth without dextrose, composed by 17 g/l casein peptone, 3 g/l soy peptone, 5 g/l NaCl and 2.5 g/l K_2HPO_4). The defined liquid medium was the same as that originally developed for heparinase production [37]. The concentration of inducer varied as stated in the text.

To produce chondroitinases, 500 ml shake flasks containing 50 ml of one of the above media were prepared. In the case of defined medium, solutions without $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, glucose, L-histidine or L-methionine were made. The flasks were sterilized with 1 kg of steam/cm^2, along with stock solutions of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (30 g/l) and glucose (200 g/l). The flasks and the stock solutions were cooled to 25 °C. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (1 ml), glucose (2 ml), L-histidine and L-methionine (2 mg/l, 5 ml) were added to defined medium. After sterilization, the pH values of peptone, trypticase and defined media were 7.1, 7.2 and 6.7, respectively. Shake flasks were inoculated from slants and incubated at 28 °C on a stroke shaker at 100 rev./min. After 24 h, 1 ml aliquots of the cell suspensions thus obtained were inoculated in fresh culture media, with or without chondroitin sulphate as an inducer. Growth continued for 36 h during which time the peptone and trypticase pH values increased to 7.8 and 7.5 respectively and the defined medium broth dropped to pH 6.2.

At different times, aliquots were collected and cell density, inducer concentration (when present) and chondroitinase activities were measured. Cell density was measured by turbidity at 500 nm in a spectrophotometer (Spectronic Genesys 2, Spectronic Instruments, Rochester, NY, U.S.A.). A conversion factor of 1.4 absorbance units/g of dry cell weight was obtained. Total protein was estimated by the Coomassie Blue method [38] and represented 20% of the dry cell weight. The cells were collected by centrifugation at 10000 ***g***, 4 °C and 15 min. The concentration of chondroitin sulphate (inducer) in the supernatant was measured by reaction with Dimethylmethylene Blue, as described previously [39]. The cell pellets were washed with Tris buffer (0.05 M Tris/acetate, pH 7.5) and resuspended in the same buffer at a concentration of 1 g/l. Cell suspensions were either immediately used for determination of enzymic activities or stored in polyethylene flasks or tubes, at -20 °C. They were always kept at 4 °C during handling.

Preparation of chondroitinase-containing cell extracts

For preparation of chondroitinase-rich bacterial extracts, 50 ml cultures were prepared as above described, cultured for 24 h and used to inoculate 1 litre of the same medium containing 150 mg of chondroitin sulphate. Only rapidly growing cultures were used as inocula. After 24 h under the same conditions, bacterial cells were collected by centrifugation, suspended in 5 ml of either Tris buffer or EDA buffer (0.05 M ethylenediamine-acetate buffer, pH 8.0), and disrupted by ultrasound (20 kHz output, pulse mode, 4 °C). Different periods of exposure to ultrasound were investigated. The cell debris was removed by centrifugation at 100000 ***g*** for 60 min, at 4 °C, and the supernatant thus obtained ('crude extract') was stored at -20 °C.

Chondroitinase fractionation by HIC

F. heparinum crude extracts were submitted to HIC on Phenyl-Sepharose HP, Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow (low substitution), Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow (high substitution) and Octyl-Sepharose 4 Fast Flow, to fractionate chondroitinases AC, B and C. $(NH_4)_2SO_4$ (1 M final concentration) was added to aliquots of crude extracts containing 2 mg of protein (0.5–1 ml). These samples were applied to the HIC columns (HiTrap HIC Test Kit; 0.4 cm $\times$ 2.0 cm; 1 ml bed volume) previously equilibrated with 1 M $(NH_4)_2SO_4$ in Tris buffer. The enzymes were eluted in a stepwise fashion by 1 ml solutions containing decreasing concentrations of $(NH_4)_2SO_4$ in the same buffer (1.0, 1.0, 0.88, 0.75, 0.62, 0.5, 0.38, 0.25 and 0.12 M), followed by 10 ml of $(NH_4)_2SO_4$-free buffer, at a flow rate of 0.5 ml/min. Fractions of 1 ml were collected and analysed for protein and chondroitinase activities.

For large-scale preparation, a 10 ml Phenyl-Sepharose HP column was prepared (1.4 cm $\times$ 6.5 cm) and eluted with (a) 1 M $(NH_4)_2SO_4$ in Tris buffer (40 ml), (b) a linear gradient of 1–0 M $(NH_4)_2SO_4$ in Tris buffer (80 ml) and (c) Tris buffer (40 ml). Fractions of 2 ml were collected at a flow rate of 1 ml/min. Alternatively, *F. heparinum* crude extract samples (19 mg of protein in 20 ml of EDA buffer) were first submitted to batch chromatography on Q-Sepharose (10 ml), for removal of contaminants that become attached to the ion exchanger. After stirring for 12 h at 4 °C, the slurry was packed in a column (1.5 cm $\times$ 6 cm) that was developed under the starting conditions (EDA buffer) for isocratic elution of chondroitinases, which were not attached to the exchanger under these conditions. The chondroitinase-containing fractions were pooled and sub-

© 2003 Portland Press Ltd

mitted to phenyl-Sepharose chromatography as described above.

Assay of enzymes

Three enzyme assays were used to measure chondroitinase activity.

Method 1: Dimethylmethylene Blue assay This assay was performed as described previously [40] except that mixtures (200 μl, final volume) were prepared containing 200 μg of substrate (usually chondroitin sulphate or dermatan sulphate) and aliquots of either crude extracts (1–5 μl) or purified enzymes (100 μl) in Tris buffer. Aliquots (10 μl) were collected at different times (0–120 min), diluted to 100 μl with water, and then 1 ml of Dimethylmethylene Blue reagent was added. The changes in absorbance were measured at either 525 or 630 nm, immediately after Dimethylmethylene Blue addition, and compared with a standard curve of 0–8 μg of chondroitin sulphate. The dye shows a metachromatic shift from blue to purple in the presence of sulphated glycosaminoglycans. When the glycosaminoglycans are depolymerized, the metachromatic effect disappears.

Alternatively, a micro-assay was used, as described previously [40]. This assay permits to estimate chondroitinase activities in both crude extracts and purified enzymes. One enzyme unit was defined as the amount that degrades 1 μmol of either chondroitin sulphate or dermatan sulphate/min.

Method 2: paper chromatography The column fractions were dialysed against Tris buffer to remove the $(NH_4)_2SO_4$. Aliquots of either dialysed column fraction (20 μl), cell suspensions or crude extracts (2–10 μl) were incubated with 50 μg of chondroitin sulphate or dermatan sulphate. After incubation at 37 °C (for chondroitin sulphate) or 20 °C (for dermatan sulphate), the mixtures were inactivated by heat and submitted to paper chromatography, as described previously [26]. This method permits the identification of degradation products formed.

Method 3: absorbance at 232 nm The activities of purified enzymes were also measured by the increase in absorbance at 232 nm as a function of time, as described previously [41], except that the incubations were carried out in Tris buffer, with 100 μg of substrate.

Electrophoresis

SDS/PAGE was performed on the three chondroitinases using a modification of the procedure described by Laemmli [42]. Aliquots of chondroitinases purified by ion exchange and HIC on Phenyl-Sepharose HP were freeze-dried and resuspended in 20 μl of sample buffer (0.04 M Tris/acetate, 2% SDS, 10% glycerol, 0.25% Bromophenol Blue and 5% mercaptoethanol, pH 8.3). These samples were incubated at 98 °C for 5 min and submitted to electrophoresis on 7% polyacrylamide gel in 0.04 M Tris/glycine buffer, pH 8.3, containing 1% SDS. After the run, the gel was immediately stained either with 0.2% Coomassie Blue R-250 in 50% methanol/7% acetic acid and destained in 50% methanol/7% acetic acid or with the silver nitrate reaction [43]. Agarose-gel electrophoresis of glycosaminoglycans was performed as described previously [44].

Results

Chondroitinase assay and production in complex and defined media

For determination of chondroitinase activities, *F. heparinum*-induced cell suspensions, obtained as described in the Materials and methods, were incubated with chondroitin sulphate or dermatan sulphate, and the kinetics of substrate

Table 1 Chondroitinase activities in crude extract measured by two different methods

The chondroitinase activities were assayed by two methods: Dimethylmethylene Blue assay (DMB, A_{630}) and absorbance at 232 nm. One unit was defined as the amount of enzyme that catalyses the disappearance of 1 μmol of substrate/min (DMB) or the formation of 1 μmol of product/min (A_{232}). For A_{232}, enzyme activities were calculated using a molar absorption coefficient of 3800 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ for unsaturated oligosaccharides formed by chondroitinase digestion.

Substrate	Activity (activity units) DMB (A_{630})	A_{232}
Chondroitin 4-sulphate	17.2	13.9
Chondroitin 6-sulphate	26.1	16.8
Dermatan sulphate	12.5	12.0

Table 2 Chondroitinase inducers

	Induction (%)	
Compound tested (150 mg/l)	Chondroitin sulphate-degrading enzymes	Dermatan sulphate-degrading enzymes
Chondroitin 4-sulphate	100	100
Chondroitin 6-sulphate	238	142
Dermatan sulphate	114	97
Hyaluronic acid	20	83
Chondroitin 4-sulphate degradation products		
Oligosaccharides	86	73
Hexasaccharide	55	57
Tetrasaccharide	59	24
Unsaturated 6-sulphated disaccharide	25	0
Control	0	0
Heparin, sodium salt	7	2
Heparan sulphate	5	3

© 2003 Portland Press Ltd

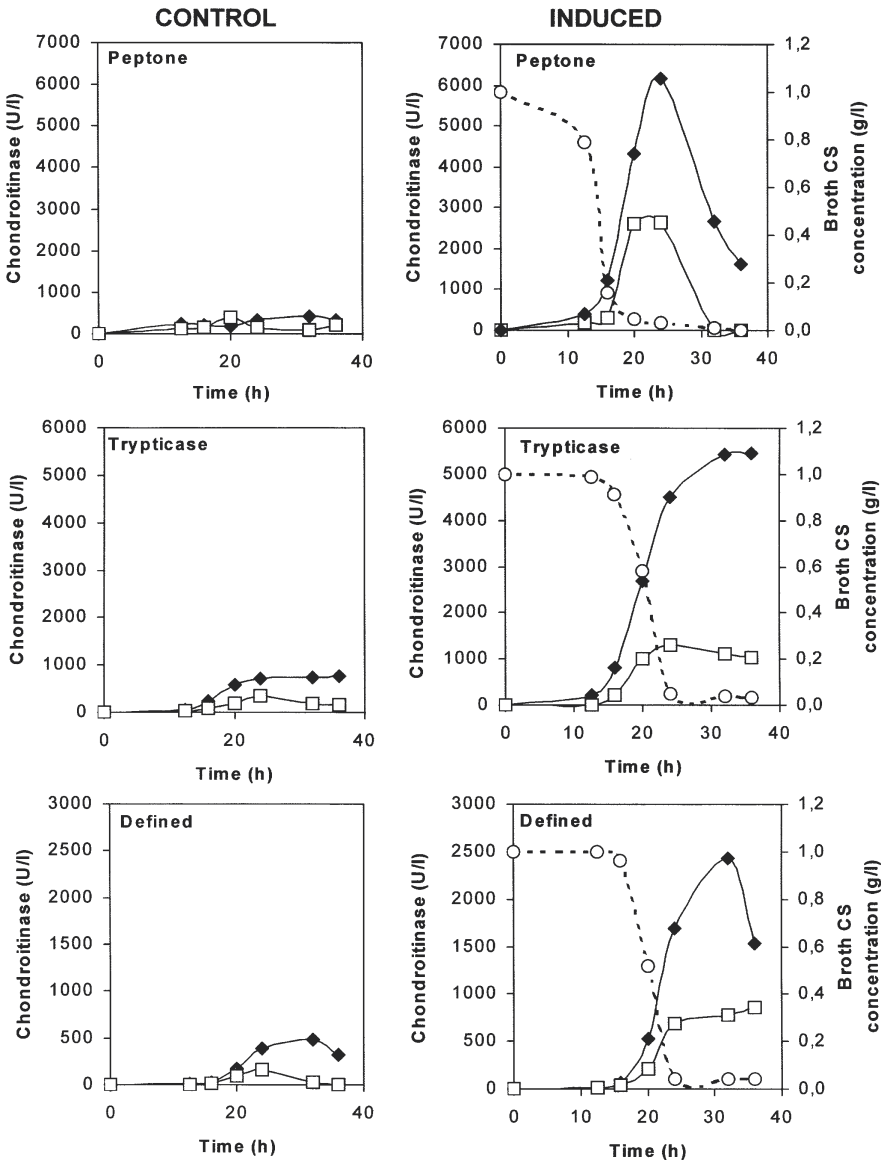


Figure 1 Chondroitinase production in two complex media (peptone and trypticase) and one defined medium with (Induced) or without (Control) chondroitin sulphate as an inducer

The experiment was performed as described in the text. The cells were collected by centrifugation and chondroitin sulphate (CS) concentration was measured in the supernatant of inducer-containing media (○; shown on the right-hand axis). The cell pellet was washed and resuspended in Tris buffer at 1 mg/ml (dry weight). The enzyme activities were estimated by Dimethylmethylene Blue assay. Total activities of enzymes that degrade chondroitin sulphate (◆) and dermatan sulphate (□) are shown as a function of time.

degradation was followed with the Dimethylmethylene Blue assay. The depolymerization of chondroitin 6-sulphate proceeded at a higher rate, when compared with chondroitin 4-sulphate or dermatan sulphate, possibly due to the presence of two chondroitinases, AC and C, which digest this polymer. The degradation of dermatan sulphate was also catalysed by two chondroitinases: chondroitinase B, which digests the iduronic acid-containing regions of the molecule, and chondroitinase AC, which degrades the glucuronic acid-containing regions. Bacterial chondroitinase activities were also measured by the increase in A_{232} due to the formation of unsaturated products. Nevertheless, crude extracts also contain glycuronidases that cleave the unsaturated disaccharides formed. Table 1 shows that A_{232} underestimates the chondroitinase concentration in crude extracts. Higher values were obtained for the Dimethylmethylene Blue assay.

The growth kinetics of *F. heparinum* fermentation and chondroitinase production were investigated in two com-

© 2003 Portland Press Ltd

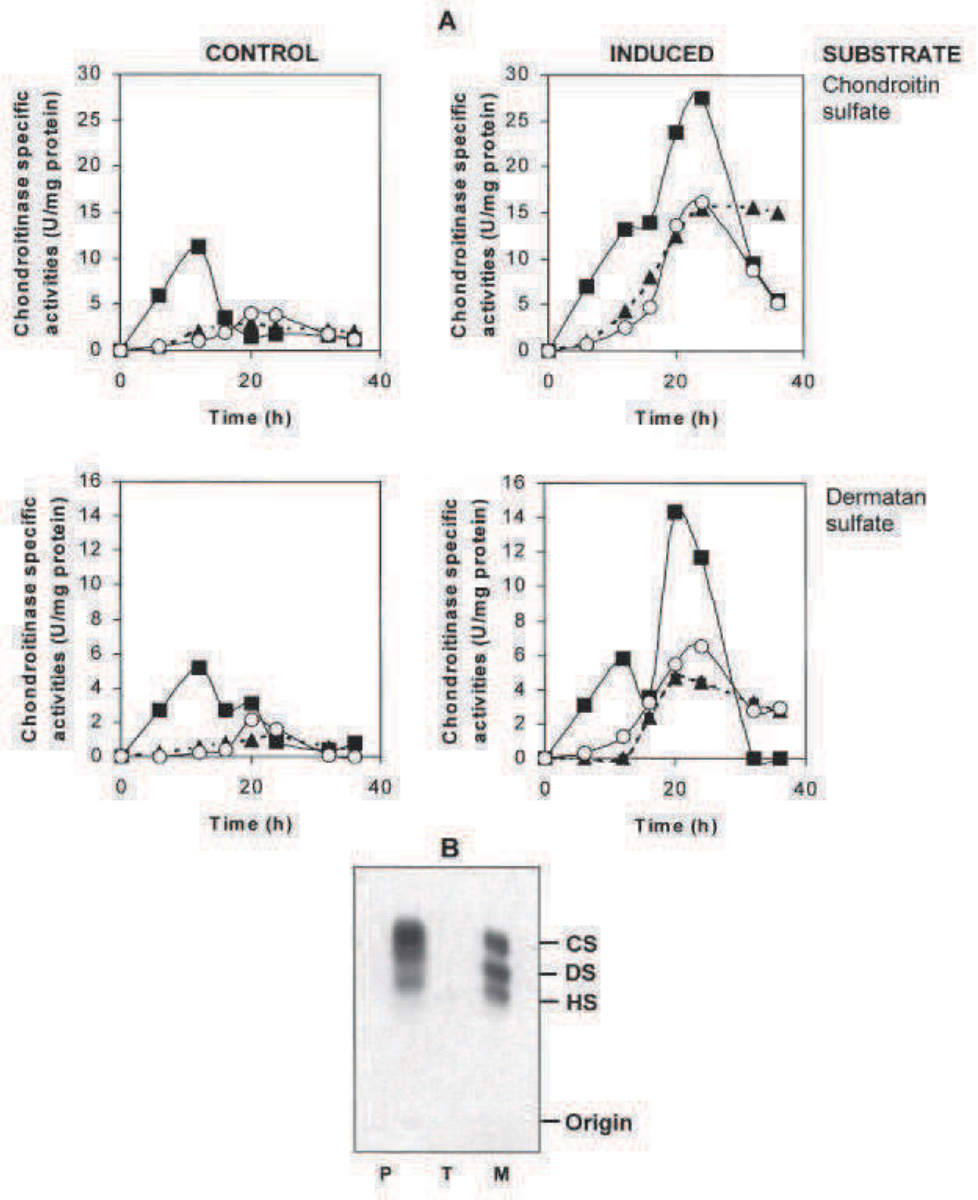


Figure 2 (A) Chondroitinase-specific activities in two complex media (■, peptone; ▲, trypticase) and one defined medium (○) with (Induced) or without (Control) chondroitin sulphate as inducer and (B) agarose-gel electrophoresis of glycosaminoglycans present in commercial preparations of peptone (P) and trypticase (T)

The experiment was performed as described in Figure 1, except that chondroitinase specific activities were measured. Protein was measured by Coomassie Blue method [38] and chondroitinase activities upon chondroitin sulphate (CS) and dermatan sulphate (DS) were estimated by the Dimethylmethylene Blue assay. To investigate if the commercial preparation of peptone contains glycosaminoglycans that could function as inducers, 1 g of peptone was dissolved in 10 ml of distilled water and, when the solutions were completely clear, 2 vol. of ethanol were added. After standing overnight at −20 °C, the precipitate formed was collected by centrifugation, vacuum dried, resuspended in 100 μl of water and a 5 μl aliquot was submitted to agarose-gel electrophoresis as described previously [44] and stained by Toluidine Blue (P). A sample of trypticase (T) was equally processed. M, mixture of standard glycosaminoglycans.

plex media, peptone and trypticase, and in one defined medium. Figure 1 shows the time course of chondroitinase production during bacterial growth in culture broth with or without chondroitin sulphate as an inducer. The final cell concentration was higher in trypticase than in peptone or defined medium. The presence of chondroitin sulphate as an inducer did not significantly affect the bacterial growth kinetics in any of the culture media. Low enzyme activities were expressed in control cells during the whole growth period, in contrast to bacteria cultured in the presence

© 2003 Portland Press Ltd

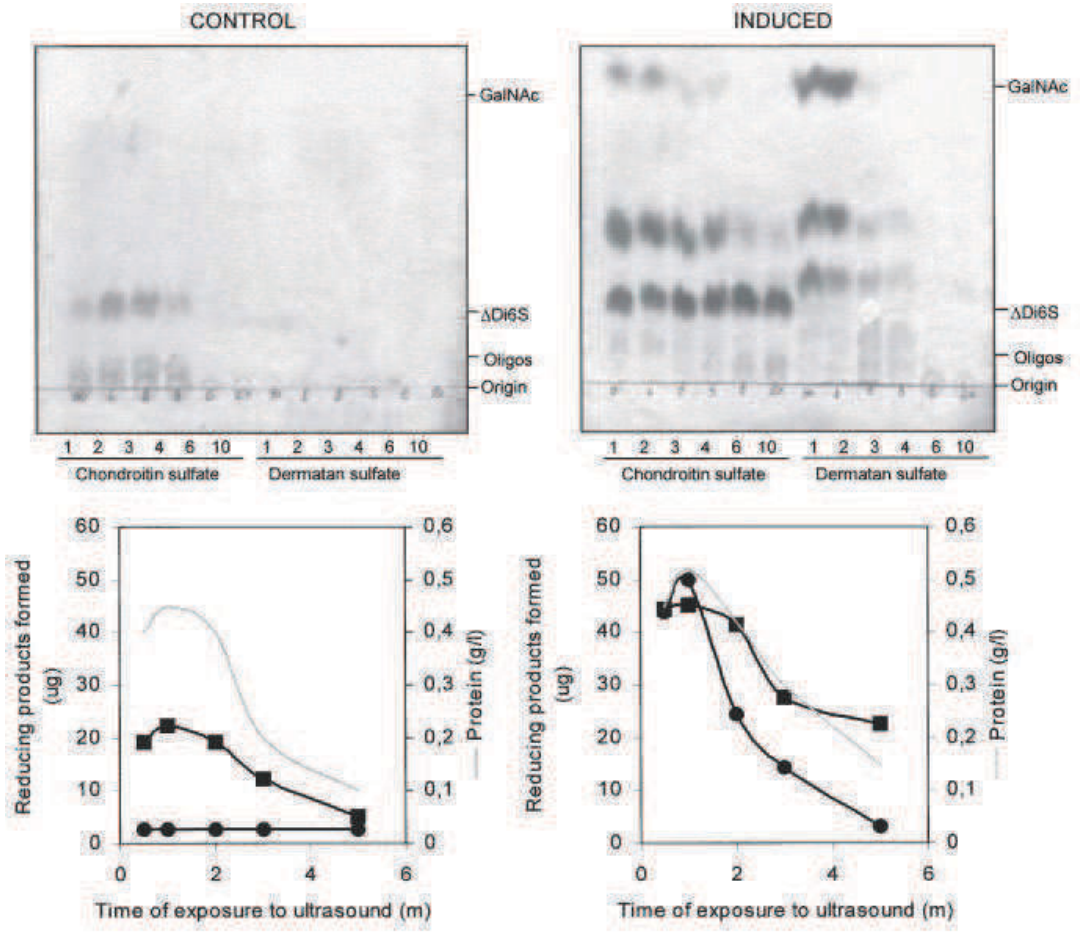


Figure 3 Effect of ultrasound on chondroitinase and total protein solubilization

F. heparinum was cultured in trypticase in preparative scale, with or without chondroitin sulphate (150 mg/l) as an inducer. The cells were collected by centrifugation and suspended in 10 ml of Tris buffer. This cell suspension was exposed to an ultrasound cell disruptor (20 kHz, pulse mode, 30 s pulses) for the time periods (in min) indicated below the paper chromatograms and on the graphs. The cell debris were removed by centrifugation (100000 ***g***, 1 h, 4 °C) and the supernatant was assayed for chondroitin sulphate- and dermatan sulphate-degrading enzymes (paper chromatography). The reducing products formed were quantified by densitometry. ■, Products formed from chondroitin sulphate; ●, Products formed from dermatan sulphate. ΔDi6S, unsaturated 6-sulphated disaccharide; Oligos, oligosaccharides.

of chondroitin sulphate as an inducer, which have shown high chondroitinase activities peaking around 24 h. The maximum enzyme activities concurred with the maximum chondroitin sulphate degradation rates. Nevertheless, in trypticase, the enzyme activities were kept high for at least 16 h after chondroitin sulphate depletion. Although the maximum activities achieved in trypticase and defined medium were lower than those obtained in peptone, the deactivation of chondroitinases in stationary phase was also slower, especially for trypticase. On the other hand, an earlier peak of high specific activity chondroitinases occurred in peptone around 10–12 h, both in control and induced *F. heparinum* cultures (Figure 2). These activities declined afterwards and, in the presence of inducer, a second peak appeared immediately before the stationary phase. Nevertheless, a few hours later, the dermatan sulphate-degrading activities dropped to zero and a loss in chondroitin sulphate-degrading enzymes also occurred. Figure 2(B) shows that the commercial preparation of peptone used here contains small amounts of glycosaminoglycans (chondroitin sulphate, 300 μg/g; heparan sulphate, 100 μg/g), which possibly account for this chondroitinase induction.

Effect of inducer concentration and alternate inducers for chondroitinases

The effect of inducer concentration upon chondroitinase expression was also investigated. Maximum induction occurred with chondroitin sulphate concentrations of 0.2–1.0 g/l in all culture media.

© 2003 Portland Press Ltd

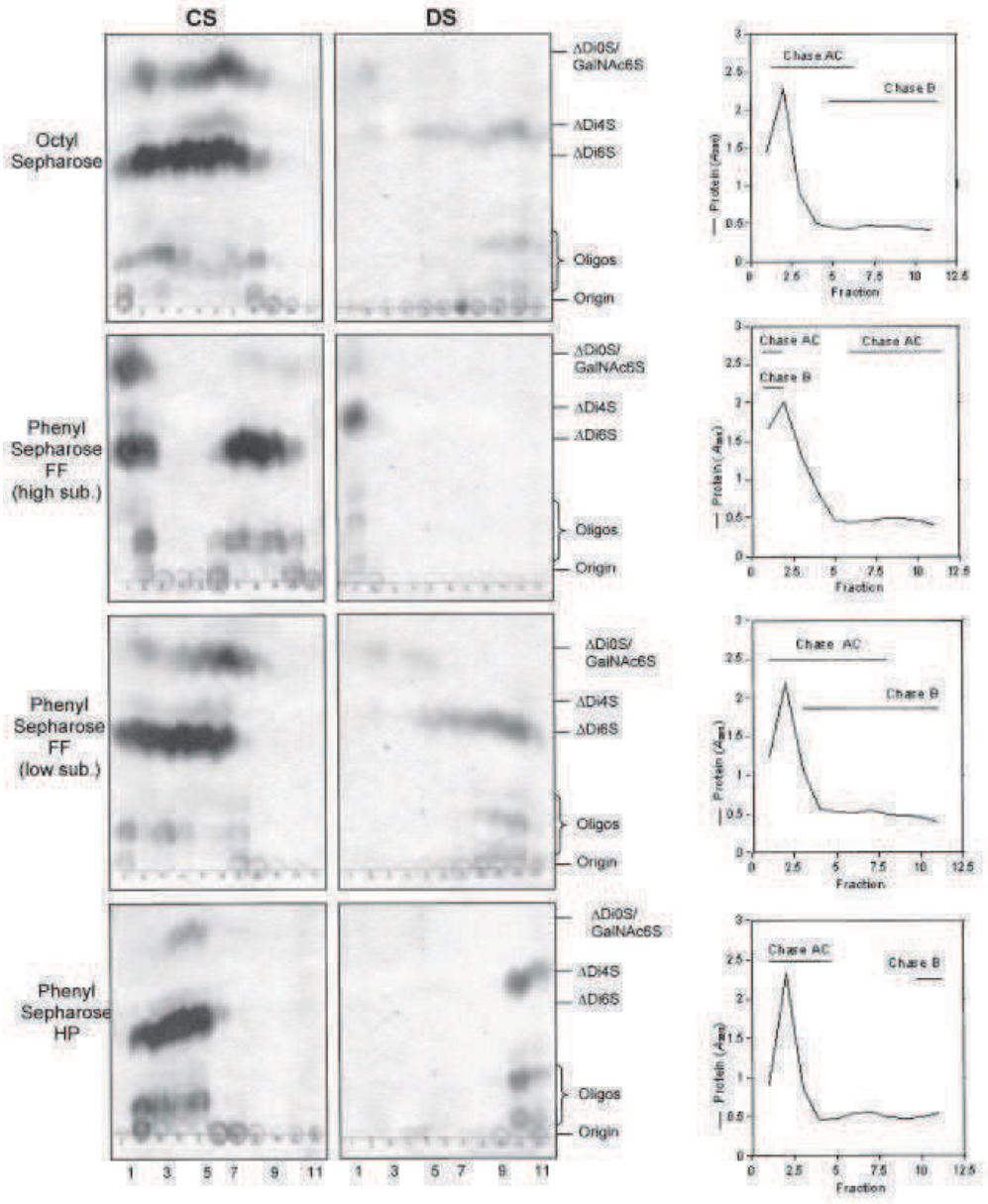


Figure 4 Fractionation of *F. heparinum* chondroitinases by HIC

Aliquots of induced *F. heparinum* extracts were applied to 0.4 cm × 2 cm columns of Octyl-Sepharose 4 Fast Flow, Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow (high substitution), Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow (low substitution) and Phenyl-Sepharose HP, previously equilibrated with 1 M $(NH_4)_2SO_4$ and Tris buffer. The columns were developed as described in the text. 1 ml fractions were collected and analysed for protein and chondroitinase activities. Total protein (indicated by curves) was estimated by the Coomassie Blue method [38] and the chondroitinase activities were measured by the paper chromatography method; chondroitinases (Chase) were eluted from the columns in the positions indicated by the horizontal lines. ΔDi0S, unsaturated non-sulphated disaccharide; ΔDi4S, unsaturated 4-sulphated disaccharide; ΔDi6S, unsaturated 6-sulphated disaccharide; GalNAc6S, *N*-acetylgalactosamine 6-sulphate; Oligos, oligosaccharides.

Other compounds were tested for chondroitinase induction and compared with chondroitin 4-sulphate at a sub-optimum concentration. Table 2 shows the results obtained. Chondroitin 6-sulphate was the best inducer for both chondroitin sulphate- and dermatan sulphate-degrading enzymes. Chondroitin 4-sulphate and dermatan sulphate were equally effective as inducers, and hyaluronic acid was a good inducer for dermatan sulphate-degrading enzymes, but a poor inducer for chondroitin sulphate-degrading enzymes. The enzymically produced chondroitin 4-sulphate degradation products, oligosaccharide, hexasaccharide and tetrasaccharide, were also inducers. Unsaturated 6-sulphated

© 2003 Portland Press Ltd

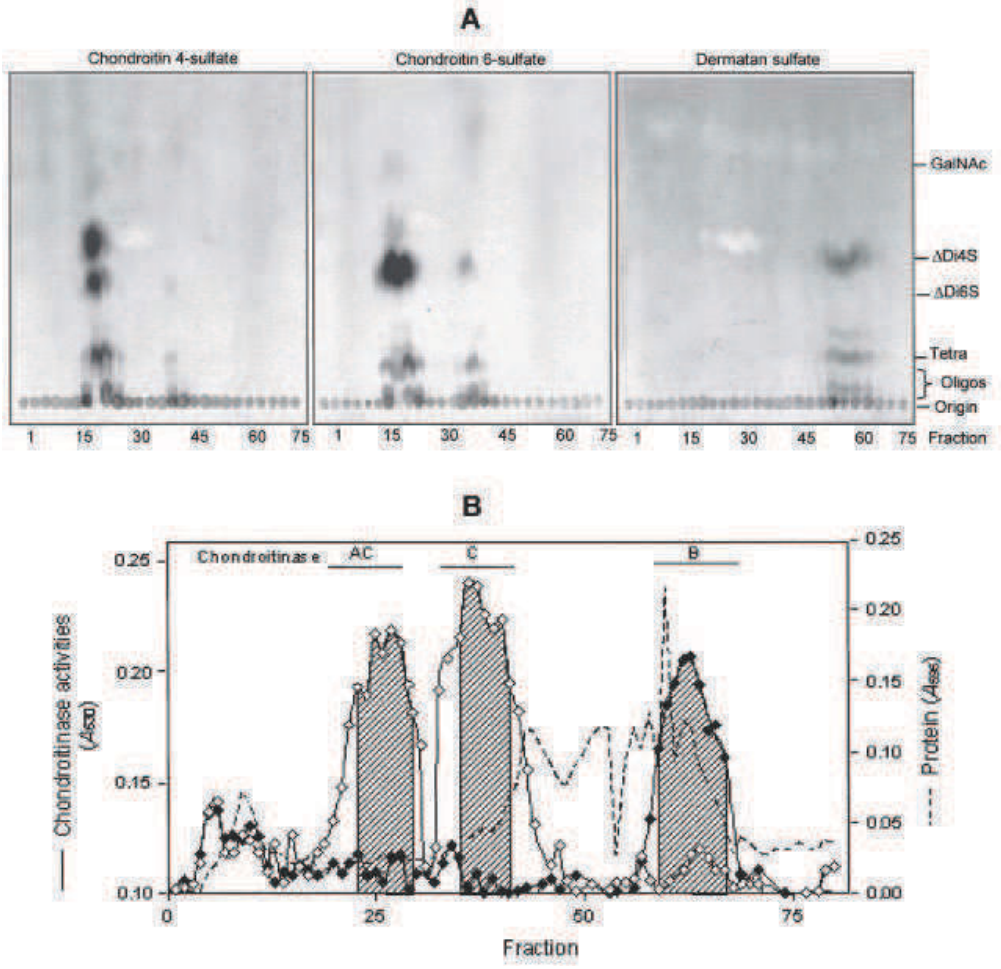


Figure 5 Large-scale preparation of *F. heparinum* chondroitinases by Phenyl-Sepharose HP chromatography

F. heparinum extract containing 20 mg of protein, 1 M $(NH_4)_2SO_4$ and Tris buffer was applied to a Phenyl-Sepharose HP column developed as described in the text. 2 ml fractions were collected at a flow rate of 1 ml/min. The chondroitinase activities were measured by two methods. (**A**) Paper chromatography: one out of every three fractions were dialysed against Tris buffer to remove the $(NH_4)_2SO_4$ and assayed as described in Figure 3. ΔDi4S, unsaturated 4-sulphated disaccharide; ΔDi6S, unsaturated 6-sulphated disaccharide; Tetra, tetrasaccharides; Oligos, oligosaccharides. (**B**) Dimethylmethylene Blue: 10 μl of each fraction were incubated with 3 μg of either chondroitin 6-sulphate (◇) or dermatan sulphate (◆) in 96-well plates. After 4 h incubation at room temperature, 100 μl of Dimethylmethylene Blue reagent [39] were added and the absorbance was measured at 630 nm. Total protein was estimated by the Coomassie Blue method [38] (dotted lines; A_{595}). The cross-hatching indicates the fractions that were pooled.

disaccharide induced to a lesser degree. Heparin and heparan sulphate did not induce chondroitinases.

Preparation of bacterial extracts

For preparation of chondroitinase-containing bacterial extracts, induced *F. heparinum* cells grown in trypticase were collected by centrifugation, resuspended in 5 ml of Tris buffer and disrupted by sonication (20 mHz, pulse mode, 30 s pulses). Debris was removed by ultracentrifugation as described in the Materials and methods and chondroitinase activities were measured in the supernatant ('crude extract'). Figure 3 shows the effect of time of ultrasound exposure upon solubilization of proteins and chondroitinase activities. The concentration of both total proteins and chondroitinases increased up to 2 min, but decreased afterwards. Dermatan sulphate-degrading enzymes were especially sensitive. Similar results were obtained for cells grown in either peptone or defined medium.

Chondroitinase fractionation by HIC

Bacterial extracts obtained from induced cells grown in trypticase and disrupted by 2 min exposure to ultrasound were submitted to HIC on Octyl-Sepharose and three different Phenyl-Sepharoses, as described in the Materials and methods. The fractions were analysed for protein and

© 2003 Portland Press Ltd

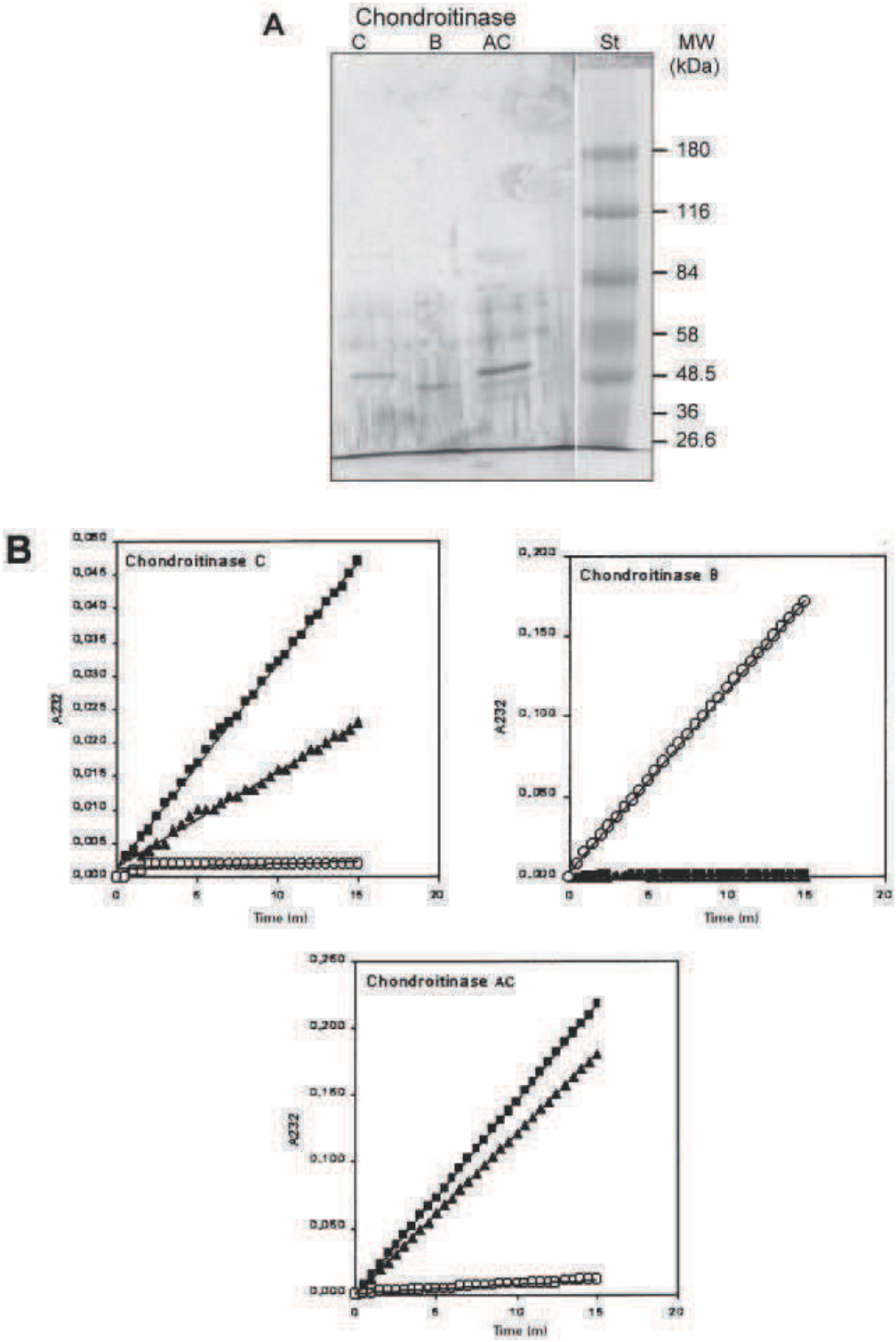


Figure 6 SDS/PAGE and specificities of chondroitinase AC, C and B preparations

(**A**) Aliquots (1 ml) of each enzyme preparation were freeze dried, resuspended in 20 μl of sample buffer and submitted to PAGE as described in the text. St, prestained molecular-mass markers. (**B**) Degradation of chondroitin 4-sulphate (▲), chondroitin 6-sulphate (■) and dermatan sulphate (○) by chondroitinases AC, C and B. The enzyme activities were measured by Method 3 (A_{232}) as described in the text.

© 2003 Portland Press Ltd

Table 3 Purification of chondroitinases

Enzyme activities were calculated using a molar absorption coefficient of 3800 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ for unsaturated oligosaccharides formed by chondroitinase digestion. Specific activities were determined by measuring the protein concentration with the Coomassie Blue method [38]. Activity units are defined in Table 1. Ch4S, chondroitin 4-sulphate; Ch6S, chondroitin 6-sulphate; DS, dermatan sulphate.

			Activity (units; A_{232})			Specific activity (units/mg; A_{232})			Recovery (%; A_{232})		
Purification step	Protein (mg)	Substrate …	Ch4S	Ch6S	DS	Ch4S	Ch6S	DS	Ch4S	Ch6S	DS
Cell extract	38.96		13.86	16.84	12.00	0.36	0.67	0.30	100	100	100
Q-Sepharose	10.20		12.20	15.31	11.20	1.20	1.50	1.10	88	91	93
Phenyl-Sepharose											
Chondroitinase AC	0.28		10.80	14.02	0.88	38.57	50.07	3.14	78	83	7
Chondroitinase B	0.35		0.00	0.00	13.52	0.00	0.00	38.62	0	0	112
Chondroitinase C	0.23		1.26	3.60	0.00	5.48	15.65	0.00	9	21	0

chondroitinase activities. Figure 4 shows the elution patterns thus obtained. The figure shows the chondroitinase activities assayed by Method 2 (paper chromatography) that permits the identification of the degradation products formed. Chondroitin sulphate- and dermatan sulphate-degrading enzymes were eluted in different positions depending on the hydrophobic-interaction media, but in Phenyl-Sepharose HP these enzymes were completely separated from each other and also from sulphatases and glycuronidases.

The fractionation on Phenyl-Sepharose HP was scaled up to a column of 10 ml bed volume, eluted with a linear gradient of $(NH_4)_2SO_4$. Under these conditions, chondroitinase C was also separated from chondroitinases AC and B, as well as from glycuronidases and sulphatases (Figure 5). The fractions containing each enzyme were pooled and further characterized.

When aliquots (20–200 μl) of these enzymes were submitted to PAGE and stained by Coomassie Blue, nothing appeared. A few protein bands were stained only by the silver nitrate reaction, indicating that the enzyme preparations contain trace amounts of proteins (approx. 1 ng/band). To further purify these enzymes, *F. heparinum* crude extracts were submitted to ion-exchange batch chromatography on Q-Sepharose, prior to the Phenyl-Sepharose chromatography. The chondroitinases did not attach to the exchanger, but contaminant proteins were removed (Figure 6). Upon Phenyl-Sepharose chromatography, the chondroitinase elution pattern was the same, but with higher yields (Table 3).

Discussion

The use of Dimethylmethylene Blue assay, which is a simple, fast and reproducible technique, was very important to the success of this work. Many authors working on chondroitin sulphate, dermatan sulphate, heparin and heparan sulphate lyases measure the enzyme activities by procedures based either on the increase in A_{232} [45,46] or on the quantification of unsaturated products by HPLC [47]. Nevertheless, the disaccharides formed by chondroitinases are further degraded by glycuronidases and sulphatases, also present in induced cells. So it is not surprising that A_{232} underestimates chondroitinases in crude preparations, especially those producing unsaturated 6-sulphated disaccharide.

The glycosaminoglycans cause metachromasia, a shift in the absorption maxima of Dimethylmethylene Blue from $\lambda = 525$ to $\lambda = 630$. Since chondroitinases cleave β-1,4 linkages in chondroitin sulphate and/or dermatan sulphate, its action causes chain shortening that results in lessened metachromasia. Moreover, Dimethylmethylene Blue was also used to estimate the concentration of chondroitin sulphate (inducer) in the fermentation broth since no interference of salts or nutrients occurred.

Functionally purified chondroitinases AC, B and C, free of sulphatases, glycuronidases, heparinase and heparitinases, were prepared in high yields by HIC of cell extracts obtained from *F. heparinum* cultured in the presence of chondroitin sulphate as an inducer. High productivity was obtained in two complex media (peptone and trypticase) and in glucose defined medium containing chondroitin sulphate as an inducer, but a rapid deactivation of chondroitinase occurred in peptone, at the onset of the stationary phase. This finding explains the variability in chondroitinase concentration previously observed in extracts obtained from cells cultured in peptone. In trypticase and in defined medium, on the contrary, high activities were maintained up to 36 h. The maximum enzyme activities concurred with the chondroitin sulphate depletion in the broth, but the enzyme activities were kept high for a further 16 h, suggesting that degradation products could also function as inducers.

In order to investigate this point, different concentrations of chondroitin sulphate and alternative inducers were examined. Maximum induction occurred at chondroitin sulphate concentrations of 200 mg/l or higher, irrespective of the medium composition. At sub-optimal concentration (150 mg/l), chondroitin 6-sulphate (shark cartilage) was the best inducer, followed by chondroitin

© 2003 Portland Press Ltd

4-sulphate (whale cartilage), dermatan sulphate and hyaluronic acid. The chondroitin 4-sulphate degradation products (oligosaccharide, hexasaccharide and tetrasaccharide) were also inducers. Unsaturated 6-sulphated disaccharide induced to a lesser degree, possibly due to its rapid degradation by bacterial glycuronidases. Nevertheless, as we have previously demonstrated, heparin and heparan sulphate does not induce chondroitinases [31].

The first purification step is the solubilization of chondroitinases from cells by sonification. Maximum activities were obtained in extracts when the cells were treated by 2 min at 100 W using pulse mode. As the time was increased, inactivation of the solubilized enzymes occurred. Total cell disruption was not necessary for enzyme release, suggesting a periplasmic localization for *F. heparinum* chondroitinases. This finding agrees with recently reported data on expression of genes coding for *F. heparinum* chondroitinases AC and B, where signal sequences were observed in the coding regions of both enzymes [48], consistent with their translocation to the periplasmic space. It is possible that also chondroitinase C contains a signal sequence, at least in its precursor form.

The chromatographic procedure described here based on HIC on Phenyl-Sepharose HP eluted with decreasing concentrations of $(NH_4)_2SO_4$ is suitable for both analysis and preparation of *F. heparinum* chondroitinases AC, B and C. The chondroitinases were not inhibited by $(NH_4)_2SO_4$ and the fractions eluted from the columns could be rapidly assayed by the Dimethylmethylene Blue method. For identification of the products formed by paper chromatography, the $(NH_4)_2SO_4$ had to be removed previously by dialyses from the enzyme-containing samples.

Procedures for purification of chondroitinase B and chondroitinase AC have appeared [33] and these enzymes have already been crystallized [49–51]. Nevertheless, different methods are necessary for the purification of these two chondroitinases. These procedures are complex, time consuming and give low yields. Furthermore, the activity of chondroitinase C was lost. Although recombinant chondroitinases AC and B have already been obtained in *Escherichia coli* at high yields and degrees of purification [52], the producing clones are not readily available, and the cloning procedures require expensive material and equipment. In contrast, the methodology proposed here is very simple and based on standard techniques that can be easily reproduced, leading to the preparation of all three chondroitinases, AC, B and C, in a single reproducible procedure, with high yields.

The introduction of a very fast and easy purification step, before HIC, permitted the purification of chondroitinases to homogeneity. These enzyme preparations did not contain glycuronidases, sulphatases, heparinases, heparitinase or other chondroitinases, and are ready to be used in the identification of glycosaminoglycans.

© 2003 Portland Press Ltd

Acknowledgments

We are grateful to Dr C. P. Dietrich for critically reading this manuscript. This work was aided by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) and Sociedade Paulista para o Desenvolvimento da Medicina (SPDM).

References

1 Scott, J. E. and Orford, C. R. (1981) Biochem. J. **197**, 213–316
2 Iozzo, R. V. (1998) Annu. Rev. Biochem. **67**, 609–653
3 Merle, B., Durussel, L., Delmas, P. D. and Clezardin, P. (1999) J. Cell Biochem. **75**, 538–546
4 Michelacci, Y. M. and Dietrich, C. P. (1986) Int. J. Biol. Macromol. **8**, 108–113
5 Nader, H. B., Dietrich, C. P., Buonassisi, V. and Colburn, P. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **84**, 3565–3569
6 Dietrich, C. P., Tersariol, I. L., Toma, L., Moraes, C. T., Porcionatto, M. A., Oliveira, F. W. and Nader, H. B. (1998) Cell. Mol. Biol. **44**, 417–429
7 Nader, H. B., Ferreira, T. M., Toma, L., Chavante, S. F., Dietrich, C. P., Casu, B. and Torri, G. (1988) Carbohydr. Res. **184**, 292–300
8 Porcionatto, M. A., Nader, H. B. and Dietrich, C. P. (1999) Braz. J. Med. Biol. Res. **32**, 539–544
9 Liu, D., Shriver, Z., Venkataraman, G., El Shabrawi, Y. and Sasisekharan, R. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **99**, 568–573
10 Toma, L., Dietrich, C. P. and Nader, H. B. (1996) Lab. Invest. **75**, 771–781
11 Dietrich, C. P., Martins, J. R., Sampaio, L. O. and Nader, H. B. (1993) Lab. Invest. **68**, 439–445
12 Viklund, L., Loo, B. M., Hermonen, J., El-Darwish, K., Jalkanen, M. and Salmivirta, M. (2002) Biochem. Biophys. Res. Commun. **290**, 146–152
13 Michelacci, Y. M., Mourão, P. A. S., Laredo, J. and Dietrich, C. P. (1979) Connect. Tiss. Res. **7**, 29–36
14 Gutierrez, P. S., de Almeida, I. C., Nader, H. B., Higuchi, M. L., Stolf, N. and Dietrich, C. P. (1991) Cardiovasc. Res. **25**, 742–748
15 Suzuki, S., Saito, H., Yamagata, T., Anno, K., Seno, N., Kawai, Y. and Furuhashi, T. (1968) J. Biol. Chem. **243**, 1543–1550
16 Cadaval, R. A. M., Kohlman, O. and Michelacci, Y. M. (2000) Glycobiology **10**, 185–192
17 Soriano, E. S., Campos, M. Q. and Michelacci, Y. M. (2000) Clin. Chim. Acta **295**, 41–62
18 Michelacci, Y. M., Cadaval, R. A. M., Rovigatti, R. M. and Kohlman, O. (2001) Exp. Nephrol. **9**, 40–48

19 Denholm, E. M., Lin, Y.-Q. and Silver, P. J. (2001) Eur. J. Pharmacol. **416**, 213–221
20 Denholm, E. M., Cauchon, E., Poulin, C. and Silver, P. J. (2000) Eur. J. Pharmacol. **400**, 154–153
21 Korn, E. D. and Payza, A. N. (1956) Nature (London) **177**, 88–89
22 Dietrich, C. P., Silva, M. E. and Michelacci, Y. M. (1973) J. Biol. Chem. **248**, 6408–6415
23 Nader, H. B., Porcionatto, M. A., Tersariol, I. L. S., Pinhal, M. A. S., Oliveira, F. W., Moraes, C. T. and Dietrich, C. P. (1990) J. Biol. Chem. **265**, 16807–16813
24 Nader, H. B., Kobayashi, E. Y., Chavante, S. F., Tersariol, I. L. S., Castro, R. A., Shinjo, S. K., Naggi, A., Torri, G., Casu, B. and Dietrich, C. P. (1999) Glycoconj. J. **16**, 265–270
25 Hoffman, P., Linker, A., Lippman, V. and Meyer, K. (1960) J. Biol. Chem. **235**, 3066–3069
26 Michelacci, Y. M. and Dietrich, C. P. (1975) Biochem. J. **151**, 121–129
27 Michelacci, Y. M. and Dietrich, C. P. (1976) J. Biol. Chem. **251**, 1154–1158
28 Michelacci, Y. M., Horton, D. S. P. Q. and Población, C. A. (1987) Biochim. Biophys. Acta **923**, 291–301
29 Yamagata, T., Saito, H., Habuchi, O. and Suzuki, S. (1968) J. Biol. Chem. **243**, 1523–1535
30 Michelacci, Y. M. and Dietrich, C. P. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. **56**, 973–980
31 Michelacci, Y. M. and Dietrich, C. P. (1973) Biochimie **55**, 893–898
32 Michelacci, Y. M., Laredo, J. and Dietrich, C. P. (1981) Braz. J. Med. Biol. Res. **14**, 161–172
33 Gu, K., Linhardt, R. J., Laliberté, M., Gu, K. and Zimmermann, J. (1995) Biochem. J. **312**, 569–577
34 Ototani, N. and Yosizawa, Z. (1979) Carbohydr. Res. **70**, 295–306
35 Cifonelli, J. A. and Dorfman, A. (1960) J. Biol. Chem. **235**, 3283–3291
36 Dietrich, C. P. and Nader, H. B. (1974) Biochim. Biophys. Acta. **343**, 34–44
37 Galliher, P. M., Cooney, C. L., Langer, R. and Linhardt, R. J. (1981) Appl. Environ. Microbiol. **41**, 360–365
38 Bradford, M. M. (1976) Anal. Biochem. **72**, 248–254
39 Farndale, R. W., Buttle, D. J. and Barrett, A. J. (1986) Biochim. Biophys. Acta **883**, 173–177
40 Aguiar, J. A. K. and Michelacci, Y. M. (1999) Braz. J. Med. Biol. Res. **32**, 545–550
41 Lohse, D. L. and Linhardt, R. J. (1992) J. Biol. Chem. **267**, 24347–24355
42 Laemmli, U. K. (1970) Nature (London) **227**, 680–685
43 Ansorge, W. (1985) J. Biochem. Biophys. Methods **11**, 13–20
44 Dietrich, C. P., McDuffie, N. and Sampaio, L. O. (1977) J. Chromatogr. **130**, 299–304
45 Linker, A. and Hovingh, P. (1972) Methods Enzymol. **28**, 902–911
46 Akio, H., Nobukazu, H., Hideo, M., Fumikazu, K., Yoshitaka, M., Katsuyuki, H. and Sakaru, S. (1997) J. Biol. Chem. **272**, 9123–9130
47 Volpi, N. (2000) Anal. Biochem. **277**, 19–24
48 Tkalec, A. L., Fink, D., Blain, F., Zhang-Sun, G., Laliberte, M., Bennett, D. C., Gu, K., Zimmermann, J. J. and Su, H. (2000) Appl. Environ. Microbiol. **66**, 29–35
49 Féthière, J., Shilton, B. H., Li, Y., Allaire, M., Laliberte, M., Eggimann, B. and Cygler, M. (1998) Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. **D54**, 279–280
50 Féthière, J., Eggimann, B. and Cygler, M. (1999) J. Mol. Biol. **288**, 635–647
51 Huang, W., Matte, A., Li, Y., Kim, Y. S., Linhardt, R. J. and Cygler, M. (1999) J. Mol. Biol. **294**, 1257–1269
52 Pojasek, K., Shriver, Z., Kiley, P., Venkataraman, G. and Sasisekharan, R. (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. **286**, 343–351

Received 7 October 2002; accepted 16 October 2002

© 2003 Portland Press Ltd

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT
Biochimica et Biophysica Acta 1741 (2005) 30–41
BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA
BBA
http://www.elsevier.com/locate/bba

Reduced urinary excretion of sulfated polysaccharides in diabetic rats

Cilene R. de Lima, Jair A.K. Aguiar, Yara M. Michelacci*

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP-EPM, Rua Três de Maio, 100, São Paulo, SP, 04044-020, Brazil

Received 23 July 2004; received in revised form 24 September 2004; accepted 5 October 2004
Available online 19 October 2004

Abstract

The aim of the present study was to further understand the changes in renal filtration that occur in the early stages of diabetes mellitus. Diabetes was induced in male Wistar rats by a single injection of streptozotocin. Glycemia, body weight, 24-h urine volume and urinary excretion of creatinine, protein and glycosaminoglycans were measured 10 and 30 days after diabetes induction. All the diabetic animals used in the present study were hyperglycemic, did not gain weight, and presented proteinuria and creatinine hyperfiltration. In contrast, the glycosaminoglycan excretion decreased. Dextran sulfates of different molecular weights (6.0 to 11.5 kDa) were administered to the diabetic rats, and to age-matched, sham-treated controls. Most of the dextran sulfate was excreted during the first 24 h, and the amounts excreted in the urine were inversely proportional to the dextran sulfate molecular weight for all groups. Nevertheless, diabetic rats excreted less and accumulated more dextran sulfate in kidney and liver, as compared to controls. These differences, which were observed only for the dextran sulfates of higher molecular weights (>7 kDa), increased with the duration of diabetes. Our findings suggest differential renal processing mechanisms for proteins and sulfated polysaccharides, with the possible involvement of kidney cells.
© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Diabetes mellitus; Renal filtration; Dextran sulfate; Glycosaminoglycan

1. Introduction

In long-term diabetes mellitus, among the most clinically significant complications are the microangiopathies, which are disruption of the normal function of vascular capillary beds. A hallmark of these pathological processes is a significant thickening of microvascular basement membrane, with chronic progression with time. Paradoxically, this thickening of basement membranes is accompanied by a loss of function, allowing serum molecules that are normally retained within the circulation to pass across the matrix. This produces systemic effects, but most studies focused the kidney because the glomerulus provides concentrate and abundant amounts of capillary basement membrane. Furthermore, one of the most marked clinical consequences of diabetes is observed in the renal glomerulus, resulting in diabetic nephropathy [1]. Proteoglycans may play an important role in this process, since they are prominent components of extracellular matrices.

A close examination of the kidney reveals the potential complexity that proteoglycans may have in a very small region. The glomerular capillary wall consists of the epithelial and endothelial coats and glomerular extracellular matrices, which are composed of basement membrane and mesangial matrix. Cell surface proteoglycans as well as extracellular matrix proteoglycans are present, both in glomerular basement membrane and in mesangial matrix [2,3]. The mesangial matrix and the basement membrane appear to differ with respect to their proteoglycan composition [4,5].

Both the glomerular basement membrane and the mesangial matrix are increased in diabetic nephropathy [6] and this expansion is, possibly, a contributor to diabetic renal failure. Increased synthesis of extracellular matrix

* Corresponding author. Disciplina de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP-EPM, Rua Três de Maio, 100, 04023-020, São Paulo-SP-Brazil. Tel.: +55 11 5576 4442; fax: +55 11 5573 6407.
E-mail address: yara.bioq@epm.br (Y.M. Michelacci).

0925-4439/$ - see front matter © 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bbadis.2004.10.001

components [7] and reduction in the charge density of proteoglycans [8] have been reported, suggesting that changes in extracellular matrix organization and metabolism could be involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy, with alteration in filtration features.

Using an experimental model of type I diabetes mellitus, which was induced by chemical destruction of pancreatic islet cells, we have previously shown a marked decrease in the urinary excretion of glycosaminoglycans, from the second week after streptozotocin injection [9]. In contrast, the glycosaminoglycan concentration increased in diabetic kidney, due to dermatan sulfate buildup [9,10].

The aim of the present study was to further understand the parameters governing the changes in renal filtration that occur in diabetic nephropathy, especially concerning the early events of the process.

In the present study, we used a commercial preparation of dextran sulfate (modal MW 8 kDa) as a probe. This compound is highly negatively charged and is not reabsorbed by post glomerular tubules, so its clearance reflects interactions occurring at the glomerular level. Furthermore, it was recently shown that dextran sulfate does not undergo depolymerization during renal passage, and the effect of dextran sulfate binding to albumin upon fractional clearance is negligible [11].

2. Materials and methods

2.1. Animals, urine specimens, and diabetes induction

The experiments were performed in two phases. In the first phase, we used 12 male Wistar rats (12–16 weeks old, 250–350 g body weight), and in the second phase, 48 animals. At the beginning of each experiment, 24-h urine samples were collected in metabolic cages, and the animals were randomly sorted in four groups: “Control—10 days”, “Diabetes—10 days”, “Control—30 days” and “Diabetes—30 days”. Diabetes mellitus was induced in a half of the animals by a single injection of streptozotocin (60 mg/kg of body weight). The drug was dissolved in 300 μl of 10 mM sodium citrate buffer (pH 4.5) and injected by i.p. route. These animals were assigned to the “Diabetes” groups, and fed standard laboratory chow and a 5% glucose solution ad libitum, for 48 h. Afterwards, the glucose solution was replaced by water. The glycemia was measured (Glycofilm™, Bayer Diagnostics MFG, Bridgent, Mild Glamorgan, England) and all the diabetic animals of the present study have shown blood glucose concentrations higher than 200 mg/dl. Age-matched “Controls” received only citrate buffer and were fed standard laboratory chow and water ad libitum. After either 10 or 30 days, the glycemia of the corresponding groups was measured, and 24-h urine samples were collected. No animals of the “Diabetes” group died during the experimental period.

2.2. Dextran sulfate

A commercial preparation of dextran sulfate with 8-kDa modal molecular weight (Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) was used as a probe to investigate the renal filtration of polyanionic polysaccharides by normal and diabetic rats. This commercial preparation, which was used in the first phase of the experiment, is heterogeneous and gives a polydisperse band in polyacrylamide gel electrophoresis.

In order to obtain more homogeneous dextran sulfate preparations and with different modal molecular weights, a dextran sulfate sample (2 g) was fractionated by gel filtration chromatography on a Sephadex G-50 column (2×120 cm) (Amersham Biosciences do Brazil, São Paulo, SP, Brazil). The column was equilibrated and eluted with 0.05 M acetic acid, and 3-ml fractions were collected at a flow rate of 2 ml/min, and analyzed by the 1,9-dimethylmethylene blue assay [12] adapted to microscale as previously described [13]. Aliquots of the fractions containing metachromatic compounds were submitted to polyacrylamide gel electrophoresis either in a BRL vertical minisystem or in a horizontal system [14]. Fractions that presented similar electrophoretic migrations were pooled, and the modal molecular weight of each pool was determined by polyacrylamide gel electrophoresis [15]. These preparations were used in the second phase of the experiments.

2.3. Urinary glycosaminoglycan extraction and analysis

Urinary glycosaminoglycans were extracted from 24-h urine samples (4–8 ml for non-diabetic and 25–40 ml for diabetic rats) by ion-exchange chromatography on Q-Sepharose (2 ml bed volume, 1×3 cm). The samples were diluted with 2 volumes of water, and then applied to the column, previously equilibrated with water. The column was eluted in a stepwise fashion by 0.3 M NaCl (5 ml) and 2 M NaCl (5 ml). Three volumes of methanol were added to each fraction, slowly and under agitation. After standing for 24 h at −20 °C, the precipitate formed was collected by centrifugation, vacuum-dried and resuspended in 50 μl of water. Aliquots (5 μl) were submitted to agarose gel electrophoresis in two buffer systems: 0.05 M 1,3-diaminopropane-acetate buffer, pH 9 (PDA) [16] and 0.05 M Tris–acetate buffer, pH 8 (Tris). After Toluidine Blue staining, the urinary GAGs were quantified by densitometry of the gel slabs in a CS-9000, Shimadzu densitometer. All glycosaminoglycans were found in the 2 M-fraction. These compounds were further characterized by enzymatic degradation with specific mucopolysaccharidases, as previously described [17].

2.4. Urinary dextran sulfate

Samples of dextran sulfate, either unfractionated (5 mg) or fractionated as described under Dextran sulfate (3.5 mg),

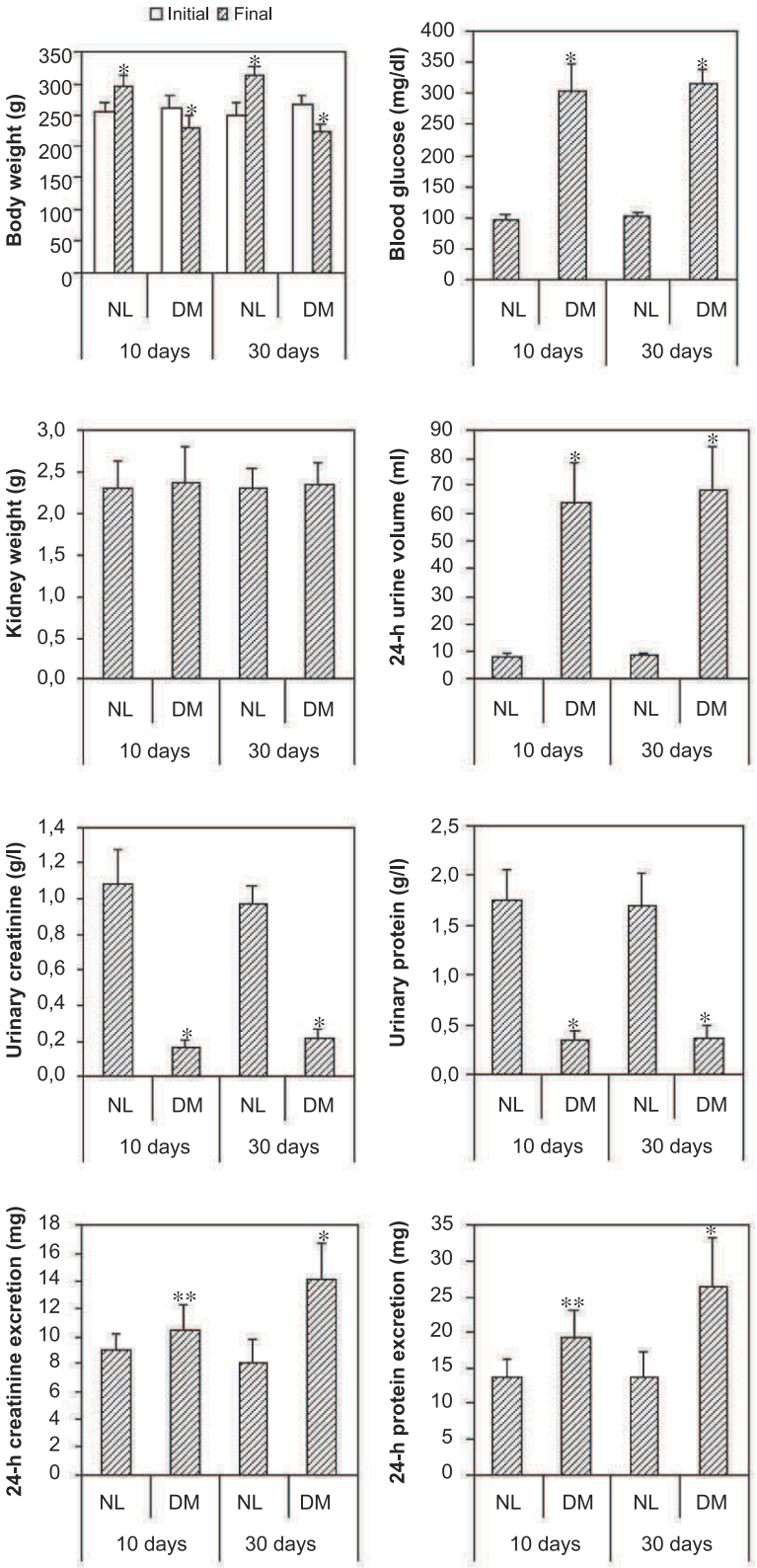


Fig. 1. Body weight, kidney wet weight, blood glucose, 24-h urine volume, and urinary excretion of creatinine and protein (expressed both as concentration in g/l and amounts excreted in 24 h, in mg) of rats that remained diabetic (DM) for either 10 or 30 days, and their respective controls (NL) (mean±standard deviation). *P<0.0001; **P<0.01.

were dissolved in isotonic saline, and i.p.-injected in control and diabetic rats (three animals of each group for each dextran sulfate preparation). Again, 24-h urine samples were collected for 2 days (0–24 and 24–48 h).

Aliquots of the urine samples (10 μl for controls and 50 μl for diabetes) from dextran sulfate-injected rats were analyzed for the presence of dextran sulfate by agarose gel electrophoresis, as described above for glycosaminoglycans.

2.5. Tissue glycosaminoglycans and dextran sulfate

At the end of the experiments (48 h after dextran sulfate administration), control and diabetic rats were killed and glycosaminoglycans (and eventually dextran sulfate) were extracted from plasma, brain, heart, liver, muscle, lung and kidney as previously described [14]. Plasma was obtained from blood samples (2 ml) by centrifugation and GAGs and dextran were isolated as described [14]. The samples were then analyzed for the presence of dextran sulfate and glycosaminoglycans by a combination of agarose gel electrophoresis and enzymatic degradation with mucopolysaccharidases, as described above.

2.6. Urinary creatinine and protein measurement

Urinary creatinine was measured by the picric acid reaction in alkaline conditions (Sigma creatinine kit) and protein was quantified by the Coomasie blue method, both adapted to microscale, as previously described [13].

2.7. Statistical analysis

Parametric and nonparametric statistical tests were used. Student's two-sided *t* test for paired samples and the Wilcoxon nonparametric sample rank test for independent groups were used to compare the mean difference in body weight, blood glucose concentration, 24-h urine volume, urinary creatinine, protein, and glycosaminoglycans of the experimental and control groups. The significance level is indicated in each experiment.

3. Results

3.1. Diabetic status of streptozotocin-treated rats

Diabetes was induced in a group of animals by streptozotocin injection. Fig. 1 shows that 10 and 30 days after streptozotocin injection, the experimental rats presented increased blood glucose concentration, increased 24-h urine volume and increased excretion of creatinine and protein in the urine, as compared to age-matched controls. In contrast to the control animals, which gained weight, the diabetic rats demonstrated a progressive decrease in body weight. All these differences remained significant, at $P<0.01$ or better, from the 10th to the 30th day for the streptozotocin-injected animals (Fig. 1). The blood glucose levels were also increased to >200 mg/dl beginning on the first week after injection and maintained until the end of the experiment, as controlled by glycemic levels monitoring every week. These data indicate that all the streptozotocin-injected rats used in the present study had developed diabetes.

3.2. Urinary glycosaminoglycans

The urinary glycosaminoglycan excretion (expressed both as mg/l, μg/24 h) was greatly decreased in the diabetic animals, both in the 10th day and in the 30th day (Fig. 2). The glycosaminoglycan concentration in the urine was decreased to less than 1/10 of the control in the diabetes groups (expressed as mg/l of urine), and the total amounts excreted in 24 h (μg/24 h) decreased to about a half (for 10 days) and 1/3 (for 30 days).

Agarose gel electrophoresis of rat urinary glycosaminoglycans is shown in Fig. 3A. Three bands were identified, migrating as chondroitin sulfate (CS), dermatan sulfate

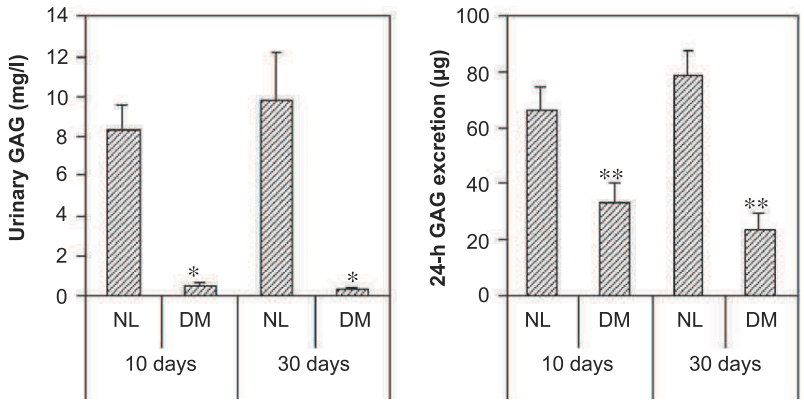


Fig. 2. Urinary glycosaminoglycan (GAG) concentration and 24-h glycosaminoglycan excretion in the urine for rats that remained diabetic for either 10 or 30 days, and their respective controls (mean±standard deviation). *$P<0.0001$; **$P<0.001$.

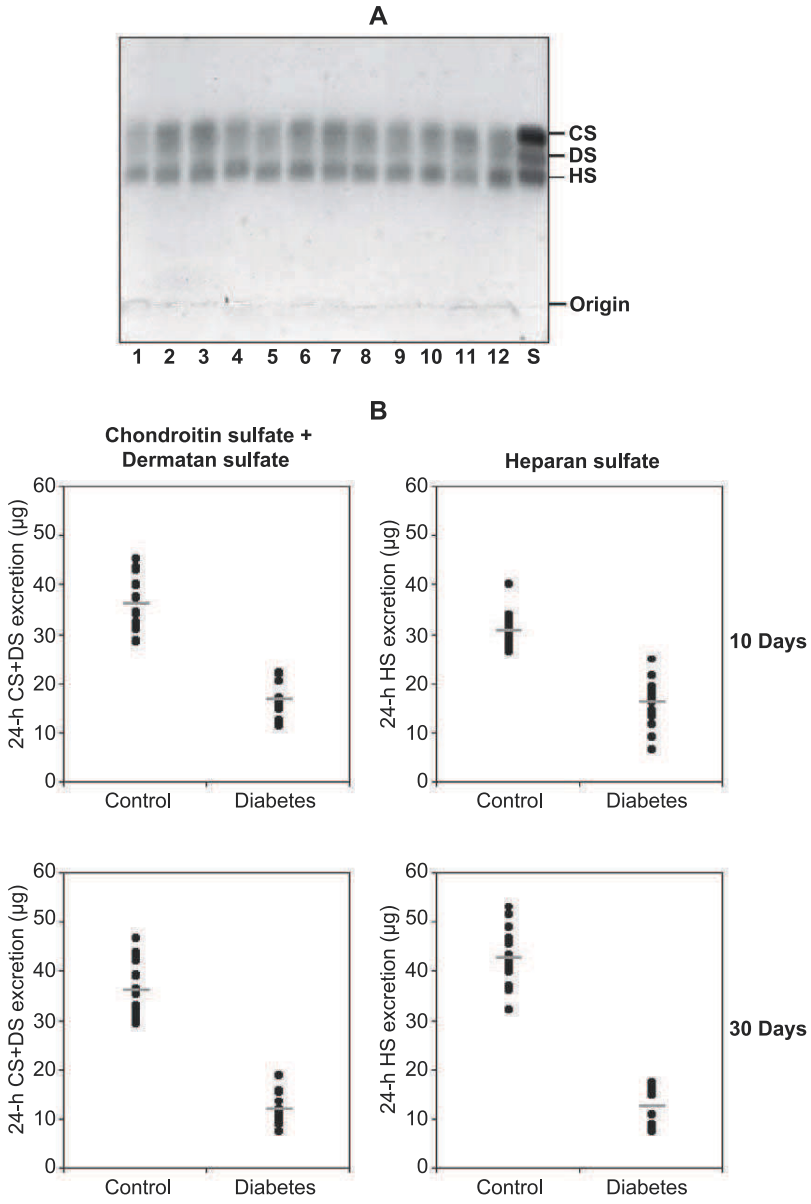


Fig. 3. (A) Agarose gel electrophoresis of rat urinary glycosaminoglycans from normal and diabetic rats. The glycosaminoglycans were extracted from urine samples (4–8 ml for non-diabetic rats and 25–40 ml for diabetic rats) as described in Materials and methods. The dried material was resuspended in 50 µl of water and 5-µl aliquots were applied to agarose gel slabs and submitted to electrophoresis. The glycosaminoglycans were stained by Toluidine Blue. S: mixture of standard glycosaminoglycans: chondroitin sulfate (CS), dermatan sulfate (DS) and heparan sulfate (HS); 1–12: urine samples from normal rats. (B) Individual data for 24-h urinary glycosaminoglycan excretion by rats that remained diabetic for either 10 or 30 days, and their respective controls. The control animals received placebo. The horizontal gray lines indicate the mean values.

(DS), and heparan sulfate (HS). The band migrating as chondroitin sulfate was totally degraded by chondroitinase AC, and the band migrating as heparan sulfate was susceptible to heparitinase II from *Flavobacterium heparinum*. Dermatan sulfate was degraded by chondroitinase B and was partially degraded by chondroitinase AC, indicating that this dermatan sulfate is composed of glucuronic acid- and iduronic acid-containing disaccharide units [18]. In some instances it was difficult to define the boundary between dermatan sulfate and chondroitin sulfate in the agarose gel. Because of their low molecular weights, there was some degree of diffusion and overlap during the electrophoresis (see Fig. 3A); so, they were quantified together, and Fig. 3B shows that both heparan sulfate and chondroitin sulfate/dermatan sulfate were found to be decreased in diabetic animals both in the 10th day and in the 30th day after streptozotocin injection.

3.3. Urinary excretion of dextran sulfate

When a commercial preparation of dextran sulfate (8 kDa modal molecular weight) was administered to normal and

diabetic rats, most of the dextran sulfate was excreted in the urine during the first 24 h in all groups (only a few animals excreted trace amounts of dextran sulfate during the subsequent 24 h). Fig. 4A shows that diabetic rats excreted significantly less dextran sulfate in the urine than their normal controls. At the end of the experiments (10 or 30 days), the rats were killed, and blood, brain, heart, liver, muscle, lung and kidney were analyzed for dextran sulfate and glycosaminoglycans. Dextran sulfate was found only in liver and kidney (Fig. 4B). No dextran sulfate was detected in blood (data not shown), and the diabetic animals accumulated more dextran sulfate in liver than normal controls. Moreover, the molecules that accumulated in the kidney were of higher molecular weights than those present in the urine (Fig. 5), suggesting a molecular size dependence for urinary excretion of dextran sulfate.

In order to further investigate this point, the commercial 8-kDa dextran sulfate, which is polydisperse (5 to 15 kDa), was fractionated by gel filtration chromatography in Sephadex G-50 (Fig. 6). As described in Material and methods, the fractions containing molecules of similar molecular weights were pooled. Four preparations were obtained, with different modal (and range of) molecular weights: 11.5 kDa (9.8 to 15.0 kDa), 9.8 kDa (6.0 to 13.5 kDa), 7.2 kDa (5.5 to 11.0 kDa), and 6.0 kDa (5.0 to 8.0 kDa).

These preparations (3.5 mg) were administered to normal and diabetic rats and their urinary excretion is shown in Fig. 7. A clear correlation between dextran sulfate molecular weight and amounts recovered in the urine is observed for all animals, again suggesting that the renal filtration of this anionic polymer is molecular weight-dependent. Nevertheless, diabetic animals excreted lower proportions of the larger molecules, as compared to their respective controls (Fig. 7). These data suggest that the molecular mass upper limit for renal permselectivity of dextran sulfate was decreased in diabetes mellitus. This difference increased with the duration of diabetes mellitus, but could be observed even in the animals that remained diabetic for only 10 days, again indicating that changes in renal filtration of charged polysaccharides are very early events in the development of diabetic nephropathy.

Conversely, a higher proportion of the high molecular weight dextran sulfates accumulated in the kidney and liver of diabetic animals (Fig. 8).

4. Discussion

We have previously shown that the chronic diabetic state induced by streptozotocin in rats results in marked decrease of urinary glycosaminoglycan excretion, on a daily basis

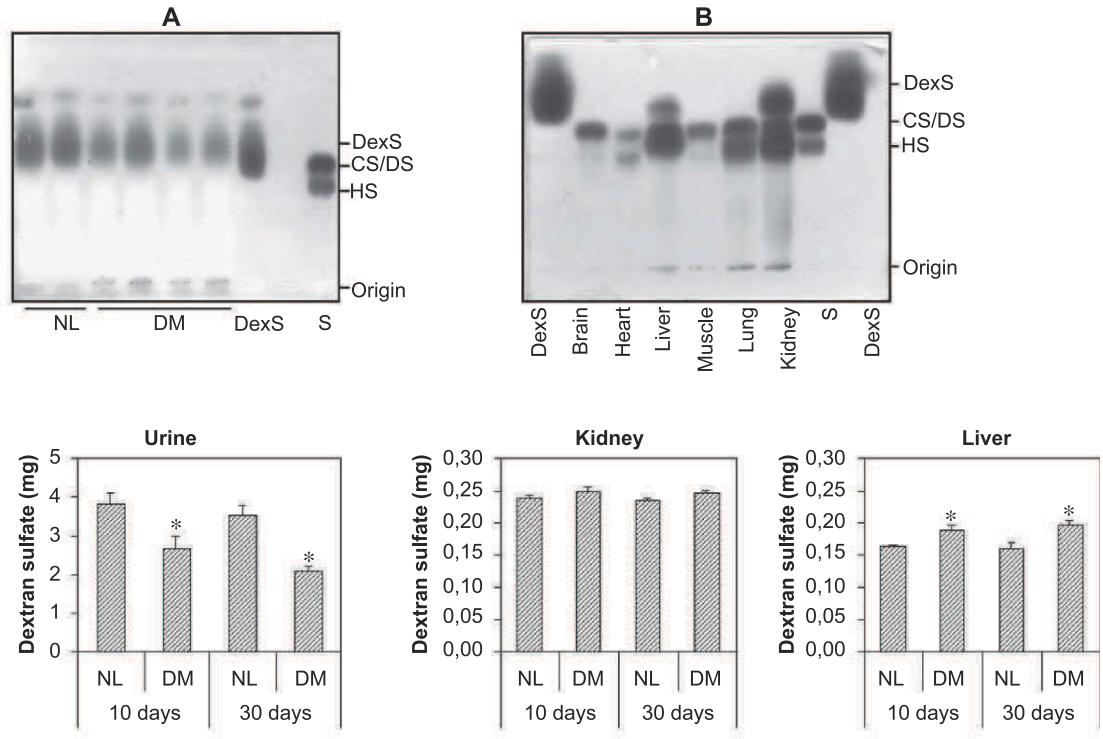


Fig. 4. (A) Agarose gel electrophoresis of dextran sulfate excreted in the urine of normal (NL) and diabetic (DM), and total amounts excreted in the urine during the first 24 h by rats that remained diabetic for either 10 or 30 days, and their respective controls. (B) Agarose gel electrophoresis of glycosaminoglycans and dextran sulfate isolated from brain, heart, liver muscle, lung and kidney normal rats, and total amounts found in liver and kidney 48 h after dextran sulfate administration to rats that remained diabetic for either 10 or 30 days and their respective controls. S: mixture of standard glycosaminoglycans: chondroitin sulfate (CS), dermatan sulfate (DS) and heparan sulfate (HS); DexS: dextran sulfate (mean±standard deviation). *$P<0.02$.

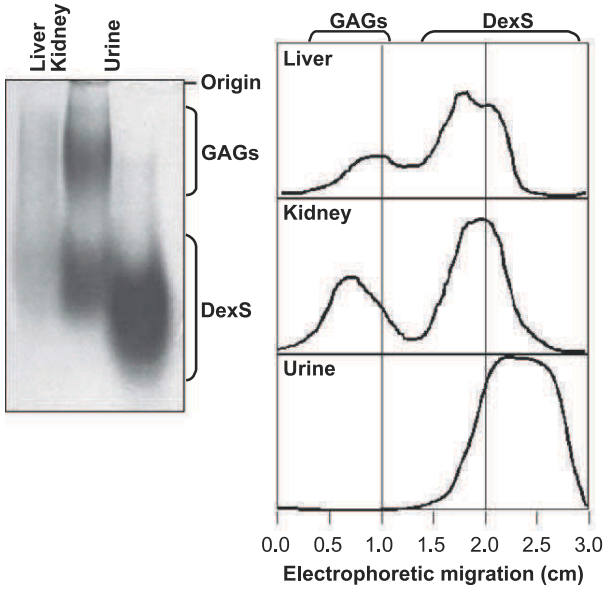


Fig. 5. Polyacrylamide gel electrophoresis of dextran sulfate (DexS) and glycosaminoglycans (GAGs) isolated from rat liver, kidney and urine. A commercial preparation of dextran sulfate (8 kDa) was i.p. injected to rats, and 24-h urine samples were collected for 2 days. Afterwards, some animal tissues and organs were analyzed for glycosaminoglycans and the presence of dextran sulfate, as described in Materials and methods. Dextran sulfate was found only in liver and kidney. Aliquots of the glycosaminoglycans and dextran sulfate extracted from these tissues and also excreted in the urine were submitted to polyacrylamide gel electrophoresis. The figure shows both the gel slab and the densitometry profiles thus obtained.

[9]. The onset of this feature was an early event in the development of diabetes, observed 2 weeks after diabetes induction. Decreased excretion of glycosaminoglycans has also been observed by others in patients with diabetic nephropathy and other glomerular diseases [19].

This decreased urinary glycosaminoglycan concentration could be related to decreased glycosaminoglycan contents of kidneys and other tissues in diabetic animals, as reported by Cechowska-Pasko et al. [20], but it could also be due to altered renal permselectivity to negatively charged molecules.

Rats excrete a mixture of chondroitin sulfate, dermatan sulfate and heparan sulfate in the urine. Only trace amounts of dermatan sulfate were found in normal rat kidney, while chondroitin sulfate was not detected, indicating that the urinary chondroitin sulfate and dermatan sulfate do not come from the kidney [9,10]. Heparan sulfate is present in almost all mammalian tissues but, since it is the main kidney glycosaminoglycan, minor amounts of the urinary heparan sulfate could be originated from the kidney. This is also true for cats [14] and possibly other mammalian species. We have recently shown that chondroitin sulfate is not present in cat kidney and urinary tract, but is found in the cat plasma. Circulating glycosaminoglycans are thought to represent products of the metabolism of connective tissue, en route to catabolism in liver or excretion in the urine. Kittens excrete high chondroitin sulfate concentrations, possibly due to high metabolic rates and tissue remodeling in these animals. Moreover, it has been previously shown that part of the chondroitin sulfate administered by either i.p. or i.v. routes to rats appears in the urine, along with its degradation products [21,22]. These data indicate that glycosaminoglycans can be filtered in the kidney, and the changes observed in the urinary excretion of these compounds in diabetes could be due to changes in the renal permselectivity to these molecules.

Although the renal permselectivity for proteins and neutral polysaccharides has been thoroughly investigated [23,24] (reviewed in Ref. [25]), only a few reports on the renal filtration of charged polysaccharides have appeared [11,22,26]. Guimarães and Mourão [22] have shown that, in normal rats, the urinary excretion of sulfated polysaccharides is based on molecular size, but the upper limit for excretion in the urine depends on the structure of the molecules. For dextran sulfates the limit reported by these authors is ~8 kDa, while branched polysaccharides were cleared in the urine only in trace amounts. Nevertheless, diabetic animals were not studied.

Our objective was to further investigate the renal filtration of sulfated polysaccharides in animals that remained diabetic for short periods. In the present paper, we described the urinary excretion of glycosaminoglycans and of dextran sulfates of different molecular weights by rats that remained diabetic for either 10 or 30 days.

All the diabetic animals here studied were hyperglycemic, and did not gain weight during all the experimental period. Proteinuria and creatinine hyperfiltration also appeared. In contrast, all these animals excreted less glycosaminoglycans in the urine (on a daily basis), as compared to their age-matched controls.

When dextran sulfates of different molecular weights were administered by i.p. route to normal and diabetic rats, most of it was excreted in the urine during the first 24 h. This result is in agreement with those obtained by Guimarães and Mourão [22] for normal rats. The proportions recovered in the urine were inversely proportional to the dextran sulfate molecular weight, indicating that the renal filtration of these polyanionic molecules depends on the molecular size. This recovery was never 100%, suggesting accumulation in tissues, excretion in the feces, or partial degradation [27]. Diabetic rats excreted less and accumulated more dextran sulfate in kidney and liver than their respective age-matched controls. These differences, which were statistically significant only for the dextran sulfates of higher molecular weights (>7 kDa), increased with the duration of diabetes.

The apparent paradox between reduced dextran sulfate (and endogenous glycosaminoglycan) urinary excretion and increased protein excretion here reported has also been noticed by other authors, under different experimental

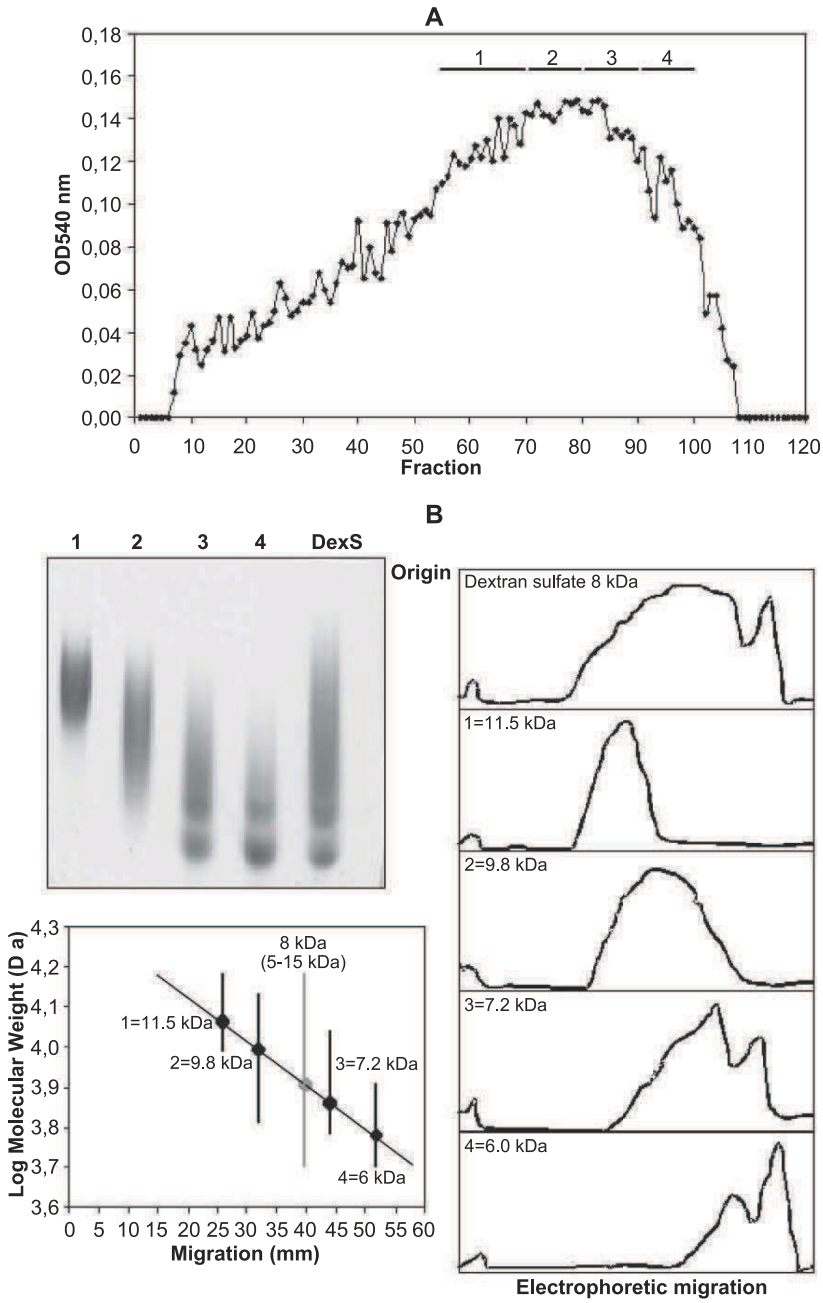


Fig. 6. (A) Fractionation of the 8-kDa dextran sulfate on Sephadex G-50. A sample (2 g) of the commercial preparation of dextran sulfate (modal MW 8 kDa) was applied to a Sephadex G-50 column as described in Materials and methods. Fractions (3 ml) were collected and checked for metachromatism with 1,9-dimethylmethylene blue adapted to microscale. The fractions were pooled as indicated by the horizontal lines. (B) Polyacrylamide gel electrophoresis of the dextran sulfate subfractions. Dextran sulfate subfractions obtained by gel filtration chromatography (1–4) were submitted to polyacrylamide gel electrophoresis and compared to the unfractionated dextran sulfate (DexS). The densitometry profile and the plot of electrophoretic migration versus log of the molecular weight are also shown.

conditions. In 1982, Michels et al. [26] reported an increase in albumin excretion and a significant decrease in dextran sulfate clearance (50–60%) in rats that remained diabetic for 3 months, treated or not with insulin. Similar results were obtained by Burne et al. [11] with the isolated perfused kidney technique, for rats that remained diabetic for four weeks. The fractional clearance of neutral dextran was not different in diabetic and control kidneys, but dextran sulfate clearance was significantly lower than control.

This suggests the involvement of multiple mechanisms for the renal handling of macromolecules, which could include transglomerular filtration and tubular reabsorption or secretion, in addition to the involvement of renal cells in

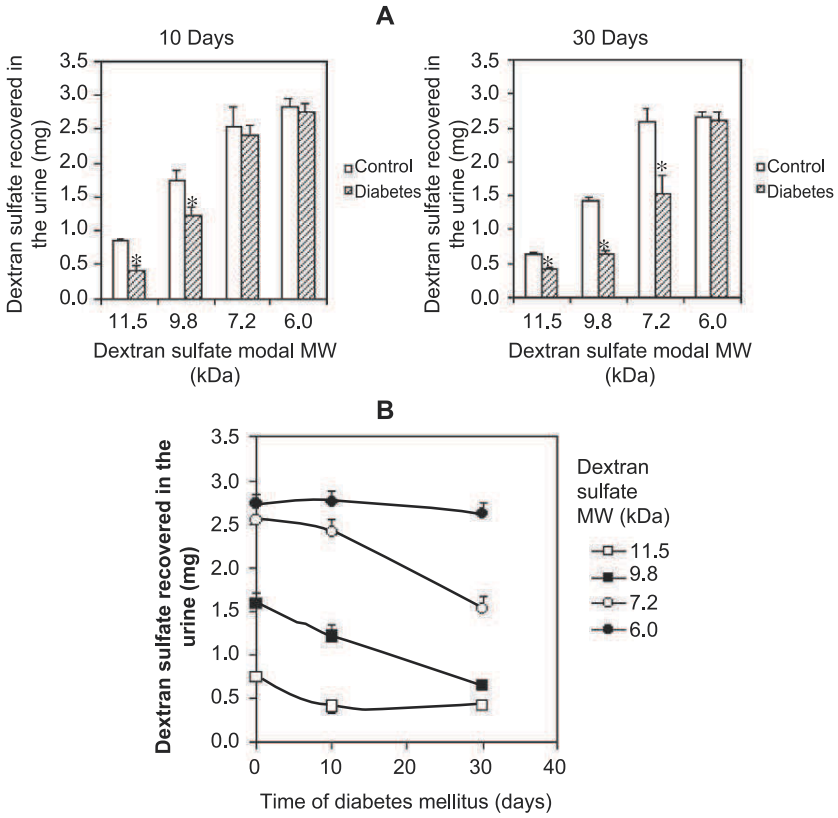


Fig. 7. (A) Urinary excretion during the first 24 h of dextran sulfates of different molecular weights administered to rats that remained diabetic for either 10 or 30 days, and their respective controls. Each fraction was i.p. injected to 12 rats (3 of each group), and urinary excretion was evaluated during 24 h by densitometry of agarose gel slabs, as described in Materials and methods (mean±standard deviation). (B) Effect of time of diabetes upon the urinary excretion of dextran sulfate of different molecular weight. Results show mean±standard deviation of three diabetic rats for each dextran sulfate preparation at the 10th and the 30th day after diabetes induction. *P<0.02.

the differential processing of dextran sulfate, glycosaminoglycans and proteins.

Recent studies on glomerular permselectivity strongly suggest that charge selectivity does not exist [28,29]. Attempts to measure the glomerular sieving coefficient of albumin in a low temperature perfusion system designed to inhibit cellular processes supported the charge selectivity concept [30], but the system used has the serious drawbacks pointed out by Osicka et al. [31]. There are evidences suggesting that protein exclusion from polyanion membranes is only size-based [32], and size and shape seem to influence the transglomerular passage of both proteins [33] and polysaccharides [22].

On the other hand, there are increasing indications of the involvement of renal cells in the processing of proteins and polysaccharides. Comper et al. [27] have shown partial desulfation of dextran sulfate during kidney filtration. Burne et al. [11] reported a decreased activity of glomerular sulfatases in diabetes, with corresponding lower degrees of dextran sulfate desulfation upon renal passage. This effect was reverted by lysosome-target drugs [34], suggesting that diabetes may induce changes in the lysosomal renal processing. The presence of albumin peptides in the urine of streptozotocin-diabetic rats agrees with this concept [35], signifying that albumin-specific mechanisms may be responsible for the increase in albumin peptides in the urine. Furthermore, changes in the renal proximal tubular cell cytoskeleton have been correlated to albuminuria in diabetes [36].

Our results support the notion of differential renal processing for proteins and sulfated polysaccharides, with the possible involvement of kidney cells. The accumulation of dextran sulfate molecules of larger molecular sizes in diabetic kidney and liver also agrees with the increased glomerular residence time previously observed in perfused kidney [11].

Basement membrane thickening and mesangial expansion characterize the morphological changes in diabetic nephropathy [37–39]. Some authors suggested that thickening is due to accumulation of basement membrane material deposited by successive cell layers [40], while others proposed either a decreased susceptibility of diabetic basement membrane to degradation [41] or overexpression of basement membrane components, such as laminin and type IV collagen [42]. Although we did not find any changes in the kidney heparan sulfate concentration [9], a decrease in glomerular heparan sulfate has been reported by other authors in diabetic nephropathy [1,43]. It is possible that the structural organization of the basement membrane and

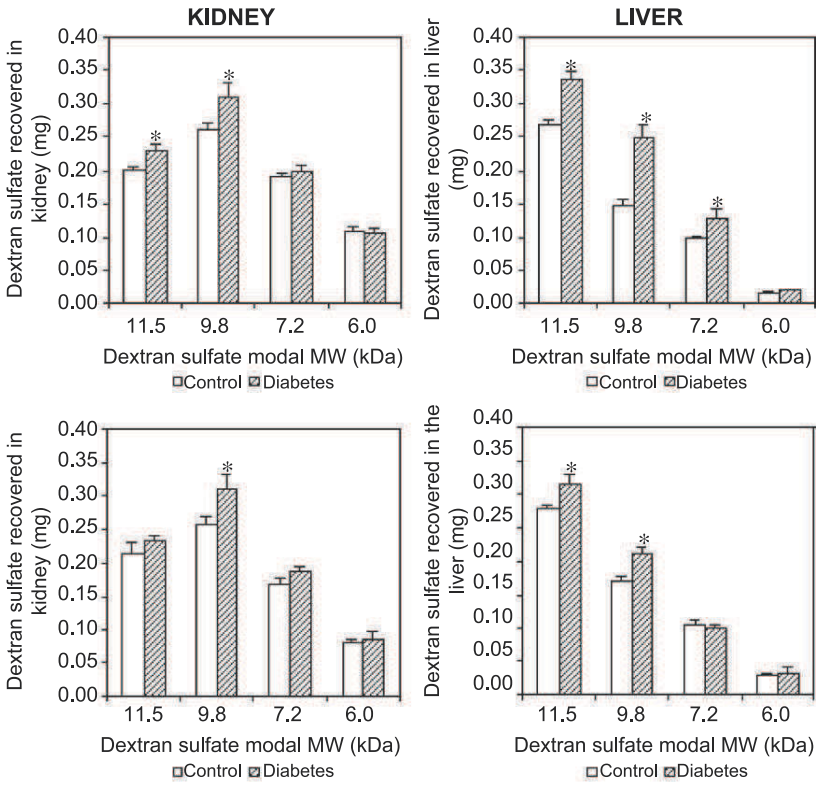


Fig. 8. Total amounts of dextran sulfates of different molecular weights (6–11.5 kDa) found in kidney and liver, 48 h after dextran sulfate administration to rats that remained diabetic for either 10 or 30 days and their respective controls (mean±standard deviation). *$P<0.05$.

mesangial matrix leads to a looser arrangement of proteoglycans, affecting the properties of the renal cells. Many authors reported the overexpression of glomerular extracellular matrix components in diabetic nephropathy [44], but the synthesis of these components may be unbalanced. For instance, the expression of type IV collagen α3(IV), α4(IV) and α5(IV) chains is dissociated from the α1(IV) and α2(IV) expression in the kidney of diabetic mice [45]. This unbalanced synthesis may affect the type IV collagen assembly and contribute to the basement membrane thickening.

Concerning the mesangium, we have previously shown that cultured mesangial cells synthesize a mixture of dermatan sulfate and heparan sulfate and most of the dermatan sulfate is released to the culture medium [46]. Mesangial cells from diabetic rats incorporate much more ^{35}S-sulfate in glycosaminoglycans, especially dermatan sulfate, than mesangial cells from normal rats. This increase is proportional to the duration of diabetes, and could be related to altered Golgi or lysosomal function. The dermatan sulfate was secreted to the medium as two proteoglycans, identified as members of the small matrix proteoglycan decorin/biglycan family [47]. Decorin and other extracellular matrix proteoglycans may functionally facilitate the assembly of extracellular matrix. The stimulation of proteoglycan production in mesangial cells obtained from diabetic rats may be related to the accumulation of dermatan sulfate and chondroitin sulfate previously reported [9] and possibly to the mesangial matrix expansion observed in diabetes mellitus. Taken together, these data suggest morphological and biochemical alterations in diabetes that may affect the kidney physiology, leading to diabetic nephropathy. The measurement of the urinary glycosaminoglycans, in concert with protein and creatinine, could be of value in the early diagnostics and follow-up of diabetic nephropathy.

Acknowledgements

This research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasília, DF, Brazil; Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasília, SP, Brazil; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), São Paulo, SP, Brazil; and Sociedade Paulista para o Desenvolvimento da Medicina (SPDM), São Paulo, SP, Brazil.

References

[1] D.M. Templeton, Retention of glomerular basement membrane-proteoglycans accompanying loss of anionic site staining in experimental diabetes, Lab. Invest. 61 (1989) 202–211.

[2] Y.S. Kanwar, L.J. Rosenzweig, M.L. Jakubowski, Distribution of de novo synthesized sulfated glycosaminoglycans in the glomerular basement membrane and mesangial matrix, Lab. Invest. 49 (1983) 216–225.
[3] J.L. Stow, M.G. Farquhar, Basement membrane heparan sulfate proteoglycans are concentrated in the lamina rara and in the podocytes of the rat renal glomerulus, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82 (1985) 3296–3300.
[4] Y.S. Kanwar, M.L. Jakubowski, L.J. Rosenzweig, Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the glomerular basement membrane and mesangial matrix, Eur. J. Cell Biol. 31 (1983) 290–295.
[5] M.G. Farquhar, The glomerular basement membrane: a selective macromolecular filter, in: E.D. Hay (Ed.), Cell Biology of Extracellular Matrix, second edition, Plenum, NY, 1991, pp. 365–418.
[6] S.N. Mauer, P. Lane, M. Hattori, P. Fioretto, M.W. Steffes, Renal structure and function in insulin-dependent diabetes mellitus and type I membranoproliferative glomerulonephritis in humans, J. Am. Soc. Nephrol. 2 (1992) S181–S184.
[7] S.H. Ayo, R.A. Radnik, W.F. Glass, J.A. Garoni, E.R. Rampt, D.R. Appling, J.I. Kreisberg, Increased extracellular matrix synthesis and mRNA in mesangial cells grown in high glucose medium, Am. J. Physiol. 269 (1991) F185–F191.
[8] S. Silbiger, S. Crowley, Z. Shan, M. Brownlee, J. Satriano, D. Schlondorff, Non-enzymatic glycation of mesangial matrix and prolonged exposure of mesangial matrix to elevated glucose reduces collagen synthesis and proteoglycan charge, Kidney Int. 43 (1993) 853–864.
[9] R.A. Cadaval, O. Kohlman, Y.M. Michelacci, Urinary excretion of glycosaminoglycans and albumin in experimental diabetes mellitus, Glycobiology 10 (2000) 185–192.
[10] Y.M. Michelacci, R.A.M. Cadaval, R.M. Rovigatti, O. Kohlman, Renal and urinary glycosaminoglycans in an experimental model of chronic renal failure in rats, Exp. Nephrol. 9 (2001) 40–48.
[11] M.J. Burne, Y. Adal, N. Cohen, S. Panagiotopoulos, G. Jerumns, W.D. Comper, Anomalous decrease in dextran sulfate clearance in the diabetic rat kidney, Am. J. Physiol. 274 (1998) F700–F708.
[12] R.W. Farndale, D.J. Buttle, A.J. Barrett, Improved quantitation and discrimination of sulfated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue, Biochim. Biophys. Acta 883 (1986) 173–177.
[13] J.A.K. Aguiar, C.R. Lima, Y.M. Michelacci, An improved methodology to produce *Flavobacterium heparinum* chondroitinases, important instruments for diagnosis of diseases, Biotechnol. Appl. Biochem. 37 (2003) 115–127.
[14] D.A. Pereira, J.A.K. Aguiar, M.K. Hagiwara, Y.M. Michelacci, Changes in cat urinary glycosaminoglycans with age and in feline urologic syndrome, Biochim. Biophys. Acta. 1272 (2004) 1–11.
[15] J.C. Hilborn, P.A. Anastassiadis, Estimation of the molecular weights of acidic mucopolysaccharides by polyacrylamide gel electrophoresis, Anal. Biochem. 39 (1971) 88–92.
[16] C.P. Dietrich, N. McDuffie, L.O. Sampaio, Identification of acidic mucopolysaccharides by agarose gel electrophoresis, J. Chromatogr. 130 (1977) 299–304.
[17] V.L. Petricevich, Y.M. Michelacci, Proteoglycans synthesized in vitro by nude and normal mouse peritoneal macrophages, Biochim. Biophys. Acta. 1053 (1990) 135–143.
[18] C.A. Población, Y.M. Michelacci, Structural differences of dermatan sulfates from different origins, Carbohydr. Res. 147 (1986) 87–100.
[19] J. Tencer, O. Torffvit, S. Bjornsson, H. Thysell, A. Grubb, B. Rippe, Decreased excretion of glycosaminoglycans in patients with primary glomerular diseases, Clin. Nephrol. 48 (1997) 212–219.
[20] M. Cechowska-Pasko, J. Palka, E. Bankowski, Decrease in the glycosaminoglycan content in the skin of diabetic rats. The role of IGF-I, IGF-binding proteins and proteolytic activity, Mol. Cell. Biochem. 154 (1996) 1–8.
[21] Y.M. Michelacci, M.A. Boim, C.T. Bergamaschi, R.M. Rovigatti, N. Schor, Possible role for chondroitin sulfate in urolithiasis: in vivo studies in an experimental model, Clin. Chim. Acta 208 (1992) 1–8.
[22] M.A.M. Guimarães, P.A.S. Mourão, Urinary excretion of sulfated polysaccharides administered to Wistar rats suggests a renal permselectivity to these polymers based on molecular size, Biochim. Biophys. Acta. 1335 (1997) 161–172.
[23] R. Oberbauer, V. Nenov, C. Weidekamm, M. Haas, T. Szekeres, G. Mayer, Reduction in mean glomerular pore size coincides with the development of large shunt pores in patients with diabetic nephropathy, Exp. Nephrol. 9 (2001) 49–53.
[24] S. Andersen, K. Blouch, J. Bialek, M. Deckert, H.H. Parving, B.D. Myers, Glomerular permselectivity in early stages of overt diabetic nephropathy, Kidney Int. 58 (2000) 2129–2137.
[25] J.W. Scholey, Angiotensin II and the glomerulus: focus on diabetic kidney disease, Curr. Hypertens. Rep. 5 (2003) 172–180.
[26] L.D. Michels, M. Davidman, W.F. Keane, Glomerular permeability to neutral and anionic dextrans in experimental diabetes, Kidney Int. 21 (1982) 699–705.
[27] W.D. Comper, M. Tax, X. Wells, J. Dawes, Desulfation of dextran sulfate during kidney ultrafiltration, Biochem. J. 297 (1994) 31–34.
[28] R.C. Schaeffer, M.L. Gratrix, D.R. Mucha, J.M. Carbajal, The rat glomerular filtration barrier does not show negative charge selectivity, Microcirculation 9 (2002) 329–342.
[29] M.A.M. Guimarães, J. Nikolovski, K.A. Greive, L.M. Pratt, W.D. Comper, Anomalous fractional clearance of negatively charged Ficoll relative to uncharged Ficoll, Am. J. Physiol. 285 (2003) F1118–F1124.
[30] M. Ohlson, J. Sörensson, B. Haraldsson, Glomerular size and charge selectivity in the rat as revealed by FITC-Ficoll and albumin, Am. J. Physiol. 279 (2000) F84–F91.
[31] T.M. Osicka, K.J. Strong, D.J. Nikolic-Paterson, R.C. Atkins, W.D. Comper, Albumin and glomerular permselectivity, Nephrol. Dial. Transplant. 19 (2004) 511–512.
[32] G.J. Cumming, C.J. Handley, B.N. Preston, Permeability of composite chondrocyte-culture-millipore membranes to solutes of varying size and shape, Biochem. J. 181 (1979) 257–266.
[33] M. Ohlson, J. Sorenson, K. Lindstrom, A.M. Blom, E. Fries, B. Haraldsson, Effects of filtration rate on the glomerular barrier and clearance of four differently shaped molecules, Am. J. Physiol. 281 (2001) F103–F113.
[34] T.M. Osicka, Z. Kiriazis, L.M. Pratt, G. Jerums, W.D. Comper, Ramipril and aminoguanidine restore renal lysosomal processing in streptozotocin diabetic rats, Diabetologia 44 (2001) 230–236.
[35] K.A. Greive, T.M. Osicka, L.M. Russo, W.D. Comper, Nephrotic-like proteinuria in experimental diabetes, Am. J. Nephrol. 23 (2003) 38–46.
[36] T.M. Osicka, J.M. Forbes, V. Thallas, G.C. Brammar, G. Jerums, W.D. Comper, Ramipril prevents microtubular changes in proximal tubules from streptozotocin diabetic rats, Nephrology 8 (2003) 205–211.
[37] S. Daimon, I. Koni, Glomerular enlargement in the progression of mesangial proliferative glomerulonephritis, Clin. Nephrol. 49 (1998) 145–152.
[38] T. Matsumae, S. Jimi, N. Uesugi, S. Takebayashi, S. Naito, Clinical and morphometrical interrelationships in patients with overt nephropathy induced by non-insulin-dependent diabetes mellitus. A light- and electron-microscopy study, Nephron 81 (1999) 41–48.
[39] R. Osterby, J. Asplund, H.J. Bangstad, G. Nyberg, S. Rudberg, G. Viberti, J.D. Walker, Glomerular volume and the glomerular vascular pole area in patients with insulin-dependent diabetes mellitus, Virchows Arch. 431 (1997) 351–357.
[40] R. Vracko, Basal lamina layering in diabetes mellitus, Diabetes 23 (1974) 94–104.
[41] R. Knecht, R. Leber, C. Hasslacher, Degradation of glomerular basement membrane in diabetes: I. Susceptibility of diabetic and nondiabetic basement membrane to proteolytic degradation of isolated glomeruli, Res. Exp. Med. 187 (1987) 323–328.
[42] C. Asselot-Chapel, C. Borchiellini, J. Labat-Robert, P. Kern, Expression of laminin and type IV collagen by basement membrane-producing EHS tumors in streptozotocin-induced diabetic mice: in vivo modulation by low-molecular-weight heparin fragments, Biochem. Pharmacol. 52 (1996) 1695–1701.

[43] J. van den Born, A.A. van Kraats, M.A.K. Bakker, K.J.M. Assmann, H.B.P.M. Dijkman, J.A.W.M. van der Laak, J.H.M. Berden, Reduction of heparan sulfate-associated anionic sites in the glomerular basement membrane of rats with streptozotocin-induced diabetic nephropathy, Diabetologia 38 (1995) 1169–1175.
[44] T. Kamata, E. Muso, M. Yashiro, T. Kawamura, A. Oyama, H. Matsushima, E. Takeuchi, H. Yoshida, S. Sasayama, Up-regulation of glomerular extracellular matrix and transforming growth factor-beta expression in RF/J mice, Kidney Int. 55 (1990) 864–876.
[45] K. Funabiki, Y. Makita, M. Yamamoto, T. Shike, M. Fukui, Y. Sumiyoshi, Y. Tomino, Dissociated expression of collagen type IV subchains in diabetic kidneys of KKAy mice, Nephron 80 (1998) 208–213.
[46] S.J. Hadad, Y.M. Michelacci, N. Schor, Proteoglycans and glycosaminoglycans synthesized in vitro by mesangial cells from normal and diabetic rats, Biochim. Biophys. Acta. 1290 (1996) 18–28.
[47] W.A. Border, S. Okuda, L.R. Languino, E. Ruoslahti, Transforming growth factor-(regulates production of proteoglycans by mesangial cells, Kidney Int. 37 (1990) 689–695.

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Clinica Chimica Acta 378 (2007) 206–215
www.elsevier.com/locate/clinchim

Reliability of 1,9-dimethylmethylene blue tests in comparison to agarose gel electrophoresis for quantification of urinary glycosaminoglycans

Cilene R. de Lima [a], Raquel Y.A. Baccarin [b], Yara M. Michelacci [a,*]

[a] Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo — UNIFESP — São Paulo, SP, Brazil
[b] Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo — FMVZ, USP — São Paulo, SP, Brazil

Received 21 July 2006; received in revised form 17 October 2006; accepted 29 November 2006
Available online 14 December 2006

Abstract

Background: The relevance of glycosaminoglycan determination in biological fluids is gradually gaining importance in the literature. Nevertheless, the results obtained by different methods vary widely. We evaluated 1,9-dimethylmethylene blue (DMB) dye-binding assays for quantification of urinary glycosaminoglycans, in comparison to densitometry after agarose gel electrophoresis.
Methods: Urinary glycosaminoglycans from different mammalian species were quantified by 3 different DMB dye-binding assays. The results were compared to those obtained by densitometry after agarose gel electrophoresis of glycosaminoglycans isolated from urine samples by ion exchange chromatography.
Results: Densitometry after agarose gel electrophoresis showed glycosaminoglycan urinary concentrations of 1–20 mg/l, and glycosaminoglycan/creatinine ratios of $2–25\times10^{-3}$, for all the mammalian species here studied. A decrease with age was observed for humans, cats and horses. In comparison, DMB assays gave much higher results — up to 200 mg/l and 500×10^{-3} glycosaminoglycan/creatinine ratios. These values were greatly reduced after 4-h dialysis, suggesting that low molecular weight compounds do interfere. Furthermore, urinary anions such as sulfate, phosphate and citrate, react with metachromatic dyes, such as Toluidine Blue and DMB.
Conclusion: DMB assays, although rapid and simple, are not appropriate to quantify urinary glycosaminoglycans in normal mammalians, since other urinary components interfere with the reactions.
© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Glycosaminoglycan; Urine; Agarose gel electrophoresis; DMB assay

1. Introduction

Normal human urine contains small amounts of glycosaminoglycans. Glycosaminoglycans are ubiquitous polyanionic polysaccharides that occur in animal tissues covalently linked to a protein core forming proteoglycans (review in [1]). Chondroitin sulfate, dermatan sulfate, heparan sulfate, keratan sulfate and heparin are the main glycosaminoglycans found in mammalian tissues, and each has an unique structure and tissue distribution pattern [1]. Although all glycosaminoglycans are composed by disaccharide repeating units, there are considerable variations in their structure, achieved through biosynthetic modulation of sulfation, epimerization and acetylation reactions. Proteoglycans are synthesized in endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, and are degraded by the sequential action of proteases, glycosidases, deacetylases and sulfatases, mostly in lysosomes. Most of the proteoglycan components are recycled, but small amounts of partially degraded glycosaminoglycans are excreted in the urine.

Much of the information concerning the degradation of proteoglycans has been derived from the study of mucopolysaccharidosis, a group of genetic disorders characterized by a deficiency of one lysosomal enzyme required to degrade glycosaminoglycans, leading to accumulation in lysosomes and

* Corresponding author. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo — UNIFESP, Rua Três de Maio, 100, 04044-020 — São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55 11 55764442; fax: +55 11 55736407.
E-mail address: yara.bioq@epm.br (Y.M. Michelacci).

0009-8981/$ - see front matter © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.cca.2006.11.025

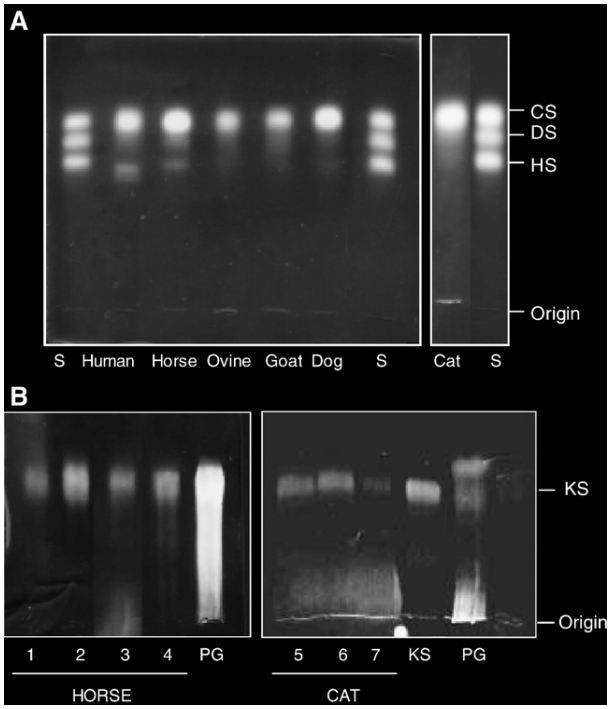


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis (A) and immunoblotting (B) of urinary glycosaminoglycans (GAG) from different mammalian species. Glycosaminoglycans were extracted from 10–50 ml urine samples by ion exchange chromatography on Q-Sepharose Aliquots were submitted to agarose gel electrophoresis in PDA buffer. The glycosaminoglycans were either stained by Toluidine Blue (A) or immunoblotted for detection of keratan sulfate (B). S, mixture of standard glycosaminoglycans: chondroitin sulfate (CS), dermatan sulfate (DS) and heparan sulfate (HS); 1–4, horse urine samples; 5–7, cat urine samples; KS, standard keratan sulfate; PG, aggrecan from bovine cartilage.

increased excretion in the urine of partially degraded glycosaminoglycans [2]. The diagnosis of mucopolysaccharidosis is classically based on clinical history and analysis of urinary glycosaminoglycans. The detection of excessive glycosaminoglycan excretion in the urine is the first laboratory approach to the mucopolysaccharidosis diagnosis, and increasing demands for early diagnosis are placed now on the clinicians since new treatment options are now becoming available. Enzyme replacement therapy is currently available for mucopolysaccharidosis types I, II and VI [3–5] and under clinical trials for other types, and gene therapy has been reported in animal models [6]. Additionally, changes in urinary glycosaminoglycans have been reported in many other diseases such as cancer [7], interstitial cystitis [8,9], renal lithiasis [10], diabetes mellitus [11], chronic glomerulonephritis [12], and chronic renal failure [13]. As a result, the determination of glycosaminoglycans in the urine is gradually gaining importance in the literature.

The main urinary glycosaminoglycans in normal humans [2] and also in some mammalian species including cat [9], rat [14], dog, and horses [15], are chondroitin sulfate, dermatan sulfate and heparan sulfate. Trace amounts of keratan sulfate [15] and hyaluronan [16] have also been detected by immunochemical methods.

Most of the quantitative data for urinary glycosaminoglycans are based on turbidity tests [17], spot tests [18], ELISA (for keratan sulfate) [15], tandem mass spectroscopy (for oligosaccharides) [19], and spectrophotometric reactions based on uronic acid-carbazole reactions [20], and blue dyes [21–23]. Dye binding assays with 1,9-dimethylmethylene blue (DMB) are the most frequently used in the literature, due to their simplicity. Although procedures to avoid the interference of other polyanions [24] and proteins [25] have appeared, the DMB assays do not consider the interference of other urinary components, such as urinary pigments and salts as phosphate, sulfate, pyrophosphate and citrate. Furthermore, these assays do not permit the identification of individual glycosaminoglycans.

We previously compared 4 different methods commonly used at that time for the analyses of glycosaminoglycans in human urine [10], and have shown that the results vary widely with the experimental procedure. Reliable data were obtained when urine samples were desalted by dialysis or gel permeation chromatography, concentrated, and the glycosaminoglycans were identified by agarose gel electrophoresis [26] and measured by densitometry. This method also gave reproducible results for rat urine [11,13]. More recently, we have shown that similar results were obtained when the glycosaminoglycans were isolated from urine samples by ion exchange chromatography and analyzed by agarose gel electrophoresis [14]. These procedures were applied to cat, dog, rat, and horse urine samples [9,14,15]. Although time-consuming and more laborious when compared to the dye binding assays, these methods avoid the interference of other urinary components and permit the identification and preparation of glycosaminoglycans for structural analysis.

Table 1
Urinary protein, creatinine and glycosaminoglycans

Species	*n*	Protein (mg/l)	Creatinine (g/l)	Glycosaminoglycans (mg/l)			Glycosaminoglycan/creatinine ratio ($\times 10^{-3}$)		
				CS+DS	HS	Total	CS+DS	HS	Total
Human	10	0.157±0.062	0.83±0.13	7.92±2.24	0.80±0.16	8.73±2.33	10.26±2.95	1,05±0.24	11.31±3.10
Horse	10	0.522±0.128	1.44±0.20	6.10±1.23	1.49±0.34	7.59±1.45	4.45±0.85	1.10±0.24	5.55±0.97
Dog	9	0.260±0.095	0.72±0.12	2.21±0.79	0.45±0.06	2.65±0.80	3.06±1.00	0.80±0.21	3.86±1.04
Ovine	5	0.152±0.021	0.50±0.13	2.59±0.67	0.12±0.01	2.71±0.68	6.95±3.17	0.32±0.09	7.26±3.26
Goat	10	0.102±0.008	0.31±0.06	5.00±2.27	0.23±0.08	5.23±2.34	16.72±7.82	0.76±0.27	17.48±8.08
Cat	8	0.378±0.077	1.84±0.52	7.64±2.07	0.27±0.03	7.91±2.07	7.44±2.26	0.30±0.09	7.74±2.28

Urinary glycosaminoglycans were extracted by ion exchange chromatography, submitted to agarose gel electrophoresis and quantified by densitometry of the agarose gel slabs. Protein and creatinine were measured as described in Methods. Data are mean±standard error, with three determinations for each sample.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Chondroitin 4-sulfate (from whale cartilage), chondroitin 6-sulfate (from shark cartilage), dermatan sulfate (from hog skin), and Sigma Diagnostic Creatinine Kit were from Sigma Chemical Co., Inc. (St. Louis, MO). Heparan sulfate (from bovine pancreas) [27], keratan sulfate (from bovine nucleus pulposus) [28], aggrecan (from bovine cartilage) [29], heparitinase II [30], and chondroitinases AC and B (from *Flavobacterium heparinum*) [31] were prepared by methods previously described. Agarose (standard, low M_r) was from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA). Q-Sepharose Fast Flow and disposable PD-10 desalting columns (Sephadex G-25 medium) were from Amersham Pharmacia Biotech do Brasil Ltda. (São Paulo, SP, Brazil). MST1 anti-keratan sulfate monoclonal antibody was obtained as previously described [32]. 1,9-Dimethylmethylene blue was from Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg, Germany. Spectra/Por® molecular porous membrane tubing (MWCO 6–8000) was from Spectrum Medical Industries, Inc. (Laguna Hills, CA).

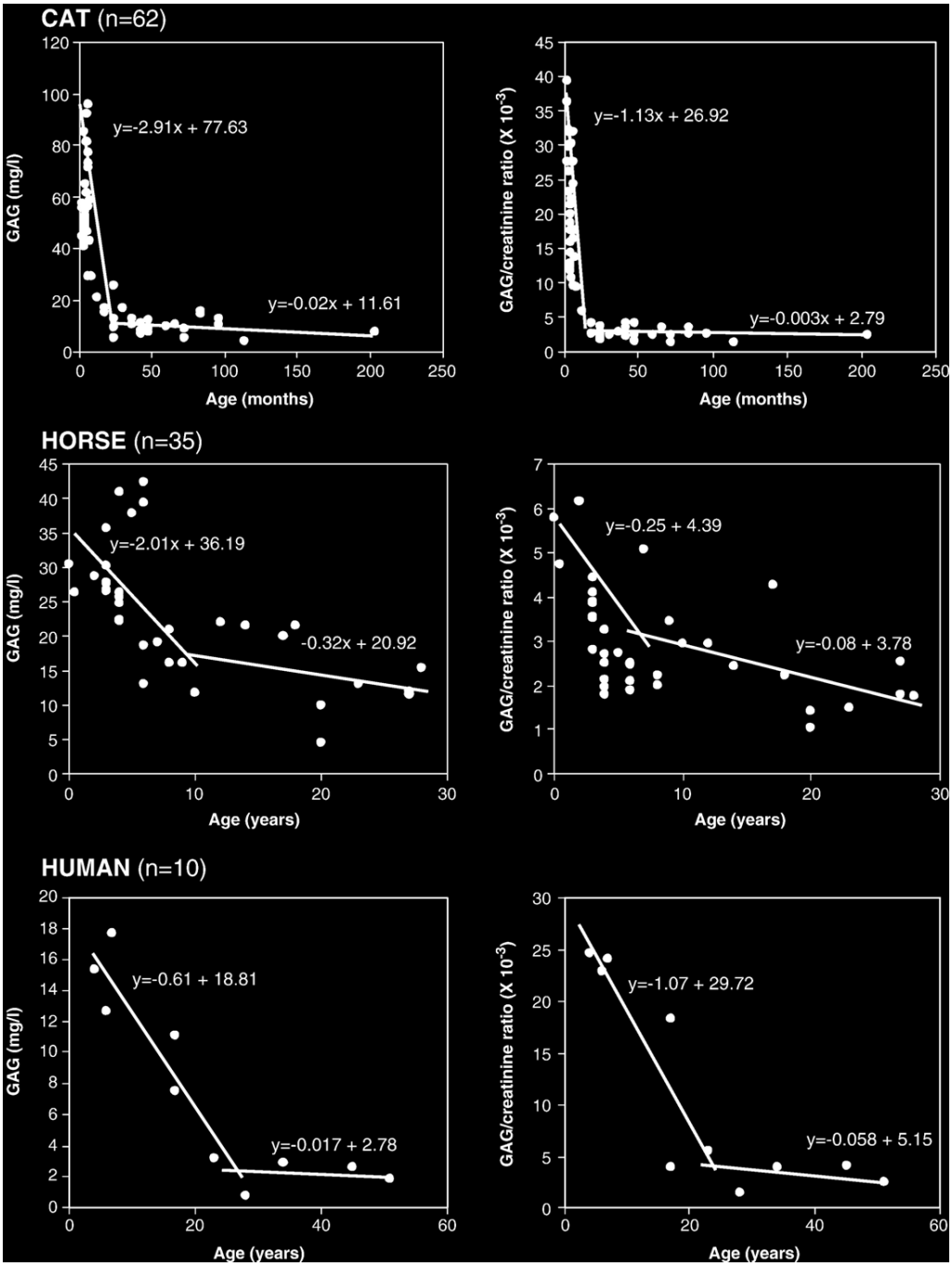


Fig. 2. Effect of age upon the urinary excretion of glycosaminoglycans by cats, horses and humans. The experiment was performed as described in Fig. 1, except that individual data for cats ($n=62$), horses ($n=35$), and humans ($n=10$) of different ages are presented. Glycosaminoglycans concentration (mg/l) and glycosaminoglycan/creatinine ratios were plotted as a function of the animal age (in months for cat, and years for horses and humans).

Table 2
Human urinary glycosaminoglycans measured by three different DMB procedures as compared to electrophoresis

	GAG concentration (mg/l)		GAG/creatinine ratio ($\times 10^{-3}$)	
	Range	Mean±SE	Range	Mean±SE
DMB				
Method 1	23.7–166.2	114.85±11.99	43.3–242.0	146.02±19.64
Method 2	37.1–95.5	76.43±5.71*	46.2–146.3	97.14±9.41*
Method 3	8.9–70.6	53.62±5.28*‡	16.3–109.3	71.08±9.16*‡
Electrophoresis	5.2–19.6	12.24±1.47	1.6–24.6	11.31±3.01

*Differences statistically significant ($p<0.001$) for Methods 2 and 3 in comparison to Method 1; ‡difference statistically significant ($p<0.001$) for Method 3 in comparison to Method 2.

2.2. Urine samples

Adult horse ($n=10$), dog ($n=10$), goat ($n=10$), and ovine ($n=5$) urine samples were collected and supplied by veterinarians of Hospital Veterinário, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Normal human urine ($n=10$) was collected at Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP, Brazil. Urine samples of horses ($n=35$) and cats ($n=62$) of different ages were also collected at FMVZ-USP. All urine samples (10–50 ml) were collected as a midstream catch during natural voiding or via urethral catheterization, and were stored at −20 °C until use. Creatinine, protein and glycosaminoglycans were measured.

For removal of low molecular weight components, urine samples (1 ml) were sealed in dialysis bags (Spectra/Por® membrane tubing, MWCO 6–8000) and submitted to equilibrium dialysis for 4 h against distilled water (3 exchanges, 2 l each), at 4 °C.

2.3. Urinary glycosaminoglycan extraction and analysis

Urinary glycosaminoglycans were extracted from the urine samples by ion-exchange chromatography on Q-Sepharose as previously described [15]. Briefly, the samples (10–50 ml) were diluted with 3 volumes of water, and then applied to the column (5 ml bed volume, 1×6.5 cm), previously equilibrated with water. The column was eluted in a stepwise fashion by 0.3 mol/l NaCl (20 ml), and 1 mol/l NaCl (7 ml). Three volumes of methanol were added to the fractions, slowly and under agitation. After standing for 24 h at −20 °C, the precipitate formed was collected by centrifugation, vacuum dried, resuspended in 200 µl of water, and aliquots (5 µl) were submitted to agarose gel electrophoresis in 0.05 mol/l 1,3-diaminopropane-acetate buffer, pH 9 (PDA) [26]. All glycosaminoglycans were found in the 1 mol/l-fraction [15].

The glycosaminoglycans were quantified by densitometry (Scanner CS-9000, Shimadzu) of the gel slabs after fixation with cetyltrimethylammonium bromide and Toluidine Blue staining. These compounds were further characterized by degradation with bacterial glycosaminoglycan lyases (chondroitinase AC, chondroitinase B and heparitinase II from *F. heparinum*), as previously described [9]. Briefly, aliquots of the glycosaminoglycans (50–100 µg) were incubated with $2–3\times10^{-4}$ units of either chondroitinase B, chondroitinase AC, heparitinase II, or a mixture of these enzymes, in 0.05 mol/l ethylenediamine-acetate buffer, pH 8.0, in a final volume of 20 µl. After 6 h incubation at the optimum temperature of each enzyme, aliquots of the incubation mixtures were submitted to agarose gel electrophoresis, as described above. The degradation products do not precipitate with cetyltrimethylammonium bromide, and disappear from the gel. To identify the degradation products, the incubation mixtures were spotted on Whatman No. 1 paper and chromatographed in isobutyric acid:1.25 mol/l NH_4OH (5:3, v/v) for 24 h. The products formed were visualized by silver nitrate staining of the paper chromatograms and quantified by densitometry.

Alternatively, urine samples (1 ml) were submitted to gel permeation chromatography on PD-10 desalting columns (Sephadex G-25), eluted with water. The fractions thus obtained (1 ml) were used for DMB assays (100 µl aliquots) and the remaining were freeze-dried in Speed Vac (VR-1 Heto Lab) and resuspended in 20 µl of water. Aliquots (5 µl) were analyzed by agarose gel electrophoresis as above described or applied to Whatman No. 1 paper and chromatographed in isobutyric acid:1.25 mol/l NH_4OH (5:3, v/v) for 5–6 h. The chromatograms were stained by either 0.1% Toluidine Blue or DMB, in 99.5% ethanol for detection of anions, as previously described [33] and the excess of dye was removed by 99.5% ethanol.

2.4. 1,9-Dimethylmethylene blue (DMB) assays

Three DMB assays were used: Method 1 — according to Farndale [24], Method 2 — according to de Jong [23], and Method 3 — according to the modified de Jong assay in Tris–base, pH 8.0 [25]. Method 1 [24] is a modification of a previously described method [22] to avoid the interference of other polyanions. In brief, the color reagent was prepared by dissolving 16 mg of DMB in a solution containing 3.04 g of glycine, 2.37 g of NaCl and 95 ml of 0.1 mol/l HCl (1 l, pH 3.0). Each urine sample (50 µl) was mixed to 1 ml of color reagent, and the absorbance was read immediately at 525 nm. For Method 2, the reagent contained 31 µmol (10.7 mg) of DMB in 55 mol/l formic acid, pH 3.3, per liter. Urine samples (60 µl) were mixed with 1 ml of reagent, and the absorbance was read immediately at 520 nm. Method 3 is a modification of the previous procedure (Method 2) to avoid interference of urinary proteins. To prepare the color reagent, 10 parts of the original reagent were mixed to 1 part of 2 mol/l Tris (base) solution. This mixture was prepared within 15 min. of performing the assay, which was as described for Method 2. The absorbances were read in a Spectronic 20 Genesis™ spectrophotometer.

2.5. Quantification of creatinine and protein

Creatinine and protein were quantified as previously described [9]. Creatinine was measured by the alkaline picrate method, using the Sigma Diagnostics Kit, adapted to micro-scale: urine samples were diluted (1:10) and

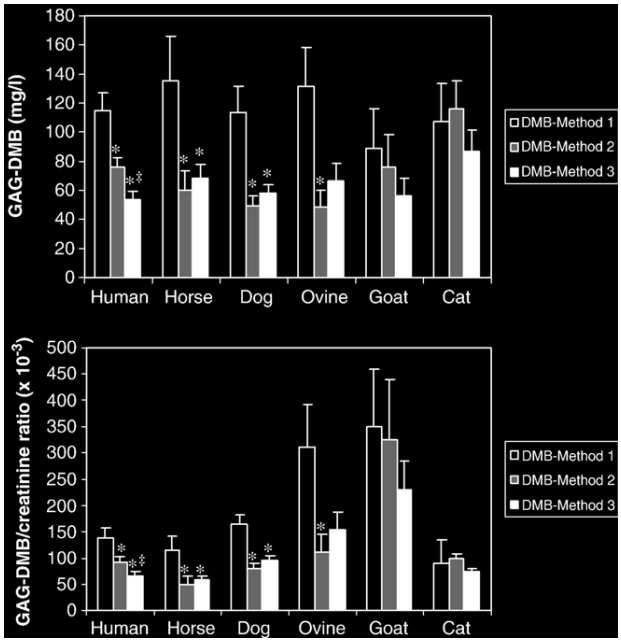


Fig. 3. Measurement of urinary glycosaminoglycans by three different DMB methods for different mammalian species. Aliquots of urine samples from humans ($n=10$), horses ($n=10$), dogs ($n=10$), ovines ($n=5$), goats ($n=10$), and cats ($n=8$) were submitted to DMB tests according to Farndale, [24] (Method 1), de Jong, [23] (Method 2), and modified de Jong [25] (Method 3). Data are mean±standard error of three determinations for each sample. *Differences statistically significant ($p<0.05$) for Methods 2 and 3, in comparison to Method 1; ‡differences statistically significant ($p<0.05$) for Method 3 in comparison to Method 2.

5 µl aliquots were mixed with 15 µl of water and 200 µl of the alkaline picrate solution in a 96-well plate. The absorbance was read at 490 nm in the Microplate Reader. Protein was measured by the Coomassie Blue Method according to Spector [34], also adapted to micro-scale: aliquots (3–10 µl) of urine and 200 µl of the Coomassie Blue reagent were added to a 96-well plate. The absorbance was read at 630 nm in a Microplate Reader (ELISA ELX-800 Universal, BioTek Instruments Inc.).

2.6. Statistical analysis

The test of Anderson–Darling revealed that the sample distributions were parametric. The Student's *T* test for paired groups was used to compare the mean difference in urinary glycosaminoglycans as measured by different methods, and also before and after dialysis of the urine sample.

3. Results

Fig. 1A shows a representative agarose gel electrophoresis of glycosaminoglycans extracted by ion exchange chromatography from the urine of different mammalian species (adults). The main band migrated as chondroitin sulfate for all the species, with smaller amounts of dermatan sulfate and heparan sulfate, but the relative proportions among these glycosaminoglycans varied among different species. To confirm the glycosaminoglycan identification, these compounds were submitted to the action of specific glycosaminoglycan lyases. The band migrating as chondroitin sulfate was totally degraded by chondroitinase AC, whereas the band migrating as dermatan sulfate was susceptible to the action of chondroitinase B. These glycosaminoglycans were resistant to heparitinase II, which degraded the band that migrated as heparan sulfate. Keratan sulfate, present in much lower concentrations (ng/l), was detected by immunoblotting of the agarose gel slabs (Fig. 1B).

Chondroitin sulfate, dermatan sulfate and heparan sulfate were quantified by densitometry of the agarose gel slabs. In a few cases, it was difficult to individually quantify dermatan sulfate because

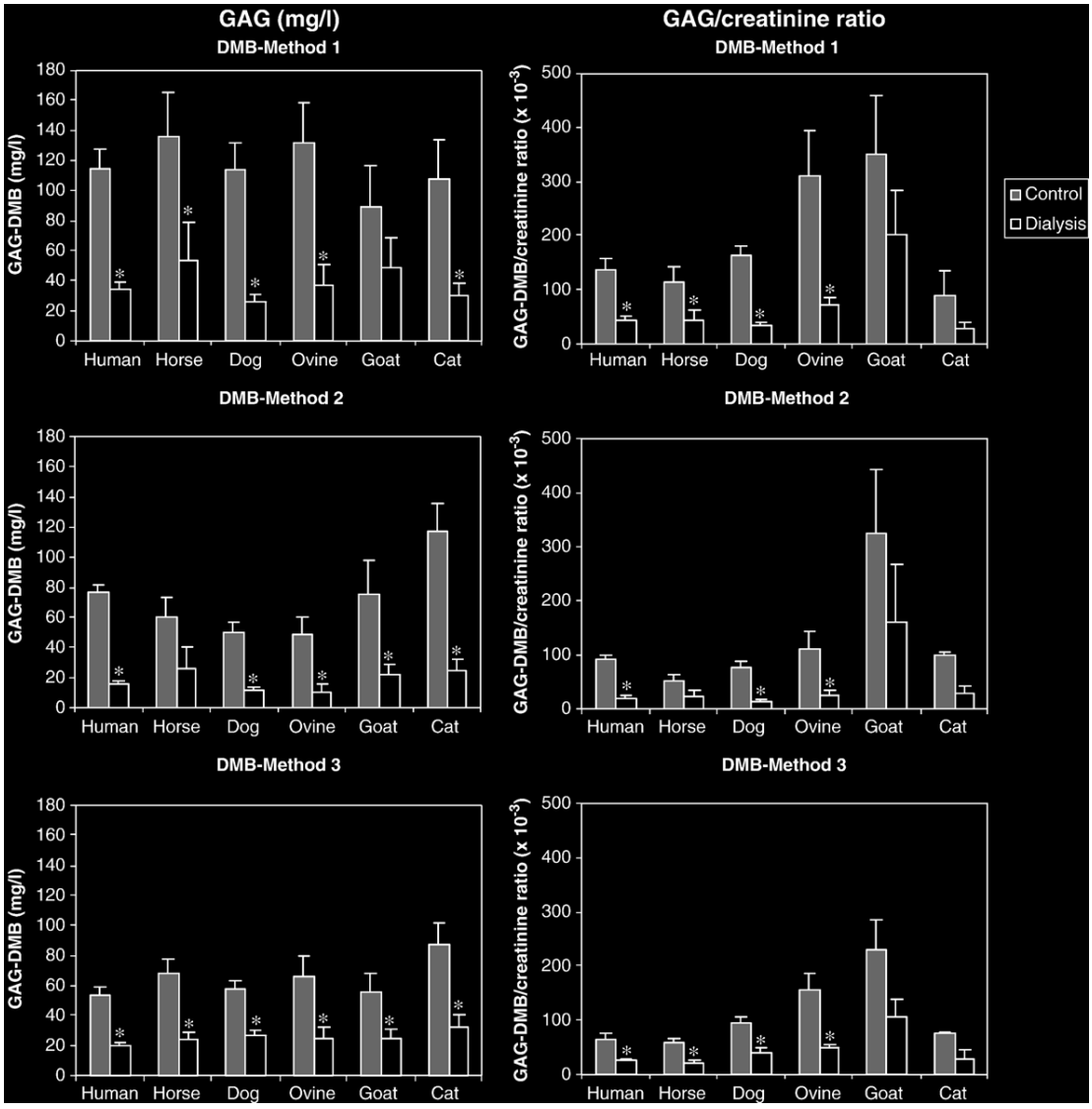


Fig. 4. Effect of dialysis upon the glycosaminoglycan quantification by DMB method. Urine samples were submitted to 4-h dialyses at 4 °C, and analyzed by 3 DMB methods. Control: non-dialyzed urine samples; Dialysis: dialyzed urine samples. *Differences statistically significant ($p < 0.001$), as compared to Control.

the urinary chondroitin sulfate and dermatan sulfate have low molecular weights, and a certain degree of diffusion occurs in the agarose gel. The much higher concentration of chondroitin sulfate gave some degree of overlapping. So, the galactosaminoglycans (chondroitin and dermatan sulfate) were quantified together. Table 1 shows the quantitative results, expressed both as concentration of urinary glycosaminoglycans (mg/l) and as glycosaminoglycan/creatinine ratio. The concentration of glycosaminoglycans in the urine was between 1 and 20 mg/l, and the glycosaminoglycan/creatinine ratio was 2 to 25×10^{-3}, for the different species. These results are in the same range of those obtained for urine samples that were desalted, concentrated and analyzed by agarose gel electrophoresis [9,10].

The variation in the urinary excretion of glycosaminoglycans among different animals of the same species could be due to the animal age. Fig. 2 shows that in humans, cats and horses, the urinary excretion of glycosaminoglycans decreases with age. Although children, kittens and foals excreted 2–10 times more glycosaminoglycans in the urine than their adult counterparts, with a higher proportion of chondroitin sulfate [9,15], the urinary concentration of glycosaminoglycans in normal mammalian never exceeded 100 mg/l (kittens), and the glycosaminoglycan/creatinine ratio was never superior to 40×10^{-3} (kittens).

In order to check for the recovery of the purification and quantification procedures, chondroitin sulfate (5 mg) was added

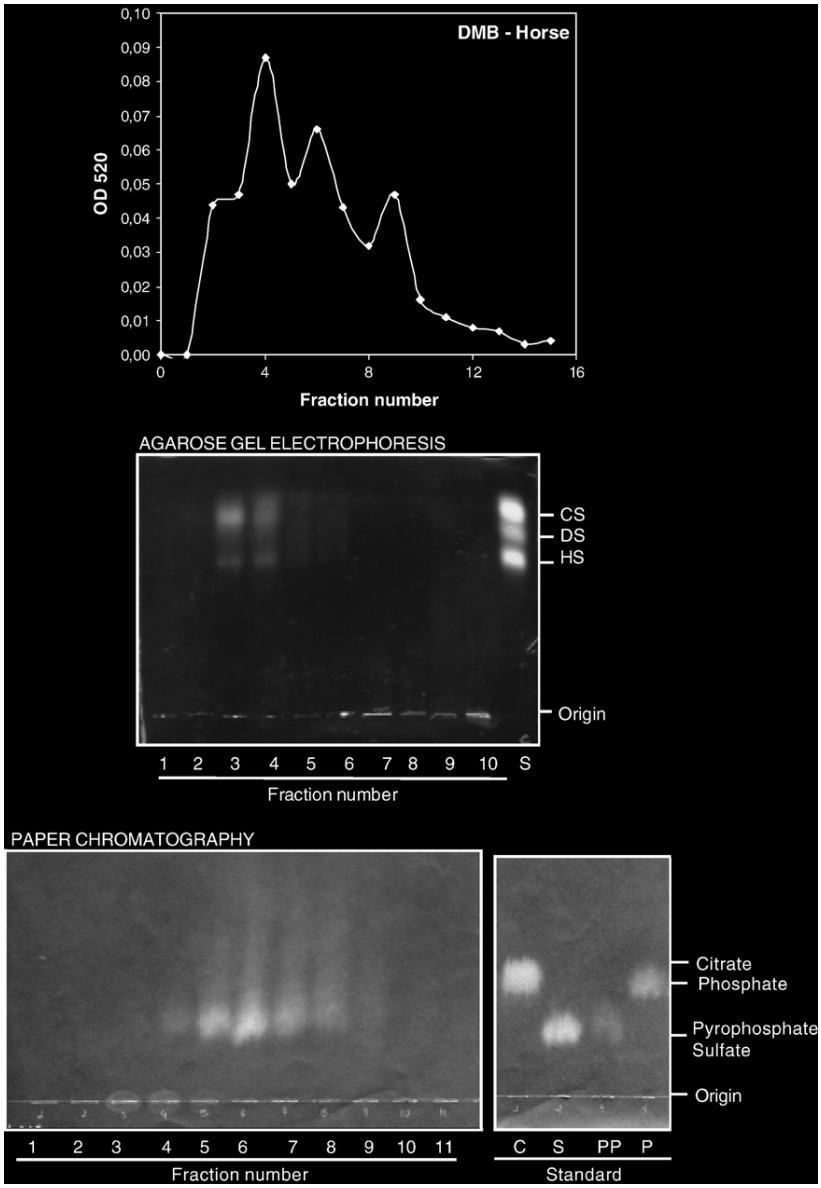


Fig. 5. Gel filtration chromatography of horse urine sample, analyzed by DMB assay, agarose gel electrophoresis and paper chromatography. Horse urine samples (1 ml) were submitted to gel filtration chromatography on Sephadex G-25 (PD-10 column), equilibrated and eluted with water. Fifteen 1 ml-fractions were collected. Aliquots (100 μl) were directly analyzed by DMB assay (Method 1). The remaining volume of each fraction was vacuum dried, resuspended in 20 μl of water, and aliquots (5 μl) were submitted to agarose gel electrophoresis (for glycosaminoglycan detection and identification), or to paper chromatography (for detection of inorganic anions).

to human and horse urine samples (50 ml each), which were submitted to Q-Sepharose ion exchange chromatography and agarose gel electrophoresis. The recovery was 95–98% of the chondroitin sulfate added to the urine.

The same urine samples were analyzed by dye binding assays with 1,9-dimethylmethylene blue (DMB), which gave much higher values for urinary glycosaminoglycans, both in humans and in other mammalian species. Table 2 show the results obtained for humans, using three different DMB methods. All of them gave high values for urinary glycosaminoglycans when compared to agarose gel electrophoresis, but Method 3, that should avoid the interference of urinary proteins, gave lower results than Methods 1 and 2. In contrast, Method 1, that should avoid interference of polyanions, gave very high values.

For other mammalian species (Fig. 3), again Method 1 gave higher values than Methods 2 and 3 (except for cats), but in contrast to humans, the results obtained with Method 3 were similar to (or even higher then) those obtained with Method 2.

Fig. 4 shows a dramatic decrease in DMB reaction after 4-h dialysis at 4 °C for all the mammalian species here studied. Figs. 5 and 6 show that salts, such as sulfate, phosphate, pyrophosphate, and citrate, could be responsible, at least in part, for this. Horse (Fig. 5) and human (Fig. 6) urine samples were

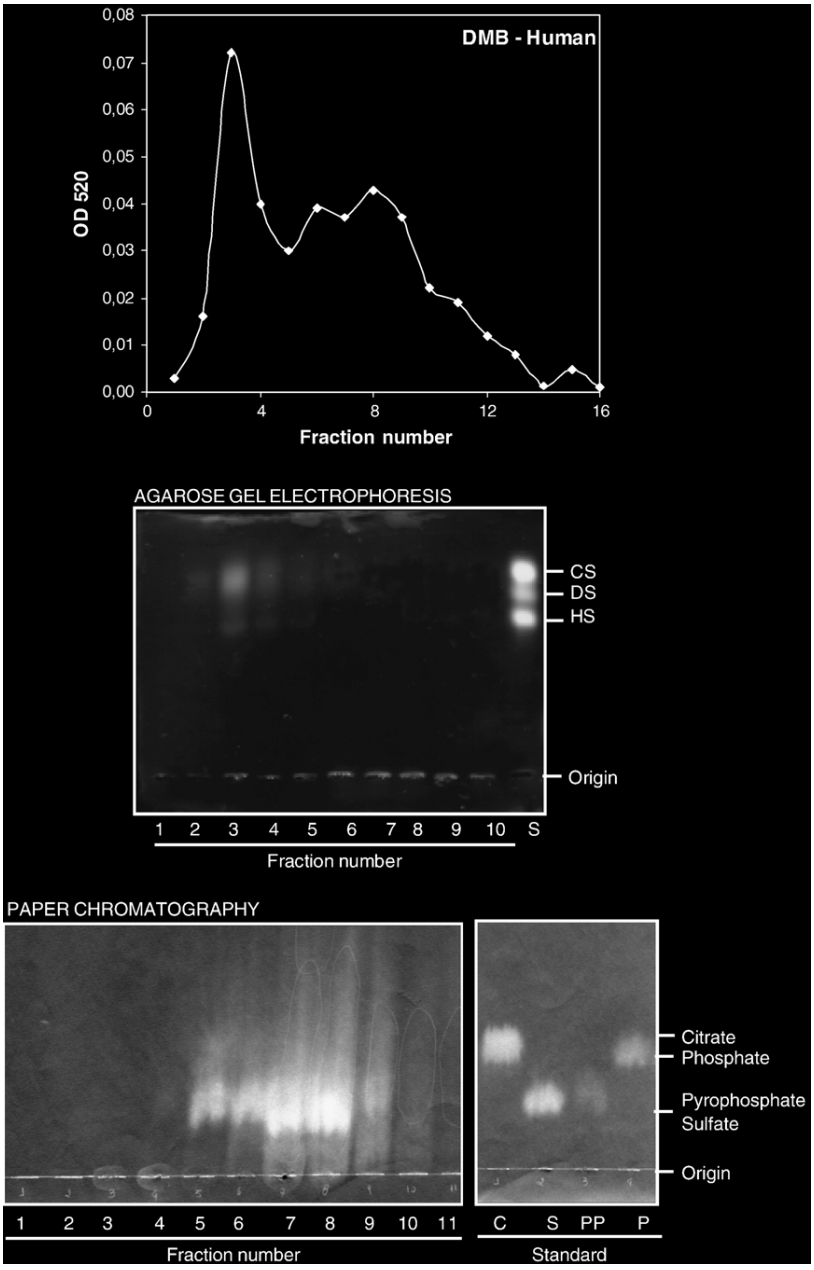


Fig. 6. Gel filtration chromatography of human urine sample, analyzed by DMB assay, agarose gel electrophoresis and paper chromatography. The experiment was performed as described in Fig. 5, except that human urine samples were used.

submitted to gel permeation chromatography on Sephadex G-25 (PD-10 column), and the fractions thus obtained were analyzed by DMB assay (Method 1), agarose gel electrophoresis for the identification of glycosaminoglycans, and paper chromatography, as described in Methods. Most of the glycosaminoglycans were recovered in fraction 3 for both horse and human urine. DMB also detected these compounds, but it also gave high peaks in fractions eluted latter on (fractions 4 to 9). Paper chromatography of these fractions revealed the presence of inorganic anions, most of them migrating as sulfate and pyrophosphate, with smaller amounts of citrate and phosphate.

4. Discussion

Normal human urine contains small amounts of glycosaminoglycans, and changes in urinary glycosaminoglycans have been recently reported in many diseases, such as renal lithiasis [10], interstitial cystitis [8], diabetes mellitus [11], and chronic renal failure [13]. Therefore, determination of glycosaminoglycans in the urine is gradually gaining importance in the literature.

Different methods have been used to measure and identify the urinary glycosaminoglycans. Quantitative results are frequently obtained by direct measurements based on turbidity with either cetylpyridinium chloride [35] or cetyltrimethylammonium bromide [36], colorimetric methods, such as complexation with Alcian Blue [37], dye binding assays with 1,9-dimethylmethylene blue (DMB) [22–25], or carbazole reaction for determination of uronic acid [20]. Carbazole reaction detects the uronic acid contained in glycosaminoglycan molecules, but interference of neutral sugars and other urinary components has been reported [10]. Furthermore, this method was abandoned for diagnosis of mucopolysaccharidosis because keratan sulfate does not contain uronic acid, and Morquio disease can be missed through this method. Keratan sulfate is usually measured by ELISA, since it is very antigenic and both monoclonal and polyclonal anti-keratan sulfate antibodies are available [32]. Turbidity tests have also been discredited because of their low sensitivity, even for detection of mucopolysaccharidoses [38]. Tandem mass spectroscopy has also been used for analysis of oligosaccharides [19], but this procedure depends on chemical derivatization of oligosaccharides and availability of expensive equipment. Isolation of glycosaminoglycans by ion exchange chromatography [39], or desalting and concentration [40] have also been frequently used.

We previously showed reliable results for human urine glycosaminoglycans when samples were desalted (4-h dialysis), concentrated, and analyzed by agarose gel electrophoresis [26]. The present study showed similar results were obtained by ion exchange chromatography followed by agarose gel electrophoresis of urinary glycosaminoglycans. Furthermore, keratan sulfate can also be detected by immunoblotting of the agarose gel slabs and detection with MST1 monoclonal antibody [9,15].

In contrast, higher values were obtained by the DMB methods here used and also by Alcian Blue method (based on formation of insoluble complexes [41]). This difference could be due either to loss of glycosaminoglycans during dialysis, gel permeation or ion exchange chromatography, or to interference of other urinary components.

High recovery (95–98%) was obtained for added chondroitin sulfate after dialysis or ion exchange chromatography. Furthermore, DMB reaction decreased to 50% or less after dialysis, indicating that low molecular weight components do interfere. Also, it was previously shown that the Alcian Blue complex is reduced in only 1/3 after degradation of urinary glycosaminoglycans with chondroitinase AC [42], which cleaves chondroitin sulfate, the main urinary glycosaminoglycans [43]. All these evidences suggest the interference of other urinary components.

Nader and Dietrich have shown that anions such as sulfate and phosphate could be detected by paper chromatography stained with Toluidine Blue [33]. We submitted urine samples to gel filtration chromatography in Sephadex G-25 (PD-10 desalting column), and analyzed the eluted fractions by DMB test, agarose gel electrophoresis (for glycosaminoglycans) and paper chromatography (for inorganic anions). DMB gave positive results for both the glycosaminoglycan- and inorganic anion-containing fractions.

The DMB procedure intended to avoid interference of other polyanions (Method 1, Ref. [24]) gave the highest results for all mammalian species, and the DMB method designed to avoid interference of proteins (Method 3, Ref. [25]) gave lower values for humans (suggesting that proteins might interfere), but not for other mammalian species, again indicating the interference of non-glycosaminoglycan urinary components.

Glycosaminoglycans are minor components in normal mammalian urine, and the quantification of these compounds in presence of other urinary components, present in much higher concentrations, such as pigments, salts, proteins and other polyanions, may be a problem. Nevertheless, for mucopolysaccharidosis, where the urinary concentration of glycosaminoglycan is 10–100 times increased, DMB dye-binding assays might be useful as screening tests and as a first approach, because of their rapidity and simplicity [38,44].

On the other hand, these quantitative methods do not permit the identification of individual glycosaminoglycans. This is usually achieved by either cellulose acetate or agarose gel [26] electrophoresis, associated with differential degradation with specific glycosaminoglycan lyases [13,45] and/or nitrous acid [39]. The procedure described in the present paper – isolation of urinary glycosaminoglycans and analysis by agarose gel electrophoresis, followed by densitometry – gives quantitative results and permits the identification of individual glycosaminoglycans. This identification was confirmed by degradation with specific *F. heparinum* glycosaminoglycan lyases (or mucopolysaccharidases) [9].

In conclusion, DMB dye-binding assays might be useful for quantification of urinary glycosaminoglycans in mucopolysaccharidoses, where their concentrations are 10–100 times increased in comparison to normal, but are unreliable for quantification of these macromolecules in normal individuals and in pathological conditions where the glycosaminoglycan

concentration is decreased in the urine, such as diabetes mellitus [11], chronic renal failure [13], and nephrolithiasis [10].

Acknowledgements

Research supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasília, DF, Brazil; Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasília, SP, Brazil; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), São Paulo, SP, Brazil; and Sociedade Paulista para o Desenvolvimento da Medicina (SPDM), São Paulo, SP, Brazil.

References

[1] Kjéllen L, Lindahl U. Proteoglycans: structure and interactions. Ann Rev Biochem 1991;60:443–75.
[2] Toma L, Dietrich CP, Nader HB. Differences in the nonreducing ends of heparan sulfates excreted by patients with mucopolysaccharidoses revealed by bacterial heparitinases: a new tool for structural studies and differential diagnosis of Sanfilippo's and Hunter's syndromes. Lab Invest 1996;75:771–81.
[3] Wraith JE, Clarke LA, Beck M, et al. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, multinational study of recombinant human alpha-L-iduronidase (Laronidase). J Pediatr 2004;144:581–8.
[4] Harmatz P, Giugliani R, Schwartz I, et al. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: a phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled, multinational study of recombinant human *N*-acetylgalactosamine 4-sulfatase (recombinant human arylsulfatase B or rhASB) and follow-on, open-label extension study. J Pediatr 2006;148:533–9.
[5] Muenzer J, Wraith JE, Beck M, et al. A phase II/III clinical study of enzyme replacement therapy with idursulfase in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). Genet Med 2006;8:465–73.
[6] Friso A, Tomanin R, Alba S, et al. Reduction of GAG storage in MPS II mouse model following implantation of encapsulated recombinant myoblasts. J Gene Med 2005;7:1482–91.
[7] Martins JRM, Gadelha MEC, Fonseca SM, et al. Patients with head and neck tumors excrete a chondroitin sulfate with a low degree of sulfation: a new tool for diagnosis and follow-up of cancer therapy. Otolaryngol Head Neck Surg 2000;122:115–8.
[8] Akçay T, Konokoglu D. Glycosaminoglycan excretion in interstitial cystitis. Int Urol Nephrol 1999;31:431–5.
[9] Pereira DA, Aguiar JAK, Hagiwara MK, Michelacci YM. Changes in cat urinary glycosaminoglycans with age and in feline urologic syndrome. Bba-Gen Subjects 2004;1672:1–11.
[10] Michelacci YM, Glashan RQ, Schor N. Urinary excretion of glycosaminoglycans in normal and stone forming subjects. Kidney Int 1989;36:1022–8.
[11] Cadaval RAM, Kohlman O, Michelacci YM. Urinary excretion of glycosaminoglycans and albumin in experimental diabetes mellitus. Glycobiology 2000;10:185–92.
[12] De Muro P, Faedda R, Satta A, et al. Urinary glycosaminoglycan composition in chronic glomerulonephritis. J Nephrol 2005;18:154–60.
[13] Michelacci YM, Cadaval RAM, Rovigatti RM, Kohlman O. Renal and urinary glycosaminoglycans in an experimental model of chronic renal failure in rats. Exp Nephrol 2001;9:40–8.
[14] de Lima CR, Aguiar JAK, Michelacci YM. Reduced urinary excretion of sulfated polysaccharides in diabetic rats. Bba-Mol Basis Dis 2005;1741:30–41.
[15] Vieira FAC, Baccarin RYA, Aguiar JAK, Michelacci YM. Urinary excretion of glycosaminoglycans in horses: changes with age, training and osteoarthritis. J Equine Vet Sci 2005;25:387–400.
[16] Martins JR, Furlanetto RP, Oliveira LM, et al. Comparison of practical methods for urinary glycosaminoglycans and serum hyaluronan with clinical activity scores in patients with Graves' ophthalmopathy. Clin Endocrinol (Oxf) 2004;60:726–33.
[17] Kleine TO, Henrich NC. Turbidimetric Alcian Blue test for the determination of glycosaminoglycan degradation products in human-urine. Fresenius Z Anal Chem 1985;320:720–1.
[18] Berry H. Screening for mucopolysaccharide disorders with the Berry spot test. Clin Biochem 1987;20:365–71.
[19] Crawley A, Ramsay SL, Byers S, Hopwood JJ, Meikle PJ. Monitoring dose response of enzyme replacement therapy in feline mucopolysaccharidosis type VI by tandem mass spectrometry. Pediatr Res 2004;55:585–91.
[20] Di Ferrante NM. The measurement of urinary mucopolysaccharides. Anal Biochem 1967;21:98–106.
[21] Whiteman P. Quantitative-determination of glycosaminoglycans in urine with Alcian Blue 8gx. Biochem J 1973;131:351–7.
[22] Farndale RW, Sayers CA, Barrett AJ. A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures. Connect Tissue Res 1982;9:247–8.
[23] de Jong JGN, Wevers RA, Laarakkers C, Poorthuis BJHM. Dimethylmethylene Blue-based spectrophotometry of glycosaminoglycans in untreated urine — a rapid screening-procedure for mucopolysaccharidoses. Clin Chem 1989;35:1472–7.
[24] Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ. Improved quantitation and discrimination of sulfated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. Biochim Biophys Acta 1986;883:173–7.
[25] de Jong JGN, Wevers RA, Liebrandvansambeek R. Measuring urinary glycosaminoglycans in the presence of protein — an improved screening-procedure for mucopolysaccharidoses based on dimethylmethylene blue. Clin Chem 1992;38:803–7.
[26] Dietrich CP, Mcduffie NM, Sampaio LO. Identification of acidic mucopolysaccharides by agarose-gel electrophoresis. J Chromatogr 1977;130:299–304.
[27] Dietrich CP, Nader HB. Fractionation and properties of four heparitin sulfates from beef lung tissue. Isolation and partial characterization of a homogeneous species of heparitin sulfate. Biochim Biophys Acta 1974;343:34–44.
[28] Soriano ES, Campos MSQ, Aguiar JAK, Michelacci YM. Effect of epithelial debridement on human cornea proteoglycans. Braz J Med Biol Res 2001;34:325–31.
[29] Michelacci YM, Horton DSPQ. Proteoglycans from the cartilage of young hammerhead shark *Sphyrna lewini*. Comp Biochem Physiol B 1989;92:651–8.
[30] Nader HB, Porcionatto MA, Tersariol IL, et al. Purification and substrate specificity of heparitinase I and heparitinase II from *Flavobacterium heparinum*. Analyses of the heparin and heparan sulfate degradation products by 13C NMR spectroscopy. J Biol Chem 1990;265:16807–13.
[31] Aguiar JAK, Lima CR, Berto AGA, Michelacci YM. An improved methodology to produce *Flavobacterium heparinum* chondroitinases, important instruments for diagnosis of diseases. Biotechnol Appl Bioc 2003;37:115–27.
[32] Alves MLM, Straus AH, Takahashi HK, Michelacci YM. Production and characterization of monoclonal-antibodies to shark cartilage proteoglycan. Braz J Med Biol Res 1994;27:2103–8.
[33] Nader HB, Dietrich CP. Determination of sulfate after chromatography and Toluidine Blue complex-formation. Anal Biochem 1977;78:112–8.
[34] Spector T. Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation. A simple and linear spectrophotometric assay for less than or equal to 0.5 to 50 microgram of protein. Anal Biochem 1978;86:142–6.
[35] Dial SM, Byrne T, Haskins M, et al. Urine glycosaminoglycan concentrations in mucopolysaccharidosis VI-affected cats following bone marrow transplantation or leukocyte infusion. Clin Chim Acta 1997;263:1–14.
[36] Sarica K, Türkölmez K, Soygür T, et al. Evaluation of urinary glycosaminoglycan excretion in patients with renal cell carcinoma. Eur Urol 1997;31:54–7.
[37] Uehling DT, Kelley E, Hopkins WJ, Balish E. Urinary glycosaminoglycan levels following induced cystitis in monkeys. J Urol 1988;139:1103–5.
[38] Mabe P, Valiente A, Soto V, Cornejo V, Raimann E. Evaluation of reliability for urine mucopolysaccharidosis screening by dimethylmethylene blue and Berry spot tests. Clin Chim Acta 2004;345:135–40.
[39] Byers S, Rozaklis T, Brumfield LK, Ranieri E, Hopwood JJ. Glycosaminoglycan accumulation and excretion in the mucopolysaccharidoses: characterization and basis of a diagnostic test for MPS. Mol Genet Metab 1998;65:282–90.

[40] Hurst RE, Settine JM, Lorincz AE. A method for the quantitative determination of urinary glycosaminoglycans. Clin Chim Acta 1976;70:427–32.
[41] Fellstrom B, Danielson BG, Lind E, Ljunghall S, Wikstrom B. Enzymatic determination of urinary chondroitin sulfate — applications in renal stone disease and acromegaly. Eur J Clin Invest 1986;16:292–6.
[42] Fellstrom B, Danielson BG, Ljunghall S, Wikstrom B. Crystal inhibition—the effects of polyanions on calcium-oxalate crystal-growth. Clin Chim Acta 1986;158:229–35.
[43] Dietrich CP, Nader HB, Mourao PAS. Differentiation of Hunters and Hurlers syndromes by analysis of excreted mucopolysaccharides. Biochem Med Metab Biol 1973;8:371–9.
[44] de Jong JGN, Heijs WMJ, Wevers RA. Mucopolysaccharidoses screening — dimethylmethylene blue versus Alcian Blue. Ann Clin Biochem 1994;31:267–71.
[45] Michelacci YM, Dietrich CP. Comparative study between a chondroitinase B and a chondroitinase AC from *Flavobacterium heparinum* — isolation of a chondroitinase AC-susceptible dodecasaccharide from chondroitin sulfate B. Biochem J 1975;151:121–9.

ANEXOS

PROTOCOLO 1

NOME:_____

RH:_____ RAÇA:_____MENARCA_____anos IDADE:___anos

DUM:__/__/___DIA DO CICLO:____dia PROGESTERONA:_____ng/ml

G----P----A----C---- IDADE 1°PARTO_____

AMAMENTAÇÃO □ NÃO AMAMENTOU □ AMAMENTOU _____n° meses

AF: CÂNCER DE MAMA □ AUSENTE □ PRESENTE

AP: TABAGISTMO □ NÃO □ SIM _____N° MAÇOS/ANO

IMC (P/E^2)_____(peso em kg/ estatura em m)

FIBROADENOMA

NÚMERO:_____

LOCALIZAÇÃO:_____

TAMANHO (cm): _____

USG: TAMANHO: _____X_____X_____cm VOLUME: _____cm^3

PAAF: □ NEGATIVA □ SUGESTIVA FA

□ INSATISFATÓRIA □ SUSPEITA □ POSITIVA

ANEXO 2

CARTA DE INFORMAÇÃO

AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES QUANTITATIVAS E QUALITATIVAS DE PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS EM TECIDO MAMÁRIO HUMANO E FIBROADENOMA NAS FASES FOLICULAR E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL

Esta pesquisa tem como objetivo estudar as alterações quantitativas e qualitativas de proteoglicanos e glicosaminoglicanos em tecido mamário e fibroadenoma nas diferentes fases do ciclo menstrual. Para tanto, as mulheres com diagnóstico prévio de fibroadenomas mamários e não usuárias de anticoncepcionais hormonais poderão ser incluídas nesta pesquisa. A cirurgia de retirada do nódulo somente será realizada se houver necessidade.

A cirurgia será marcada de acordo com a fase do ciclo menstrual e será realizada após preenchimento de um protocolo (ver anexo1) a nível ambulatorial na casa da mama pertencente ao setor da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP.

Será coletado na mesmo dia uma amostra de sangue para dosagens hormonais. O retorno será de sete a dez dias para retirada de pontos.

Os riscos para a paciente participante do estudo serão os riscos do ato cirúrgico, ou seja, hematoma no local e infecção da ferida operatória, enquanto que o benefício será a da retirada do nódulo mamário e sua confirmação histopatológica.

O trabalho será realizado no setor de Mastologia e de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP. A cirurgia será realizada

sob responsabilidade do Dr. José Arimatéa dos Santos Júnior e do Prof. Dr. Afonso Celso Pinto Nazário, que em qualquer etapa do estudo poderão ser encontrados na Casa da Mama da disciplina de Ginecologia, localizada na Rua Botucatu, 527 – Vila Clementino, tel: 11-5576-4618. Os estudos bioquímicos serão desenvolvidos no Dpto. Bioquímica – disciplina de Biologia Molecular sob responsabilidade da aluna de pós-graduação Cilene Rebouças de Lima e orientadora Prof^{a}. Dr^{a}. Yara M. Michelacci. Se você tiver alguma dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o comitê de ética em pesquisa (CEP).

É garantida a liberdade de retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade do tratamento na instituição.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. Você terá direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais, quando em estudos abertos ou de resultados que sejam de conhecimento dos pesquisadores.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

ANEXO 3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO:

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Avaliação das alterações quantitativas e qualitativas de proteoglicanos e glicosaminoglicanos em tecido mamário humano e fibroadenoma nas fases folicular e lútea do ciclo menstrual”.

Eu discuti com o Dr. José Arimatéa dos Santos Júnior sobre a minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

_____ _____/_____/_____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o consentimento livre e esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

_____ _____/_____/_____

OBS: numeração dos casos conforme Tabela 6 (pg 73).

TABELA 1 – VALORES INDIVIDUAIS DO RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NA FASE PROLIFERATIVA DO CICLO MENSTRUAL.

CASOS	TECIDO MAMÁRIO NORMAL		FIBROADENOMA	
	PG	GAG	PG	GAG
	(%)	(%)	(%)	(%)
27	95,94	4,06	88,98	11,02
23	96,90	3,10	94,54	5,46
22	95,43	4,57	97,02	2,98
11	93,30	6,70	95,73	4,27
19	97,83	2,17	79,37	20,63
13	95,98	4,02	93,99	6,01
MÉDIA	**95,90**	**4,10**	**91,60**	**8,40**

TABELA 2 – VALORES INDIVIDUAIS DO RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NA FASE LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL.

CASOS	TECIDO MAMÁRIO NORMAL		FIBROADENOMA	
	PG	GAG	PG	GAG
	(%)	(%)	(%)	(%)
14	86,18	13,82	98,19	1,81
20	97,80	2,20	96,35	3,65
21	97,26	2,74	96,38	3,62
12	92,68	7,32	78,02	21,98
28	89,75	10,25	97,20	2,80
26	93,95	6,05	90,20	9,80
MÉDIA	**92,94**	**7,06**	**92,72**	**7,28**

TABELA 3 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES DE PROTEOGLICANOS EM µG/G DE TECIDO SECO DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN	F		MN	F
	(µg/g tecido seco)	(µg/g tecido seco)		(µg/g tecido seco)	(µg/g tecido seco)
11	22,05	64,99	12	37,30	68,36
27	21,02	32,11	28	44,03	56,12
13	27,69	36,40	14	36,91	39,97
23	26,70	167,99	26	42,05	50,18
22	42,87	114,07	20	42,11	66,27
19	22,81	54,91	21	59,39	92,38
MÉDIA	**27,19**	**78,41**	**MÉDIA**	**43,63**	**62,21**
EP	**3,63**	**23,61**	**EP**	**3,68**	**8,10**

TABELA 4 – VALORES INDIVIDUAIS DA RAZÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE PROTEOGLICANOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA F/MN	CASOS	FASE LÚTEA F/MN
	(µg/g tecido seco)		(µg/g tecido seco)
11	2,95	12	1,83
27	1,53	28	1,27
13	1,31	14	1,08
23	6,29	26	1,19
22	2,66	20	1,57
19	2,41	21	1,56
MÉDIA	**2,88**	**MÉDIA**	**1,43**

TABELA 5 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES DE GLICOSAMINOGLICANOS (EXTRAÍDOS DE TECIDO RESIDUAL) EM µG/G DE TECIDO SECO DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN	F		MN	F
	(µg/g tecido seco)	(µg/g tecido seco)		(µg/g tecido seco)	(µg/g tecido seco)
11	1,58	2,90	12	2,94	19,26
27	0,89	3,98	28	5,03	1,62
13	1,16	2,33	14	5,92	0,74
23	0,85	9,70	26	2,71	5,45
22	2,05	3,50	20	0,95	2,51
19	0,51	14,27	21	1,67	3,47
MÉDIA	**1,17**	**6,11**	**MÉDIA**	**3,20**	**5,51**
EP	**0,25**	**2,15**	**EP**	**0,86**	**3,10**

TABELA 6 – VALORES INDIVIDUAIS DA CONCENTRAÇÃO DE DERMATAM SULFATO RICO EM ÁCIDO β-D-GLUCURÔNICO EM µG/G DE TECIDO SECO LIBERADOS POR PROTEÓLISE DOS PROTEOGLICANOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL.

DERMATAM SULFATO (β-D-GLUCURÔNICO)					
CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN	F		MN	F
	(µg/g tecido seco)	(µg/g tecido seco)		(µg/g tecido seco)	(µg/g tecido seco)
11	0,00	3,00	12	0,00	11,03
27	0,00	1,89	28	0,00	6,72
13	0,00	3,00	14	0,00	1,75
23	0,00	4,76	26	0,00	8,14
22	0,00	3,84	20	0,00	6,06
19	0,00	1,84	21	0,00	6,92
MÉDIA	**0,00**	**3,05**	**MÉDIA**	**0,00**	**6,77**
EP	**0,00**	**0,51**	**EP**	**0,00**	**1,35**

TABELA 7 – VALORES INDIVIDUAIS DA CONCENTRAÇÃO DE DERMATAM SULFATO RICO EM ÁCIDO α-L-IDURÔNICO EM µG/G DE TECIDO SECO LIBERADOS POR PROTEÓLISE DOS PROTEOGLICANOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL.

DERMATAM SULFATO (α-L-IDURÔNICO)					
CASOS	**FASE PROLIFERATIVA**		**CASOS**	**FASE LÚTEA**	
	MN	**F**		**MN**	**F**
	(µg/g tecido seco)	**(µg/g tecido seco)**		**(µg/g tecido seco)**	**(µg/g tecido seco)**
11	9,04	12,84	12	9,94	22,12
27	8,39	12,39	28	14,10	16,15
13	8,57	15,39	14	7,46	14,83
23	6,73	42,70	26	12,44	11,25
22	9,51	33,96	20	12,00	10,54
19	6,62	23,92	21	8,87	14,75
MÉDIA	**8,14**	**23,53**	**MÉDIA**	**10,80**	**14,94**
EP	**0,54**	**5,59**	**EP**	**1,11**	**1,85**

TABELA 8 – VALORES INDIVIDUAIS DA RAZÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE DERMATAM SUFALTO RICO EM ÁCIDO α-L-IDURÔNICO LIBERADOS POR PROTEÓLISE DOS PROTEOGLICANOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL.

DERMATAM SULFATO (α-L-IDURÔNICO)			
CASOS	**FASE PROLIFERATIVA**	**CASOS**	**FASE LÚTEA**
	F/MN		**F/MN**
	(µg/g tecido seco)		**(µg/g tecido seco)**
11	1,42	12	2,22
27	1,48	28	1,15
13	1,80	14	1,99
23	6,34	26	0,91
22	3,57	20	0,88
19	3,61	21	1,66
MÉDIA	**2,89**	**MÉDIA**	**1,38**

TABELA 9 – VALORES INDIVIDUAIS DA CONCENTRAÇÃO DE HEPARAM SULFATO EM µG/G DE TECIDO SECO LIBERADOS POR PROTEÓLISE DOS PROTEOGLICANOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL.

HEPARAM SULFATO					
CASOS	**FASE PROLIFERATIVA**		**CASOS**	**FASE LÚTEA**	
	MN	**F**		**MN**	**F**
	(µg/g tecido seco)	**(µg/g tecido seco)**		**(µg/g tecido seco)**	**(µg/g tecido seco)**
11	15,96	48,07	12	28,32	21,64
27	15,11	19,05	28	31,84	34,91
13	21,11	16,13	14	27,08	25,27
23	15,21	113,54	26	30,09	28,37
22	33,00	70,58	20	29,02	44,71
19	16,05	25,40	21	42,99	65,36
MÉDIA	**19,41**	**48,80**	**MÉDIA**	**31,56**	**36,71**
EP	**3,14**	**16,93**	**EP**	**2,61**	**7,25**

TABELA 10 – VALORES INDIVIDUAIS DA RAZÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE HEPARAM SULFATO LIBERADOS POR PROTEÓLISE DOS PROTEOGLICANOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL.

HEPARAM SULFATO			
CASOS	**FASE PROLIFERATIVA**	**CASOS**	**FASE LÚTEA**
	F/MN		**F/MN**
	(µg/g tecido seco)		**(µg/g tecido seco)**
11	3,01	12	0,76
27	1,26	28	1,10
13	0,76	14	0,93
23	7,46	26	0,94
22	2,14	20	1,54
19	1,58	21	1,52
MÉDIA	**2,51**	**MÉDIA**	**1,16**

TABELA 11 – VALORES INDIVIDUAIS DA CONCENTRAÇÃO DE GALACTOSAMINOGLICANOS EM µG/G DE TECIDO SECO LIBERADOS POR PROTEÓLISE DOS PROTEOGLICANOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL.

GALACTOSAMINOGLICANOS					
CASOS	**FASE PROLIFERATIVA**		**CASOS**	**FASE LÚTEA**	
	MN	**F**		**MN**	**F**
	(µg/g tecido seco)	**(µg/g tecido seco)**		**(µg/g tecido seco)**	**(µg/g tecido seco)**
11	9,04	15,84	12	9,94	33,15
27	8,39	14,28	28	14,10	22,87
13	8,57	18,39	14	7,46	16,58
23	6,73	47,46	26	12,44	19,39
22	9,51	37,80	20	12,00	16,60
19	6,62	25,75	21	8,87	21,67
MÉDIA	**8,14**	**26,59**	**MÉDIA**	**10,80**	**21,71**
EP	**0,50**	**5,99**	**EP**	**1,09**	**2,76**

TABELA 12 – VALORES INDIVIDUAIS DA CONCENTRAÇÃO DE GALACTOSAMINOGLICANOS EM % LIBERADOS POR PROTEÓLISE DOS PROTEOGLICANOS EXTRAÍDOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL.

GALACTOSAMINOGLICANOS					
CASOS	**FASE PROLIFERATIVA**		**CASOS**	**FASE LÚTEA**	
	MN	**F**		**MN**	**F**
	(%)	**(%)**		**(%)**	**(%)**
11	36,16	24,78	12	25,99	60,51
27	35,71	42,85	28	30,68	39,58
13	28,88	53,28	14	21,59	39,62
23	30,68	29,48	26	29,24	40,60
22	22,37	34,88	20	29,26	27,08
19	29,19	50,35	21	17,11	24,90
MÉDIA	**29,56**	**35,27**	**MÉDIA**	**25,50**	**37,16**

TABELA 13 – VALORES INDIVIDUAIS DA CONCENTRAÇÃO DE DERMATAM SULFATO RICO EM ÁCIDO β-D-GLUCURÔNICO EM % LIBERADOS POR PROTEÓLISE DOS PROTEOGLICANOS EXTRAÍDOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL.

DERMATAM SULFATO (β-D-GLUCURÔNICO)					
CASOS	**FASE PROLIFERATIVA**		**CASOS**	**FASE LÚTEA**	
	MN	**F**		**MN**	**F**
	(%)	**(%)**		**(%)**	**(%)**
11	0,00	4,69	12	0,00	20,13
27	0,00	5,67	28	0,00	11,63
13	0,00	8,69	14	0,00	4,18
23	0,00	2,96	26	0,00	17,04
22	0,00	3,55	20	0,00	9,88
19	0,00	3,59	21	0,00	7,95
MÉDIA	**0,00**	**4,05**	**MÉDIA**	**0,00**	**11,59**

TABELA 14 – VALORES INDIVIDUAIS DA CONCENTRAÇÃO DE DERMATAM SULFATO RICO EM ÁCIDO α-L-IDURÔNICO EM % LIBERADOS POR PROTEÓLISE DOS PROTEOGLICANOS EXTRAÍDOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL.

DERMATAM SULFATO (α-L-IDURÔNICO)					
CASOS	**FASE PROLIFERATIVA**		**CASOS**	**FASE LÚTEA**	
	MN	**F**		**MN**	**F**
	(%)	**(%)**		**(%)**	**(%)**
11	36,16	20,10	12	25,99	40,38
27	35,71	37,17	28	30,68	27,94
13	28,88	44,60	14	21,59	35,45
23	30,68	26,52	26	29,24	23,56
22	22,37	31,33	20	29,26	17,19
19	29,19	46,76	21	17,11	16,95
MÉDIA	**29,56**	**31,22**	**MÉDIA**	**25,50**	**25,58**

TABELA 15 – VALORES INDIVIDUAIS DA CONCENTRAÇÃO DE HEPARAM SULFATO EM % LIBERADOS POR PROTEÓLISE DOS PROTEOGLICANOS EXTRAÍDOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL.

HEPARAM SULFATO					
CASOS	**FASE PROLIFERATIVA**		**CASOS**	**FASE LÚTEA**	
	MN	**F**		**MN**	**F**
	(%)	**(%)**		**(%)**	**(%)**
11	63,84	75,22	12	74,01	39,49
27	64,29	57,15	28	69,32	60,42
13	71,12	46,72	14	78,41	60,38
23	69,32	70,52	26	70,76	59,40
22	77,63	65,12	20	70,74	72,92
19	70,81	49,65	21	82,89	75,10
MÉDIA	70,44	64,73	**MÉDIA**	74,50	62,84

TABELA 16 – VALORES INDIVIDUAIS DA INCORPORAÇÃO TOTAL DE ^{35}S-SULFATO (MEIO+PG+GAG) EM FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM CPM/MG DE TECIDO ÚMIDO.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN (cpm/mg tecido úmido)	F (cpm/mg tecido úmido)		MN (cpm/mg tecido úmido)	F (cpm/mg tecido úmido)
4	485,40	964,21	1	558,60	478,24
5	315,68	1859,49	2	370,35	1322,57
6	491,13	7448,14	3	440,26	1727,93
9	507,81	647,88	7	618,02	969,56
10	151,21	495,40	8	432,62	1071,75
11	390,85	234,73	12	212,40	1048,61
13	213,15	701,86	17	708,88	2740,93
15	296,22	1615,97	14	278,81	1634,57
16	404,53	1525,46	20	541,98	1016,02
18	344,10	2168,89	21	1764,28	4357,25
19	944,57	1768,56	24	236,01	700,35
22	227,41	1878,13			
23	424,83	1515,25			
25	523,59	1633,89			
MÉDIA	**408,61**	**1746,99**	**MÉDIA**	**560,20**	**1551,61**
EP	**53,64**	**484,13**	**EP**	**135,92**	**351,60**

TABELA 17 – VALORES INDIVIDUAIS DA RAZÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO TOTAL DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS SINTETIZADOS ((MEIO+PG+GAG) NO FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA F/MN	CASOS	FASE LÚTEA F/MN
	(cpm/mg tecido úmido)		(cpm/mg tecido úmido)
4	1,99	1	0,86
5	5,89	2	3,57
6	15,17	3	3,92
9	1,28	7	1,57
10	3,28	8	2,48
11	0,60	12	4,94
13	3,29	17	3,87
15	5,46	14	5,86
16	3,77	20	1,87
18	6,30	21	2,47
19	1,87	24	2,97
22	8,26		
23	3,57		
25	3,12		
MÉDIA	**4,28**	**MÉDIA**	**2,77**

TABELA 18 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES TOTAIS DE ^{35}S-DERMATAM SULFATO RICO EM ÁCIDO β-D-GLUCURÔNICO (MEIO+PG+GAG) DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM CPM/MG DE TECIDO ÚMIDO.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN (cpm/mg tecido úmido)	F (cpm/mg tecido úmido)		MN (cpm/mg tecido úmido)	F (cpm/mg tecido úmido)
4	225,26	525,11	1	264,04	283,56
5	145,41	1080,93	2	180,30	849,00
6	228,39	4416,30	3	231,50	1039,06
9	267,88	416,28	7	308,85	590,64
10	69,38	314,13	8	200,19	636,67
11	189,17	122,96	12	91,07	605,92
13	104,46	442,01	17	357,23	1808,31
15	127,99	974,67	14	113,97	1020,84
16	160,69	807,95	20	232,27	614,82
18	170,13	1238,97	21	943,04	2473,35
19	473,08	1005,63	24	94,60	382,46
22	91,41	1137,02			
23	185,25	868,02			
25	204,99	940,24			
MÉDIA	**188,82**	**1020,73**	**MÉDIA**	**274,28**	**936,78**
EP	**27,50**	**287,03**	**EP**	**75,16**	**207,43**

TABELA 19 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES TOTAIS DE ^{35}S-DERMATAM SULFATO RICO EM ÁCIDO α-L-IDURÔNICO (MEIO+PG+GAG) DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM CPM/MG DE TECIDO ÚMIDO.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN (cpm/mg tecido úmido)	F (cpm/mg tecido úmido)		MN (cpm/mg tecido úmido)	F (cpm/mg tecido úmido)
4	113,17	150,35	1	144,39	76,59
5	84,35	364,98	2	92,35	209,48
6	137,80	1584,37	3	99,18	326,05
9	96,11	90,71	7	135,50	191,42
10	34,38	75,20	8	95,75	173,54
11	88,05	40,48	12	51,34	168,29
13	54,39	88,20	17	162,77	416,04
15	80,98	310,84	14	75,63	294,58
16	125,27	267,87	20	126,58	178,09
18	77,17	334,35	21	426,12	696,83
19	251,15	238,55	24	58,99	110,94
22	59,28	374,04			
23	127,22	292,63			
25	139,00	281,98			
MÉDIA	**104,88**	**321,04**	**MÉDIA**	**133,51**	**258,35**
EP	**14,67**	**105,71**	**EP**	**32,65**	**55,35**

TABELA 20 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES TOTAIS DE ^{35}S-HEPARAM SULFATO (MEIO+PG+GAG) DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM CPM/MG DE TECIDO ÚMIDO.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN	F		MN	F
	(cpm/mg tecido úmido)	(cpm/mg tecido úmido)		(cpm/mg tecido úmido)	(cpm/mg tecido úmido)
4	145,96	285,38	1	149,53	113,19
5	85,45	407,34	2	98,91	257,71
6	131,81	1434,02	3	107,66	358,35
9	141,45	136,92	7	168,88	185,75
10	46,95	95,75	8	136,29	259,67
11	109,74	73,05	12	72,19	270,58
13	52,90	164,10	17	185,51	513,63
15	88,73	343,35	14	88,11	314,22
16	114,60	447,27	20	178,20	220,89
18	97,20	571,13	21	393,16	1182,67
19	213,75	526,69	24	80,07	205,67
22	76,78	365,64			
23	110,63	353,13			
25	178,56	408,81			
MÉDIA	**113,89**	**400,90**	**MÉDIA**	**150,77**	**352,94**
EP	**12,78**	**92,98**	**EP**	**28,44**	**93,00**

TABELA 21 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES TOTAIS DE ^{35}S-DERMATAM SULFATO RICO EM ÁCIDO β-D-GLUCURÔNICO (MEIO+PG+GAG) DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM %.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN	F		MN	F
	(%)	(%)		(%)	(%)
4	53,00	64,65	1	41,0	62,6
5	40,12	53,05	2	50,4	61,0
6	40,19	60,59	3	43,2	60,6
9	43,78	57,34	7	48,5	64,5
10	42,99	59,84	8	53,5	56,8
11	48,89	51,99	12	47,3	59,9
13	50,44	56,79	17	46,3	59,5
15	46,04	64,76	14	52,8	60,3
16	46,50	54,65	20	42,4	58,0
18	45,86	59,40	21	40,5	54,7
19	49,39	57,78	24	50,6	66,0
22	46,13	58,33			
23	49,33	63,66			
25	39,23	57,65			
MÉDIA	**46,33**	**58,57**	**MÉDIA**	**49,10**	**60,51**

TABELA 22 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES TOTAIS DE ^{35}S-DERMATAM SULFATO RICO EM ÁCIDO α-L-IDURÔNICO (MEIO+PG+GAG) DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM %.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN	F		MN	F
	(%)	(%)		(%)	(%)
4	19,01	14,09	1	27,2	18,1
5	31,27	17,59	2	22,1	19,8
6	26,06	19,93	3	23,6	17,6
9	30,07	19,33	7	24,9	15,9
10	27,20	19,08	8	24,2	16,0
11	22,76	17,12	12	25,9	16,2
13	26,78	13,47	17	22,2	16,2
15	22,81	15,50	14	22,6	18,9
16	23,36	15,65	20	23,9	16,1
18	27,67	21,31	21	25,2	15,9
19	22,40	15,59	24	23,1	15,2
22	26,76	19,69			
23	25,68	12,70			
25	26,60	17,29			
MÉDIA	**25,73**	**18,42**	**MÉDIA**	**23,90**	**16,69**

TABELA 23 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES TOTAIS DE ^{35}S-HEPARAM SULFATO (MEIO+PG+GAG) DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM %.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN	F		MN	F
	(%)	(%)		(%)	(%)
4	27,99	21,26	1	31,7	19,3
5	28,61	29,37	2	27,5	19,2
6	33,75	19,48	3	33,2	21,8
9	26,15	23,33	7	26,6	19,6
10	29,80	21,08	8	22,3	27,2
11	28,36	30,89	12	26,8	23,9
13	22,79	29,74	17	31,5	24,3
15	31,15	19,74	14	24,6	20,8
16	30,13	29,70	20	33,6	25,9
18	26,47	19,29	21	34,3	29,4
19	28,21	26,63	24	26,3	18,8
22	27,11	21,98			
23	24,98	23,63			
25	34,17	25,06			
MÉDIA	**27,94**	**23,00**	**MÉDIA**	**26,99**	**22,80**

TABELA 24 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES TOTAIS (MEIO+PG+GAG) DE DISSACARÍDEO ΔDI-4S (ÁCIDO β-D-GLUCURÔNICO) OBTIDO DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM CPM/MG DE TECIDO ÚMIDO.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN (cpm/mg tecido úmido)	F (cpm/mg tecido úmido)		MN (cpm/mg tecido úmido)	F (cpm/mg tecido úmido)
4	113,64	300,64	1	124,32	169,42
5	76,98	610,13	2	94,56	473,14
6	122,78	2451,09	3	117,34	579,27
9	135,62	227,86	7	162,44	321,95
10	39,20	171,21	8	111,10	349,31
11	96,56	71,68	12	50,16	325,76
13	55,41	226,95	17	181,22	984,76
15	68,75	530,75	14	64,41	545,30
16	87,38	448,21	20	119,31	347,55
18	84,42	696,00	21	488,00	1339,65
19	239,52	548,22	24	53,55	221,99
22	48,72	638,91			
23	94,71	486,17			
25	114,74	515,60			
MÉDIA	**98,46**	**565,96**	**MÉDIA**	**142,40**	**514,37**
EP	**13,74**	**159,55**	**EP**	**38,55**	**111,42**

TABELA 25 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES TOTAIS (MEIO+PG+GAG) DE DISSACARÍDEO ΔDI-6S (ÁCIDO β-D-GLUCURÔNICO) OBTIDO DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM CPM/MG DE TECIDO ÚMIDO.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN	F		MN	F
	(cpm/mg tecido úmido)	(cpm/mg tecido úmido)		(cpm/mg tecido úmido)	(cpm/mg tecido úmido)
4	107,22	219,22	1	115,11	110,10
5	68,83	482,31	2	80,89	377,07
6	106,36	1962,45	3	111,30	463,29
9	125,82	185,38	7	147,79	277,86
10	34,48	135,92	8	99,90	284,28
11	90,75	51,13	12	45,44	268,67
13	51,41	205,86	17	170,82	813,64
15	65,01	448,22	14	57,45	469,29
16	81,74	363,24	20	113,68	268,20
18	79,47	553,29	21	451,74	1140,14
19	228,59	431,12	24	49,78	168,32
22	43,29	500,89			
23	89,72	387,80			
25	97,72	415,78			
MÉDIA	**90,74**	**453,04**		**131,26**	**421,90**
EP	**13,13**	**127,68**		**35,84**	**96,10**

TABELA 26 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES TOTAIS (MEIO+PG+GAG) DE DISSACARÍDEO ΔDI-4S (ÁCIDO α-L-IDURÔNICO) OBTIDO DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM CPM/MG DE TECIDO ÚMIDO.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN (cpm/mg tecido úmido)	F (cpm/mg tecido úmido)		MN (cpm/mg tecido úmido)	F (cpm/mg tecido úmido)
4	116,84	154,72	1	143,14	78,96
5	83,89	351,40	2	98,15	218,86
6	138,99	1573,33	3	101,65	311,14
9	102,31	92,72	7	137,01	184,76
10	34,66	78,12	8	92,86	176,30
11	91,77	44,74	12	46,77	176,54
13	50,63	92,40	17	171,36	433,54
15	80,06	299,62	14	68,28	288,40
16	118,00	269,19	20	124,43	176,23
18	80,65	322,17	21	426,66	680,70
19	256,99	248,23	24	53,15	115,88
22	60,41	366,02			
23	128,05	284,65			
25	133,92	292,05			
MÉDIA	**105,51**	**319,24**		**133,04**	**258,30**
EP	**14,93**	**104,60**		**33,12**	**54,07**

TABELA 27 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES TOTAIS (MEIO+PG+GAG) DE DISSACARÍDEO ΔDI-4S (ÁCIDO β-D-GLUCURÔNICO) OBTIDO DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM %.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN	F		MN	F
	(%)	(%)		(%)	(%)
4	33,65	44,57	1	32,50	47,26
5	33,51	42,26	2	34,56	44,26
6	33,35	40,94	3	35,53	42,79
9	37,28	45,04	7	36,32	41,03
10	36,18	44,44	8	36,56	43,13
11	34,60	42,78	12	35,23	42,25
13	35,19	43,21	17	34,62	44,12
15	32,15	41,51	14	33,87	41,85
16	30,43	41,48	20	33,38	43,88
18	34,52	44,29	21	35,71	42,39
19	33,03	44,66	24	34,22	43,86
22	31,96	42,43			
23	30,31	41,96			
25	33,13	42,14			
MÉDIA	**33,41**	**42,29**	**MÉDIA**	**35,01**	**43,06**

TABELA 28 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES TOTAIS (MEIO+PG+GAG) DE DISSACARÍDEO ΔDI-6S (ÁCIDO β-D-GLUCURÔNICO) OBTIDO DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM %.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN	F		MN	F
	(%)	(%)		(%)	(%)
4	31,75	32,50	1	30,09	30,71
5	29,96	33,40	2	29,57	35,27
6	28,89	32,78	3	33,70	34,22
9	34,59	36,64	7	33,04	35,42
10	31,83	35,28	8	32,88	35,10
11	32,52	30,52	12	31,92	34,85
13	32,65	39,20	17	32,64	36,45
15	30,40	35,06	14	30,21	36,02
16	28,47	33,61	20	31,81	33,86
18	32,50	35,21	21	33,06	36,07
19	31,53	35,12	24	31,81	33,25
22	28,40	33,26			
23	28,71	33,47			
25	28,21	33,98			
MÉDIA	**30,79**	**33,85**		**32,27**	**35,32**

TABELA 29 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES TOTAIS (MEIO+PG+GAG) DE DISSACARÍDEO ΔDI-4S (ÁCIDO α-L-IDURÔNICO) OBTIDO DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM %.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN	F		MN	F
	(%)	(%)		(%)	(%)
4	34,60	22,94	1	37,41	22,03
5	36,52	24,34	2	35,87	20,47
6	37,76	26,28	3	30,78	22,98
9	28,13	18,33	7	30,63	23,55
10	31,99	20,28	8	30,56	21,77
11	32,88	26,70	12	32,85	22,90
13	32,16	17,59	17	32,74	19,42
15	37,44	23,43	14	35,91	22,13
16	41,10	24,91	20	34,81	22,25
18	32,98	20,50	21	31,23	21,54
19	35,44	20,22	24	33,97	22,89
22	39,63	24,31			
23	40,98	24,57			
25	38,66	23,87			
MÉDIA	**35,80**	**23,86**	**MÉDIA**	**32,71**	**21,62**

TABELA 30 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS TOTAIS OBTIDOS DO MEIO DE CULTURA E EXTRAÍDOS DOS FRAGMENTOS TECIDUAIS (^{35}S-PG+^{35}S-GAG RESÍDUO) DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NA FASE PROLIFERATIVA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM CPM/MG DE TECIDO ÚMIDO.

CASOS	TECIDO MAMÁRIO NORMAL		FIBROADENOMA	
	MEIO	TECIDO	MEIO	TECIDO
	(cpm/mg tecido úmido)	(cpm/mg tecido úmido)	(cpm/mg tecido úmido)	(cpm/mg tecido úmido)
4	33,77	451,63	304,06	660,15
5	105,45	210,23	515,20	1344,29
6	172,03	319,10	1108,72	6339,42
9	327,50	180,31	389,95	257,93
10	69,62	81,59	246,71	248,69
11	98,40	292,45	100,14	134,59
13	63,80	149,35	316,49	385,37
15	75,95	220,27	339,61	1276,36
16	145,51	259,02	363,47	1161,99
18	111,19	232,91	790,23	1378,66
19	528,68	415,89	552,40	1216,16
22	86,79	140,62	599,48	1278,66
23	144,17	280,66	393,95	1121,31
25	81,99	441,60	327,74	1306,16
MÉDIA	**146,06**	**262,54**	**453,44**	**1293,55**
EP	**36,32**	**31,56**	**70,11**	**423,13**

TABELA 31 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS TOTAIS OBTIDOS DO MEIO DE CULTURA E EXTRAÍDOS DOS FRAGMENTOS TECIDUAIS (^{35}S-PG+^{35}S-GAG RESÍDUO) DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NA FASE LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM CPM/MG DE TECIDO ÚMIDO.

CASOS	TECIDO MAMÁRIO NORMAL		FIBROADENOMA	
	MEIO	PG+GAG	MEIO	PG+GAG
	(cpm/mg tecido úmido)	(cpm/mg tecido úmido)	(cpm/mg tecido úmido)	(cpm/mg tecido úmido)
1	215,04	343,56	99,16	379,08
2	81,89	288,47	155,04	1167,53
3	56,03	384,22	785,56	942,36
7	196,93	421,08	216,42	753,14
8	154,38	278,24	464,23	607,52
12	84,19	128,21	395,83	652,78
17	183,77	525,11	458,06	2282,88
14	97,82	180,99	697,24	937,33
20	119,20	422,78	290,21	725,80
21	626,35	1137,93	367,44	3989,80
24	77,25	158,77	195,44	504,91
MÉDIA	**172,08**	**388,13**	**374,97**	**1176,65**
EP	**50,59**	**87,77**	**69,05**	**336,42**

TABELA 32 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS TOTAIS EM % OBTIDOS DO MEIO DE CULTURA E EXTRAÍDOS DOS FRAGMENTOS TECIDUAIS (^{35}S-PG+^{35}S-GAG RESÍDUO) DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NA FASE PROLIFERATIVA DO CICLO MENSTRUAL.

CASOS	TECIDO MAMÁRIO NORMAL		FIBROADENOMA	
	MEIO	PG+GAG	MEIO	PG+GAG
	(cpm/mg tecido úmido)	(cpm/mg tecido úmido)	(cpm/mg tecido úmido)	(cpm/mg tecido úmido)
4	6,96	93,04	31,53	68,47
5	33,40	66,60	27,71	72,29
6	35,03	64,97	14,89	85,11
9	64,49	35,51	60,19	39,81
10	46,04	53,96	49,80	50,20
11	25,18	74,82	42,66	57,34
13	29,93	70,07	45,09	54,91
15	25,64	74,36	21,02	78,98
16	35,97	64,03	23,83	76,17
18	32,31	67,69	36,43	63,57
19	55,97	44,03	31,23	68,77
22	38,16	61,84	31,92	68,08
23	33,94	66,06	26,00	74,00
25	15,66	84,34	1,08	79,94
MÉDIA	**35,75**	**64,25**	**25,96**	**74,04**

TABELA 33 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS TOTAIS EM % OBTIDOS DO MEIO DE CULTURA E EXTRAÍDOS DOS FRAGMENTOS TECIDUAIS (^{35}S-PG+^{35}S-GAG RESÍDUO) DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NA FASE LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL.

CASOS	TECIDO MAMÁRIO NORMAL		FIBROADENOMA	
	MEIO	PG+GAG	MEIO	PG+GAG
	(cpm/mg tecido úmido)	(cpm/mg tecido úmido)	(cpm/mg tecido úmido)	(cpm/mg tecido úmido)
1	38,50	61,50	20,73	79,27
2	22,11	77,89	11,72	88,28
3	12,73	87,27	45,46	54,54
7	31,87	68,13	22,32	77,68
8	35,68	64,32	43,31	56,69
12	39,64	60,36	37,75	62,25
17	25,92	74,08	16,71	83,29
14	35,08	64,92	42,66	57,34
20	21,99	78,01	28,56	71,44
21	35,50	64,50	8,43	91,57
24	32,73	67,27	27,91	72,09
MÉDIA	**30,72**	**69,28**	**24,17**	**75,83**

TABELA 34 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-DERMATAM SULFATO RICO EM ÁCIDO β-D-GLUCURÔNICO EXTRÁIDO DO MEIO DE CULTURA DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM CPM/MG DE TECIDO ÚMIDO.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN (cpm/mg tecido úmido)	F (cpm/mg tecido úmido)		MN (cpm/mg tecido úmido)	F (cpm/mg tecido úmido)
4	17,91	199,86	1	109,78	60,66
5	55,30	325,28	2	41,23	99,03
6	77,31	598,04	3	29,44	474,51
9	176,35	258,67	7	109,08	135,76
10	33,47	166,60	8	76,45	283,65
11	50,56	51,44	12	41,50	218,50
13	33,07	202,56	17	96,50	311,90
15	33,71	206,39	14	43,99	448,12
16	62,48	214,56	20	54,89	202,55
18	60,09	456,11	21	356,72	236,24
19	286,91	368,65	24	39,86	114,68
22	39,37	379,01			
23	67,64	250,41			
25	39,86	194,11			
MÉDIA	**73,86**	**276,55**	**MÉDIA**	**90,86**	**235,05**
EP	**19,99**	**38,28**	**EP**	**29,39**	**43,08**

TABELA 35 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-DERMATAM SULFATO RICO EM ÁCIDO α-L-IDURÔNICO EXTRAÍDO DO MEIO DE CULTURA DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM CPM/MG DE TECIDO ÚMIDO.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN (cpm/mg tecido úmido)	F (cpm/mg tecido úmido)		MN (cpm/mg tecido úmido)	F (cpm/mg tecido úmido)
4	7,49	33,84	1	54,89	14,91
5	25,16	61,14	2	21,39	20,81
6	48,99	248,01	3	12,08	134,68
9	51,69	44,15	7	34,70	31,21
10	14,81	28,90	8	30,12	54,74
11	24,08	19,17	12	21,24	63,34
13	15,05	32,52	17	44,26	53,79
15	21,74	58,94	14	26,79	104,32
16	47,79	61,25	20	33,18	34,29
18	25,55	141,35	21	130,73	62,24
19	122,36	72,04	24	16,81	26,37
22	21,42	112,33			
23	43,09	66,16			
25	18,96	55,33			
MÉDIA	**34,87**	**73,94**	**MÉDIA**	**38,74**	**54,61**
EP	**8,00**	**16,59**	**EP**	**10,40**	**11,62**

TABELA 36 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-HEPARAM SULFATO EXTRÁIDO DO MEIO DE CULTURA DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM CPM/MG DE TECIDO ÚMIDO.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN	F		MN	F
	(cpm/mg tecido úmido)	(cpm/mg tecido úmido)		(cpm/mg tecido úmido)	(cpm/mg tecido úmido)
4	8,18	69,08	1	52,58	22,28
5	24,94	125,24	2	20,61	34,09
6	43,83	252,28	3	13,40	174,59
9	97,04	84,38	7	51,52	50,20
10	21,03	50,31	8	46,72	125,81
11	22,52	28,46	12	24,00	111,99
13	14,65	75,03	17	42,81	92,07
15	20,33	75,72	14	26,26	142,57
16	34,18	75,43	20	30,93	51,57
18	25,09	191,84	21	137,23	68,59
19	116,17	114,87	24	18,84	53,98
22	25,80	104,69			
23	32,90	77,04			
25	22,69	76,36			
MÉDIA	**36,38**	**100,05**	**MÉDIA**	**42,26**	**84,34**
EP	**8,64**	**16,17**	**EP**	**10,86**	**15,45**

TABELA 37 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-DERMATAM SULFATO RICO EM ÁCIDO β-D-GLUCURÔNICO EXTRAÍDO DOS FRAGMENTOS TECIDUAIS (^{35}S-PG+^{35}S-GAG RESÍDUO) DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL EXPRESSOS EM CPM/MG DE TECIDO ÚMIDO.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN (cpm/mg tecido úmido)	F (cpm/mg tecido úmido)		MN (cpm/mg tecido úmido)	F (cpm/mg tecido úmido)
4	207,4	325,25	1	154,3	222,91
5	90,1	755,65	2	139,1	749,98
6	151,1	3818,26	3	202,1	564,55
9	91,5	157,61	7	199,8	454,87
10	35,9	147,54	8	123,7	353,02
11	138,6	71,52	12	49,6	387,42
13	71,4	239,44	17	260,7	1496,41
15	94,3	768,29	14	70,0	572,71
16	98,2	593,39	20	177,4	412,27
18	110,0	782,86	21	586,3	2237,11
19	186,2	636,98	24	54,7	267,78
22	52,0	758,02			
23	117,6	617,61			
25	165,1	746,13			
MÉDIA	**114,96**	**744,18**	**MÉDIA**	**183,42**	**701,73**
EP	**13,76**	**256,11**	**EP**	**47,19**	**195,18**

TABELA 38 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-DERMATAM SULFATO RICO EM ÁCIDO α-L-IDURÔNICO EXTRAÍDO DOS FRAGMENTOS TECIDUAIS (^{35}S-PG+^{35}S-GAG RESÍDUO) DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL EXPRESSOS EM CPM/MG DE TECIDO ÚMIDO.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN (cpm/mg tecido úmido)	F (cpm/mg tecido úmido)		MN (cpm/mg tecido úmido)	F (cpm/mg tecido úmido)
4	105,7	116,51	1	89,5	61,69
5	59,2	303,84	2	71,0	188,67
6	88,8	1336,36	3	87,1	191,36
9	44,4	46,56	7	100,8	160,21
10	19,6	46,31	8	65,6	118,81
11	64,0	21,31	12	30,1	104,95
13	39,3	55,68	17	118,5	362,25
15	59,2	251,90	14	48,8	190,27
16	77,5	206,62	20	93,4	143,80
18	51,6	193,01	21	295,4	634,59
19	128,8	166,52	24	42,2	84,56
22	37,9	261,71			
23	84,1	226,47			
25	120,0	226,65			
MÉDIA	**70,01**	**247,10**	**MÉDIA**	**94,76**	**203,74**
EP	**8,98**	**90,59**	**EP**	**22,67**	**51,78**

TABELA 39 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-HEPARAM SULFATO EXTRAÍDO DOS FRAGMENTOS TECIDUAIS (^{35}S-PG+^{35}S-GAG RESÍDUO) DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL EXPRESSOS EM CPM/MG DE TECIDO ÚMIDO.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN	F		MN	F
	(cpm/mg tecido úmido)	(cpm/mg tecido úmido)		(cpm/mg tecido úmido)	(cpm/mg tecido úmido)
4	137,8	216,30	1	97,0	90,91
5	60,5	282,10	2	78,3	223,61
6	88,0	1181,74	3	94,3	183,76
9	44,4	52,54	7	117,4	135,55
10	25,9	45,44	8	89,6	133,87
11	87,2	44,59	12	48,2	158,60
13	38,2	89,07	17	142,7	421,56
15	68,4	267,63	14	61,8	171,65
16	80,4	371,84	20	147,3	169,32
18	72,1	379,29	21	255,9	1114,08
19	97,6	411,83	24	61,2	151,70
22	51,0	260,95			
23	77,7	276,09			
25	155,9	332,45			
MÉDIA	**77,51**	**300,85**	**MÉDIA**	**108,51**	**268,60**
EP	**9,97**	**78,77**	**EP**	**18,48**	**92,73**

TABELA 40 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-DERMATAM SULFATO RICO EM ÁCIDO β-D-GLUCURÔNICO EXTRÁIDO DO MEIO DE CULTURA DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM %.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN	F		MN	F
	(%)	(%)		(%)	(%)
4	54,25	66,81	1	45,33	64,48
5	43,25	61,09	2	55,85	62,51
6	45,47	63,59	3	46,13	70,23
9	47,09	63,62	7	49,53	64,33
10	44,48	60,52	8	57,10	64,36
11	52,03	51,92	12	50,53	61,99
13	54,60	66,36	17	49,87	61,11
15	48,29	67,78	14	53,61	60,54
16	53,34	66,01	20	47,85	55,48
18	45,44	54,45	21	52,78	58,80
19	54,27	57,79	24	52,57	68,14
22	52,46	63,57			
23	52,68	65,32			
25	48,90	59,58			
MÉDIA	**50,90**	**61,38**	**MÉDIA**	**52,87**	**62,85**

TABELA 41 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-DERMATAM SULFATO RICO EM ÁCIDO α-L-IDURÔNICO EXTRAÍDO DO MEIO DE CULTURA DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM %.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN	F		MN	F
	(%)	(%)		(%)	(%)
4	15,90	11,40	1	27,60	15,01
5	33,08	17,44	2	17,77	14,37
6	24,74	18,85	3	27,88	11,89
9	30,00	16,81	7	25,70	13,52
10	28,69	17,28	8	20,93	16,96
11	24,78	19,35	12	25,27	15,23
13	23,29	12,97	17	19,65	11,79
15	21,37	11,76	14	21,99	17,18
16	22,30	11,18	20	24,49	16,08
18	28,80	22,58	21	22,26	13,52
19	23,07	17,91	24	24,11	11,75
22	23,87	11,95			
23	23,97	10,49			
25	23,26	16,98			
MÉDIA	**24,03**	**16,41**	**MÉDIA**	**22,54**	**14,60**

TABELA 42 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-HEPARAM SULFATO EXTRAÍDO DO MEIO DE CULTURA DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM %.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN	F		MN	F
	(%)	(%)		(%)	(%)
4	29,85	21,79	1	27,06	20,51
5	23,66	21,47	2	26,38	23,12
6	29,79	17,56	3	25,99	17,88
9	22,91	19,57	7	24,77	22,15
10	26,83	22,20	8	21,97	18,69
11	23,18	28,73	12	24,20	22,78
13	22,11	20,68	17	30,48	27,10
15	30,34	20,47	14	24,40	22,28
16	24,36	22,81	20	27,66	28,44
18	25,76	22,97	21	24,95	27,68
19	22,66	24,31	24	23,32	20,11
22	23,66	24,48			
23	23,35	24,19			
25	27,84	23,44			
MÉDIA	**25,07**	**22,21**	**MÉDIA**	**24,59**	**22,55**

TABELA 43 - VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-DERMATAM SULFATO RICO EM ÁCIDO β-D-GLUCURÔNICO EXTRAÍDO DOS FRAGMENTOS TECIDUAIS (^{35}S-PG+^{35}S-GAG RESÍDUO) DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL EXPRESSOS %.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN	F		MN	F
	(%)	(%)		(%)	(%)
4	50,75	61,40	1	38,74	61,28
5	38,35	50,64	2	47,80	60,60
6	36,94	59,19	3	42,43	56,83
9	42,08	55,14	7	48,23	64,53
10	42,48	59,66	8	51,54	56,13
11	47,83	52,05	12	45,28	59,36
13	45,13	52,41	17	44,36	58,28
15	44,12	61,66	14	52,70	60,08
16	46,00	49,43	20	38,77	59,51
18	46,08	60,26	21	34,62	53,13
19	47,07	57,77	24	49,95	65,63
22	42,95	56,32			
23	47,92	62,32			
25	37,44	57,16			
MÉDIA	**43,80**	**57,59**	**MÉDIA**	**47,43**	**59,77**

TABELA 44 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-DERMATAM SULFATO RICO EM ÁCIDO α-L-IDURÔNICO EXTRAÍDO DOS FRAGMENTOS TECIDUAIS (^{35}S-PG+^{35}S-GAG RESÍDUO) DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL EXPRESSOS EM %.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN	F		MN	F
	(%)	(%)		(%)	(%)
4	24,62	18,14	1	27,03	20,36
5	30,25	17,63	2	24,12	21,34
6	26,87	20,44	3	22,34	19,82
9	30,10	20,22	7	24,61	16,23
10	26,70	19,56	8	25,96	15,92
11	22,08	15,50	12	26,27	16,43
13	31,22	13,70	17	23,53	19,61
15	24,03	19,35	14	22,72	20,36
16	23,44	17,71	20	23,54	16,12
18	27,09	21,09	21	26,67	16,78
19	22,08	14,24	24	22,71	15,89
22	28,21	22,65			
23	26,41	14,49			
25	27,22	17,36			
MÉDIA	**26,67**	**19,12**		**24,51**	**17,35**

TABELA 45 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-HEPARAM SULFATO EXTRAÍDO DOS FRAGMENTOS TECIDUAIS (^{35}S-PG+^{35}S-GAG RESÍDUO) DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL EXPRESSOS EM %.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN	F		MN	F
	(%)	(%)		(%)	(%)
4	24,62	20,47	1	34,23	18,37
5	31,40	31,73	2	28,08	18,06
6	36,19	20,38	3	35,23	23,34
9	27,81	24,65	7	27,16	19,24
10	30,82	20,78	8	22,50	27,95
11	30,10	32,45	12	28,46	24,21
13	23,65	33,89	17	32,11	22,10
15	31,85	18,99	14	24,58	19,56
16	30,56	32,87	20	37,69	24,36
18	26,83	18,65	21	38,72	30,10
19	30,84	27,99	24	27,34	18,49
22	28,84	21,03			
23	25,67	23,18			
25	35,34	25,47			
MÉDIA	**29,53**	**23,28**		**28,06**	**22,88**

TABELA 46 – VALORES INDIVIDUAIS DO RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS E ^{35}S-GLICOSAMINOGLICANOS DOS FRAGMENTOS TECIDUAIS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NA FASE PROLIFERATIVA DO CICLO MENSTRUAL.

CASOS	TECIDO MAMÁRIO NORMAL		FIBROADENOMA	
	^{35}S-PG	^{35}S-GAG	^{35}S-PG	^{35}S-GAG
	(%)	(%)	(%)	(%)
4	32,70	67,30	47,53	52,47
5	71,91	28,09	79,83	20,17
6	58,66	41,34	36,88	63,12
9	40,21	59,79	54,23	45,77
10	65,72	34,28	78,62	21,38
11	65,59	34,41	65,06	34,94
13	43,24	56,76	27,59	72,41
15	61,90	38,10	46,10	53,90
16	47,91	52,09	15,39	84,61
18	47,56	52,44	6,43	93,57
19	56,07	43,93	93,16	6,84
22	32,87	67,13	6,76	93,24
23	78,13	21,87	79,91	20,09
25	68,74	31,26	70,99	29,01
MÉDIA	**54,29**	**45,71**	**37,50**	**62,50**

TABELA 47 – VALORES INDIVIDUAIS DO RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS E ^{35}S-GLICOSAMINOGLICANOS DOS FRAGMENTOS TECIDUAIS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NA FASE LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL.

CASOS	TECIDO MAMÁRIO NORMAL		FIBROADENOMA	
	^{35}S-PG	^{35}S-GAG	^{35}S-PG	^{35}S-GAG
	(%)	(%)	(%)	(%)
1	59,87	40,13	76,14	23,86
2	31,69	68,31	23,18	76,82
3	74,90	25,10	32,06	67,94
7	82,33	17,67	80,46	19,54
8	69,55	30,45	43,26	56,74
12	74,86	25,14	68,40	31,60
17	19,58	80,42	15,46	84,54
14	91,21	8,79	39,23	60,77
20	50,95	49,05	69,38	30,62
21	61,84	38,16	57,82	42,18
24	78,00	22,00	86,39	13,61
MÉDIA	**66,11**	**33,89**	**55,83**	**44,17**

TABELA 48 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS EXTRAIDOS E NÃO EXTRAÍDOS (^{35}S-GLICOSAMINOGLICANOS DO TECIDO RESIDUAL) DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NA FASE PROLIFERATIVA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM CPM/MG DE TECIDO ÚMIDO.

CASOS	TECIDO MAMÁRIO NORMAL		CASOS	FIBROADENOMA	
	PG (cpm/mg tecido úmido)	GAG resíduo (cpm/mg tecido úmido)		PG (cpm/mg tecido úmido)	GAG resíduo (cpm/mg tecido úmido)
4	216,39	235,24	1	101,57	558,58
5	69,10	141,13	2	90,81	1253,48
6	151,76	167,34	3	407,67	5931,74
9	58,96	121,35	7	122,58	135,34
10	50,50	31,08	8	114,64	134,04
11	191,81	100,64	12	87,57	47,03
13	116,69	32,66	17	307,93	77,44
15	144,76	75,52	14	1003,48	272,88
16	186,26	72,75	20	927,68	234,32
18	130,61	102,31	21	1284,33	94,33
19	179,84	236,05	24	335,59	880,57
22	82,48	58,14		471,53	807,13
23	112,84	167,82		608,04	513,26
25	303,57	138,03		927,26	378,90
MÉDIA	**142,54**	**120,00**	**MÉDIA**	**485,05**	**808,50**
EP	**19,36**	**18,25**	**EP**	**111,56**	**420,86**

TABELA 49 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS EXTRAÍDOS E NÃO EXTRAÍDOS (^{35}S-GLICOSAMINOGLICANOS DO TECIDO RESÍDUAL) DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NA FASE LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM CPM/MG DE TECIDO ÚMIDO.

CASOS	TECIDO MAMÁRIO NORMAL		FIBROADENOMA	
	PG	GAG resíduo	PG	GAG resíduo
	(cpm/mg tecido úmido)	(cpm/mg tecido úmido)	(cpm/mg tecido úmido)	(cpm/mg tecido úmido)
1	257,20	86,36	259,30	119,78
2	237,50	50,96	939,42	228,10
3	350,45	33,77	369,71	572,65
7	133,44	287,64	174,55	578,60
8	54,49	223,75	93,92	513,61
12	65,33	62,88	452,92	199,86
17	409,56	115,55	1972,07	310,81
14	108,35	72,64	713,70	223,63
20	316,67	106,12	232,72	493,09
21	791,42	346,52	1726,12	2263,69
24	98,19	60,58	291,93	212,98
MÉDIA	**256,60**	**131,53**	**656,94**	**519,71**
EP	**67,96**	**33,36**	**202,51**	**190,29**

TABELA 50 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-DERMATAM SULFATO RICO EM ÁCIDO β-D-GLUCURÔNICO OBTIDO DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS DEGRADADOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM CPM/MG DE TECIDO ÚMIDO.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN (cpm/mg tecido úmido)	F (cpm/mg tecido úmido)		MN (cpm/mg tecido úmido)	F (cpm/mg tecido úmido)
4	27,06	83,00	1	44,91	445,06
5	72,84	479,97	2	57,83	105,64
6	33,64	294,95	3	151,98	129,45
9	49,39	328,90	7	116,18	606,20
10	64,08	640,34	8	415,17	995,63
11	100,03	51,13	12	113,95	155,31
13	96,06	222,18	17	29,15	51,77
15	24,53	79,03	14	185,77	224,47
16	117,06	64,08	20	29,70	296,23
18	77,77	256,12	21	40,58	183,04
19	71,20	742,89	24	219,13	1322,27
22	33,44	57,11			
23	59,79	210,10			
25	126,46	557,10			
MÉDIA	**68,10**	**290,49**	**MÉDIA**	**127,67**	**410,46**
EP	**9,15**	**64,30**	**EP**	**18,91**	**129,55**

TABELA 51 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-DERMATAM SULFATO RICO EM ÁCIDO α-L-IDURÔNICO OBTIDO DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS DEGRADADOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM CPM/MG DE TECIDO ÚMIDO.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN	F		MN	F
	(cpm/mg tecido úmido)	(cpm/ mg tecido úmido)		(cpm/mg tecido úmido)	(cpm/mg tecido úmido)
4	16,24	18,74	1	35,32	140,40
5	58,92	178,07	2	39,82	34,92
6	25,80	84,05	3	74,97	48,91
9	31,73	112,73	7	58,47	142,92
10	38,11	222,54	8	206,38	309,88
11	41,21	15,22	12	68,65	45,16
13	44,64	58,75	17	9,65	19,09
15	13,28	18,98	14	79,34	64,16
16	43,95	16,18	20	15,74	72,10
18	37,09	51,99	21	29,86	49,18
19	32,73	175,46	24	90,70	300,18
22	17,64	14,94			
23	29,78	43,78			
25	85,40	162,46			
MÉDIA	**36,89**	**83,85**	**MÉDIA**	**64,45**	**111,54**
EP	**5,18**	**20,24**	**EP**	**9,42**	**32,74**

TABELA 52 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-HEPARAM SULFATO OBTIDO DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS DEGRADADOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM CPM/MG DE TECIDO ÚMIDO.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN	F		MN	F
	(cpm/mg tecido úmido)	(cpm/mg tecido úmido)		(cpm/mg tecido úmido)	(cpm/mg tecido úmido)
4	15,21	20,23	1	28,49	126,63
5	52,12	279,02	2	34,04	32,96
6	23,23	95,90	3	85,21	54,23
9	30,76	165,68	7	62,87	185,24
10	43,75	152,27	8	170,06	416,76
11	47,68	22,67	12	72,40	56,85
13	36,35	54,06	17	15,44	21,43
15	12,65	16,71	14	84,74	80,62
16	55,32	20,42	20	20,06	83,52
18	45,77	98,86	21	27,75	59,18
19	28,04	342,25	24	97,59	346,90
22	17,73	18,57			
23	26,96	54,01			
25	91,37	208,06			
MÉDIA	**37,64**	**110,62**	**MÉDIA**	**63,52**	**133,12**
EP	**5,76**	**29,23**	**EP**	**8,52**	**41,73**

TABELA 53– VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-DERMATAM SULFATO RICO EM ÁCIDO β-D-GLUCURÔNICO OBTIDO DOS PROTEOGLICANOS NÃO EXTRAÍDOS (TECIDO RESIDUAL) DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM CPM/MG DE TECIDO ÚMIDO.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN (cpm/mg tecido úmido)	F (cpm/mg tecido úmido)		MN (cpm/mg tecido úmido)	F (cpm/mg tecido úmido)
4	64,47	74,61	1	25,08	127,65
5	25,36	113,42	2	141,94	349,23
6	18,40	463,06	3	25,40	282,82
9	68,22	288,71	7	22,89	143,77
10	30,19	127,94	8	171,14	1241,48
11	38,58	20,39	12	40,30	67,59
13	90,10	414,80	17	94,59	301,26
15	11,39	68,50	14	16,29	340,08
16	90,29	261,17	20	19,87	91,18
18	73,30	3562,14	21	14,17	84,74
19	38,85	39,97	24	41,60	174,14
22	56,67	698,54			
23	11,60	29,35			
25	38,67	189,02			
MÉDIA	**46,86**	**453,69**	**MÉDIA**	**55,75**	**291,27**
EP	**7,53**	**254,09**	**EP**	**17,38**	**105,06**

TABELA 54 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-DERMATAM SULFATO RICO EM ÁCIDO α-L-IDURÔNICO OBTIDO DOS PROTEOGLICANOS NÃO EXTRAÍDOS (TECIDO RESIDUAL) DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM CPM/MG DE TECIDO ÚMIDO.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN (cpm/mg tecido úmido)	F (cpm/mg tecido úmido)		MN (cpm/mg tecido úmido)	F (cpm/mg tecido úmido)
4	28,18	27,82	1	13,52	49,86
5	18,56	28,54	2	60,98	125,29
6	12,07	177,66	3	18,43	94,89
9	52,40	113,74	7	12,49	45,75
10	21,13	29,36	8	89,00	324,71
11	22,76	6,09	12	20,85	16,53
13	84,14	107,77	17	55,98	99,71
15	6,29	27,33	14	7,76	127,20
16	61,73	100,33	20	14,36	32,85
18	51,72	1284,36	21	12,32	35,38
19	18,90	17,55	24	27,81	62,07
22	41,54	288,91			
23	9,56	11,90			
25	34,64	64,19			
MÉDIA	**33,12**	**163,25**	**MÉDIA**	**30,32**	**92,20**
EP	**6,26**	**92,11**	**EP**	**8,35**	**27,16**

TABELA 55 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-HEPARAM SULFATO OBTIDO DOS PROTEOGLICANOS NÃO EXTRAÍDOS (TECIDO RESIDUAL) DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM CPM/MG DE TECIDO ÚMIDO.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN (cpm/mg tecido úmido)	F (cpm/mg tecido úmido)		MN (cpm/mg tecido úmido)	F (cpm/mg tecido úmido)
4	29,20	32,30	1	33,35	45,02
5	28,30	92,82	2	83,32	102,59
6	27,76	165,05	3	62,06	115,10
9	46,97	110,41	7	15,43	38,37
10	24,65	115,36	8	85,87	697,32
11	39,53	21,91	12	24,55	34,06
13	61,24	357,77	17	74,13	112,44
15	13,28	28,72	14	9,52	103,13
16	82,46	195,88	20	28,13	75,08
18	42,21	1082,88	21	33,48	92,51
19	44,06	37,04	24	45,11	74,66
22	42,77	263,53			
23	11,28	35,06			
25	64,50	124,39			
MÉDIA	**39,87**	**190,22**		**45,00**	**135,48**
EP	**5,50**	**76,29**		**8,59**	**59,65**

TABELA 56 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-DERMATAM SULFATO RICO EM ÁCIDO β-D-GLUCURÔNICO OBTIDO DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS DEGRADADOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM %.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN	F		MN	F
	(%)	(%)		(%)	(%)
4	46,25	68,05	1	41,30	62,50
5	39,61	51,22	2	43,91	60,88
6	40,69	62,11	3	48,69	55,66
9	44,15	54,16	7	48,92	64,88
10	43,91	63,08	8	52,45	57,81
11	52,95	57,44	12	44,69	60,36
13	54,26	66,32	17	53,74	56,09
15	48,61	68,89	14	53,10	60,79
16	54,11	63,64	20	45,35	65,56
18	48,42	62,93	21	41,33	62,81
19	53,95	58,93	24	53,78	67,14
22	48,60	63,02			
23	51,31	68,24			
25	41,70	60,06			
MÉDIA	**47,74**	**59,90**	**MÉDIA**	**49,94**	**62,65**

TABELA 57 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-DERMATAM SULFATO RICO EM ÁCIDO α-L-IDURÔNICO OBTIDO DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS DEGRADADOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM %.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN	F		MN	F
	(%)	(%)		(%)	(%)
4	88,36	36,19	1	24,64	14,65
5	25,99	6,54	2	26,35	17,99
6	25,91	23,65	3	10,63	14,74
9	38,51	10,89	7	9,01	2,23
10	14,90	5,81	8	16,51	3,61
11	12,75	21,54	12	21,53	5,79
13	69,11	21,50	17	55,52	59,31
15	29,36	25,19	14	3,45	36,47
16	3,46	33,61	20	32,43	14,02
18	30,50	60,94	21	17,12	9,05
19	19,36	11,21	24	10,86	2,73
22	36,56	67,46			
23	12,91	10,56			
25	6,25	5,97			
MÉDIA	**24,45**	**15,25**	**MÉDIA**	**15,16**	**8,34**

TABELA 58 - VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-HEPARAM SULFATO OBTIDO DE ^{35}S-PROTEOGLICANOS DEGRADADOS DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM %.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN	F		MN	F
	(%)	(%)		(%)	(%)
4	26,00	16,59	1	26,21	17,78
5	28,34	29,78	2	25,85	18,99
6	28,10	20,19	3	27,30	23,31
9	27,49	27,28	7	26,47	19,83
10	29,98	15,00	8	21,48	24,20
11	25,24	25,47	12	28,39	22,09
13	20,53	16,14	17	28,47	23,22
15	25,07	14,57	14	24,22	21,83
16	25,57	20,28	20	30,63	18,48
18	28,49	24,29	21	28,27	20,31
19	21,25	27,15	24	23,95	17,62
22	25,77	20,50			
23	23,13	17,54			
25	30,13	22,43			
MÉDIA	**26,39**	**22,81**	**MÉDIA**	**24,85**	**20,32**

TABELA 59 - VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-DERMATAM SULFATO RICO EM ÁCIDO β-D-GLUCURÔNICO OBTIDO DOS PROTEOGLICANOS NÃO EXTRAÍDOS (TECIDO RESIDUAL) DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM %.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN	F		MN	F
	(%)	(%)		(%)	(%)
4	52,91	55,38	1	34,85	57,36
5	35,12	48,31	2	49,59	60,51
6	31,61	57,47	3	23,98	57,39
9	40,71	56,29	7	45,05	63,09
10	39,75	46,92	8	49,46	54,85
11	38,24	42,14	12	47,03	57,19
13	38,26	47,12	17	42,10	58,68
15	36,79	55,00	14	48,53	59,62
16	38,51	46,86	20	31,86	45,80
18	43,83	60,08	21	23,63	39,85
19	38,16	42,27	24	36,33	56,02
22	40,20	55,84			
23	35,75	38,46			
25	28,06	50,06			
MÉDIA	**39,10**	**56,21**	**MÉDIA**	**42,54**	**56,13**

TABELA 60 - VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-DERMATAM SULFATO RICO EM ÁCIDO α-L-IDURÔNICO OBTIDO DOS PROTEOGLICANOS NÃO EXTRAÍDOS (TECIDO RESIDUAL) DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM %.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN	F		MN	F
	(%)	(%)		(%)	(%)
4	23,12	20,65	1	18,80	22,41
5	25,70	12,16	2	21,30	21,71
6	20,73	22,05	3	17,41	19,26
9	31,27	22,18	7	24,59	20,08
10	27,81	10,77	8	25,72	14,35
11	22,57	12,58	12	24,32	13,99
13	35,73	12,24	17	24,91	19,42
15	20,32	21,94	14	23,11	22,30
16	26,33	18,00	20	23,03	16,50
18	30,93	21,66	21	20,54	16,64
19	18,56	18,56	24	24,29	19,97
22	29,47	23,09			
23	29,47	15,59			
25	25,14	17,00			
MÉDIA	**27,63**	**20,23**	**MÉDIA**	**23,13**	**17,77**

TABELA 61 – VALORES INDIVIDUAIS DAS CONCENTRAÇÕES DE ^{35}S-HEPARAM SULFATO OBTIDO DOS PROTEOGLICANOS NÃO EXTRAÍDOS (TECIDO RESIDUAL) DE FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE NAS FASES PROLIFERATIVA E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL, EXPRESSOS EM %.

CASOS	FASE PROLIFERATIVA		CASOS	FASE LÚTEA	
	MN	F		MN	F
	(%)	(%)		(%)	(%)
4	23,97	23,98	1	46,35	20,23
5	39,19	39,53	2	29,11	17,78
6	47,67	20,48	3	58,61	23,35
9	28,03	21,53	7	30,36	16,84
10	32,44	42,31	8	24,82	30,81
11	39,19	45,28	12	28,65	28,82
13	26,00	40,64	17	32,99	21,90
15	42,89	23,06	14	28,36	18,08
16	35,17	35,14	20	45,11	37,71
18	25,24	18,26	21	55,83	43,51
19	43,28	39,18	24	39,39	24,02
22	30,34	21,07			
23	34,78	45,95			
25	46,80	32,94			
MÉDIA	**33,27**	**23,57**	**MÉDIA**	**34,33**	**26,11**

ANEXO 1

PROTOCOLO

NOME:_____

RH:_____RAÇA:_____MENARCA_____anos IDADE:___anos

DUM:__/__/_____DIA DO CICLO:____dia PROGESTERONA:_____ng/ml

G----P----A----C---- IDADE 1°PARTO_____

AMAMENTAÇÃO □ NÃO AMAMENTOU □ AMAMENTOU _____n° meses

AF: □ AUSENTE □ PRESENTE

AP: □ NÃO □ SIM _

I [2]) a

FI

NÚMERO:

LOCALI

TAMANHO (

USG: LUME: [3]

PAAF: □ NEGATIVA □ SUGESTIVA FA

□ INSATISFATÓRI □ SUSPEITA □ POSITIVA

ANEXO 2

CARTA DE INFORMAÇÃO

AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES QUANTITATIVAS E QUALITATIVAS DE PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS EM TECIDO MAMÁRIO HUMANO NAS FASES FOLICULAR E LÚTEA DO CICLO MENSTRUAL

Esta pesquisa tem como objetivo estudar as alterações quantitativas e qualitativas de proteoglicanos e glicosaminoglicanos em tecido mamário nas diferentes fases do ciclo menstrual. Para tanto, as mulheres com diagnóstico prévio de fibroadenomas mamários e não usuárias de anticoncepcionais hormonais poderão ser incluídas nesta pesquisa. A cirurgia de retirada do nódulo somente será realizada se houver necessidade.

A cirurgia será marcada de acordo com a fase do ciclo menstrual e será realizada após preenchimento de um protocolo (ver anexo1) a nível ambulatorial na casa da mama pertencente ao setor da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP.

Será coletado na mesmo dia uma amostra de sangue para dosagens hormonais. O retorno será de sete a dez dias para retirada de pontos.

Os riscos para a paciente participante do estudo serão os riscos do ato cirúrgico, ou seja, hematoma no local e infecção da ferida operatória, enquanto que o benefício será a da retirada do nódulo mamário e sua confirmação histopatológica.

O trabalho será realizado no setor de mastologia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, sob responsabilidade do Dr. José Arimatéa dos Santos Júnior e do Dr. Afonso Celso Pinto Nazário, em poderão ser encontrados na Casa da Mama da disciplina de Ginecologia, localizada na Rua Botucatu, 527 – Vila Clementino, tel: 11-5576-4618. Se você tiver alguma dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o comitê de ética em pesquisa (CEP).

É garantida a liberdade de retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade do tratamento na instituição.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. Você terá direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais, quando em estudos abertos ou de resultados que sejam de conhecimento dos pesquisadores.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada a sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

ANEXO 3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO:

Acredito ter sido suficiente informado a respeito das informações que li ou foram lids para mim, descrevendo o estudo !Avaliação das alterações quantitativas e qualitativas de proteoglicanos e glicosaminoglicanos em tecido mamário humano normal nas fases folicular e lútea do ciclo menstrual".

Eu discuti com o Dr. José Arimatéa dos santos Junior sobre a minha decisão em participar desse estuydo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

_____

_____/_____/_____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o consentimento livre e esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

_____

_____/_____/_____