

UMA NOVA MUCOPOLISSACARIDOSE CARACTERIZADA POR UM CONDROITIN SULFATO C POUCO SULFATADO. ESTUDO BIOQUÍMICO:

RVMEB-44

Paulo Antonio S. Mourão*

RESUMO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estrutura dos mucopolissacarídeos

Mucopolissacarídeos ou glicosaminoglicans são heteropolissacarídeos formados de hexosaminas e açúcares não nitrogenados ligados por ligações glicosídicas. São polianions em que os grupos carregados negativamente ou são carboxilas ou esteres de sulfatos ou ambos. Podem ser classificados em:

- 1) Policarboxilados: ácidos hialurônico e condrosin.
- 2) Polissulfatados: queratan sulfato
- 3) Policarboxi-sulfatos: condroitin 4 e 6 sulfatos, primeiramente designados como condroitin sulfato A e C, respectivamente; condroitin sulfato B ou dermatan sulfato; heparina e heparitin sulfato (Figura 1).

Heparina, heparitin sulfatos e queratan sulfato apresentam uma estrutura ainda muito discutida enquanto condroitins sulfatos e ácido hialurônico apresentam estruturas melhor caracterizadas.

Glicosamina é o amino açúcar constituinte de heparina, heparitin sulfatos,

ácido hialurônico e queratan sulfato, o que os diferencia dos condroitins sulfatos que apresentam galactosamina em sua estrutura.

Todos os condroitins sulfatos são constituídos de unidades dissacarídicas formadas de um resíduo de ácido urônico ligado por ligação do tipo β 1-3 a um resíduo de N-acetil galactosamina. Essas unidades se repetem na estrutura do polímero através de ligações do tipo β 1-4. Os condroitins são diferenciados quanto ao tipo de ácido urônico e posição do grupamento sulfato. Condroitins sulfatos (ChSO_4) A e C apresentam ácido glicurônico e ChSO_4 B ácido idurônico. No ChSO_4 A o grupamento sulfato está na posição 4 da N-acetil galactosamina e no ChSO_4 C o sulfato está na posição 6. A estrutura dos ChSO_4 A e C é muito semelhante e apenas a posição do sulfato permite distinguir esses dois compostos. No ChSO_4 B o sulfato está localizado na posição 4 da N-acetil galactosamina. Alguns tecidos (por exemplo — córnea) possuem pequena quantidade de um ChSO_4 pouco sulfatado denominado condrosin.

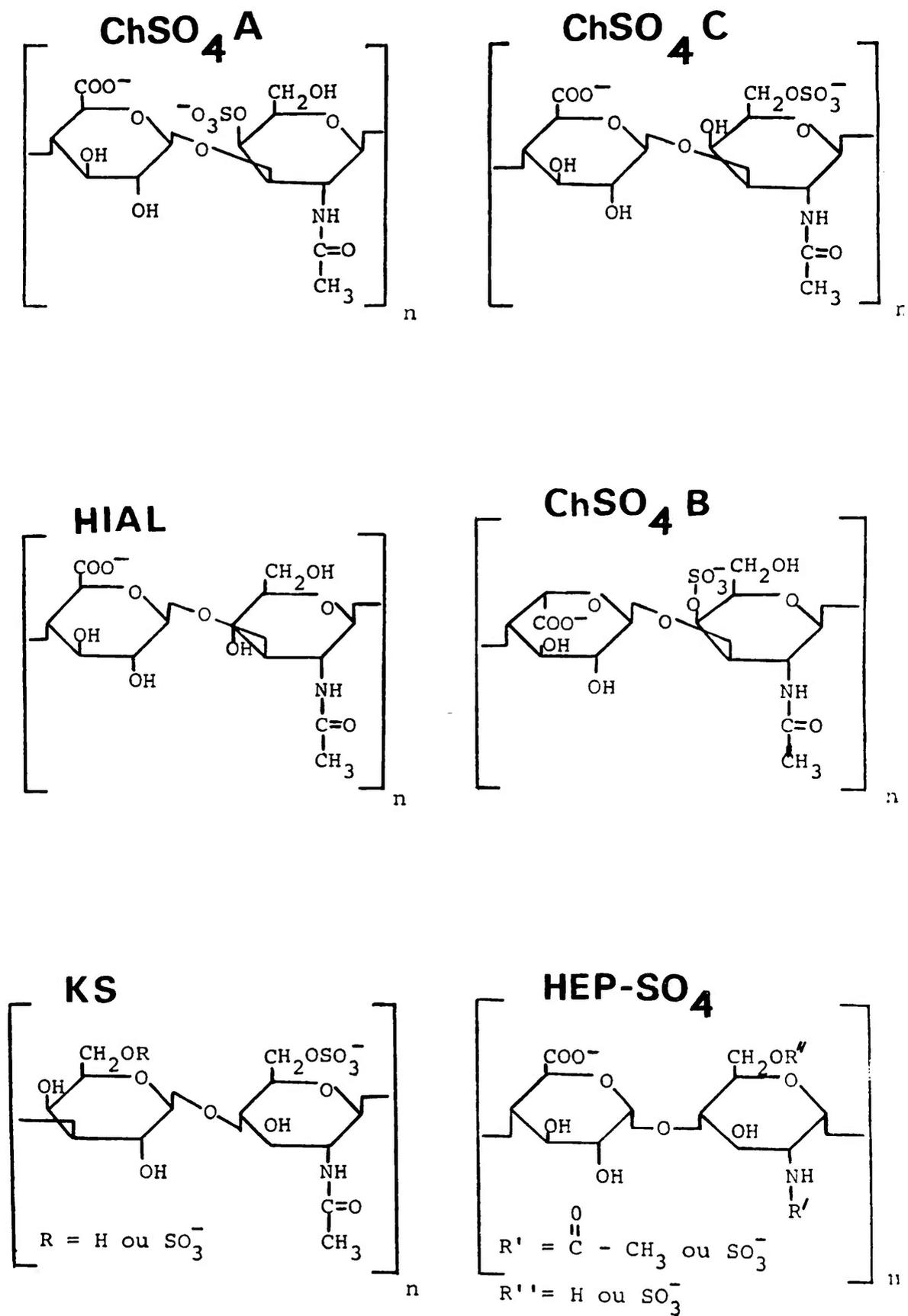


FIGURA 1

ESTRUTURA DOS MUCOPOLISSACARÍDEOS

Ácido hialurônico é um mucopolissacarídeo constituído de ácido glicurônico e N-acetil glicosamina unidos por ligação β 1-3 e β 1-4.

Queratan sulfato é composto de galactose e N-acetil glicoamina sulfatada na posição 6, unidos por ligação do tipo β 1-3. O resíduo de galactose pode estar sulfatado na posição 6.

Os mucopolissacarídeos ocorrem nos tecidos ligados a proteínas por ligações estáveis formando os proteoglicans, compostos de alta massa molecular. São extraídos dos tecidos por concentrações elevadas de sal como complexos proteicos ou após proteólise ligados covalentemente a pequenos peptídeos.

1.2. Enzimas que degradam mucopolissacarídeos

Enzimas que degradam mucopolissacarídeos foram descritas em *Proteus vulgaris*,¹ *Flavobacterium heparinum*² e tecido de mamífero.³ Degradação enzimática e análise dos produtos formados por cromatografia e electroforese em papel constitui uma das maneiras de estudar a estrutura dos mucopolissacarídeos.⁴

A condroitinase AC atua sobre os condroitins sulfatos A, C e ácido hialurônico. Possui ação eliminase formando os respectivos dissacarídeos insaturados que são facilmente separados por cromatografia em papel.¹

A condroitinase ABC atua sobre os condroitins sulfatos A, B, C e ácido hialurônico, também formando dissacarídeos insaturados. O ChSO_4 A e o ChSO_4 B formam o mesmo dissacarídeo insaturado 4-sulfato pela ação dessa enzima.¹

Heparinase e heparitinasas foram isoladas de *Flavobacterium heparinum*.² Essas enzimas somente agem sobre a heparina e heparitin sulfatos, não apresentando nenhuma ação sobre os demais mucopolissacarídeos.

1.3. Função dos mucopolissacarídeos

Os mucopolissacarídeos ocorrem em diferentes proporções em diferentes tecidos e o padrão de distribuição no mesmo tecido varia com a maturação e o envelhecimento. A distribuição mais aceita está resumida na Tabela 1.

T A B E L A 1

MUCOPOLISSACARÍDEO	LOCALIZAÇÃO
Ácido hialurônico	cordão umbilical, líquido sinovial, humor vítreo, cimento intercelular
Condroitin sulfato A	cartilagem, tecido conjuntivo
Condroitin sulfato B	derme, vasos sanguíneos
Condroitin sulfato C	cartilagem
Heparitin sulfato	membrana celular, citoplasma
Heparina	mastócito
Queratan sulfato	córnea, cartilagem

O papel funcional dos vários mucopolissacarídeos nos tecidos conjuntivos é ainda objeto de conjectura. Mucopolissacarídeos ligados à proteína são componentes macromoleculares da matriz intercelular do tecido conjuntivo. A estrutura fibrilar da matriz é formada pelo colágeno e os proteoglicans estão dispersos nessa malha colagenosa.⁵ Calcificação, controle de eletrólitos, lubrificação, flexibilidade, suporte e ligação entre os órgãos são algumas das funções atribuídas aos mucopolissacarídeos.⁶ Entretanto, a função específica de cada um desses compostos é ainda discutida.

Há muitos dados sobre a participação dos mucopolissacarídeos na ossificação, a maioria deles obtidos a partir de estudos histoquímicos e não físico-químicos. Apesar disso não existe concordância entre os diversos autores sobre o mecanismo do processo de ossificação e sobre a participação dos mucopolissacarídeos nesse processo. Novas técnicas experimentais precisarão ser empregadas para elucidar este mecanismo.⁷

A importância dos mucopolissacarídeos pode ser compreendida pela extensão das alterações clínicas que ocorrem nas mucopolissacaridoses.

1.4 Mucopolissacaridoses

Mucopolissacaridoses são um grupo de doenças genéticas caracterizadas por distúrbio no metabolismo dos mucopolissacarídeos e depósito de mucopolissacarídeos em diversos tecidos.

McKusick⁸ classifica as mucopolissacaridoses em 6 síndromas, baseando-se em aspectos clínicos, genéticos e bioquímicos. Essa classificação está resumida na Tabela 2.

Entre as mucopolissacaridoses mais frequentes estão as síndromas de Hunter e Hurler, conhecidas pelo nome genérico de gargolismo. Constam da literatura vários trabalhos sobre essas síndromas que relatam deposição acentuada

e excreção urinária aumentada de condroitin sulfato B e heparitin sulfato. Em nosso laboratório fomos capazes de demonstrar que existe uma diferença bioquímica fundamental entre Hunter e Hurler. Pacientes portadores de síndromas de Hunter apresentam aumento somente na quantidade de condroitin sulfato B excretado. O heparitin é excretado em níveis normais e é quimicamente idêntico ao encontrado na urina de indivíduos normais.⁹

Recentemente 2 novas mucopolissacaridoses foram descritas.^{10,11} Ambas são caracterizadas por um aumento de excreção urinária de condroitin sulfato A.

1.5. Objetivos do trabalho e contribuições originais

Uma das maneiras de se estudar o metabolismo e função de um determinado composto é procurar numa população um erro genético onde este composto está ausente, aumentado ou quimicamente alterado. Daí a importância do estudo das mucopolissacaridoses.

Casos de síndrome de Hunter e Hurler (gargolismo) foram estudados em nosso laboratório^{9,12} mas se revelaram "sistemas muito complexos" para fornecerem informações a respeito da função dos mucopolissacarídeos.

Este trabalho relata o estudo de uma nova mucopolissacaridose, caracterizada por um condroitin sulfato C urinário pouco sulfatado. É importante assinalar que, ao contrário das mucopolissacaridoses até agora descritas, não há alteração na quantidade total de mucopolissacarídeos urinários, apesar de um defeito nítido na composição química do condroitin sulfato C.

Não existe na literatura nenhuma mucopolissacaridose envolvendo o condroitin sulfato C, portanto este caso constitui a primeira ChSO_4 C-mucopolissacaridose.

A presença de um ChSO_4 C pouco sulfatado relacionado com a platispondilia ("vértebras achatadas"), única característica clínica importante nesses pacientes, sugere um possível papel do condroitin sulfato C apenas na ossificação das vértebras. Esta hipótese foi confirmada pelo estudo dos mucopolissacarídeos de cartilagens de crescimento de vértebras e de ossos longos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Reagentes e enzimas

Condroitins sulfatos A e C foram obtidos da Miles Laboratories, Inc. (Elkhart, Indiana, E.U.A.) e ácido hialurônico da Sigma Chemical Co. Queratan sulfato foi isolado de córnea bovina de acordo com o método de Meyer e colaboradores.¹³

Galactosamina e glicosamina foram obtidas da British Drug House (B.D.H.).

Sulfato radioativo (^{35}S) foi obtido do Instituto de Energia Atômica (I.E.A.), São Paulo, S.P

Agarose é de proveniência da L'Industrie Biologique Française, Gennevilliers, Sena, França.

Condroitinases AC e ABC foram adquiridas de Miles Laboratories, Inc. (Elkhart, Indiana, E.U.A.).

Heparinase e heparitinasas de células de *Flavobacterium heparinum* foram preparadas como descrito por Dietrich.¹⁴

Sulfotransferases foram preparadas a partir de embrião de galinha de acordo com o método descrito por Meezan e Davidson.¹⁵

2.2. Extração de mucopolissacarídeos da urina

Mucopolissacarídeos urinários de indivíduos normais e de portadores de platispondilia foram preparados por precipitação com cetiltrimetilamônia de acordo com método de Meyer e colaboradores,¹⁶ após diluição da urina com meio volume de água destilada.

2.3. Extração de mucopolissacarídeos de cartilagem

Cartilagens de crescimento de fêmur, úmero e vértebra (região tóraco-lombar foram obtidas 12 horas após o óbito, de pacientes sem condrodistrofias e conservadas por 48 horas a 5°C em acetona. O macerado de cartilagem (1 g.) foi ressuspenso em 100 ml de tampão Tris-HCl, pH 8,0. 20 mg de tripsina foram adicionadas à solução e incubada por 24 horas a 37°C. A seguir, 20 mg de pronase foram adicionados à mesma solução e incubada por outras 24 horas a 37°C. Após a hidrólise enzimática o pH da solução foi ajustado para 11,0 pela adição de NaOH e mantido por 8 horas à temperatura ambiente com agitação. O pH foi ajustado para 6,0 e a mistura foi centrifugada. Ao sobrenadante foram adicionados 1,5 volumes de etanol e conservado por 24 horas a 5°C. O precipitado foi obtido por centrifugação, ressuspenso em 5 ml de água destilada e dialisado contra água destilada durante 8 horas à temperatura ambiente. O dialisado foi precipitado com 2,0 volumes de etanol por 24 horas a 5°C, centrifugado e o precipitado final foi seco a vácuo.

2.4. Electroforese e cromatografia

Microelectroforese em gel de agarose tampão barbital sódico 0,06 M pH 8,6 (Dietrich e Dietrich, 4) foi usada para identificação parcial dos mucopolissacarídeos.

Electroforese em acetato de celulose foi empregada para separar ChSO_4 A e C, utilizando tampão acetato de cobre (Hata e Nagai, 17).

Electroforese dos produtos de degradação dos mucopolissacarídeos foi efetuada em papel de cromatografia Whatman n.º 3 MM em tampão piridina-acetato 0,3 M, pH 4,5 sob uma tensão de 10

V/cm durante 3 horas. Os produtos foram detectados por nitrato de prata.

Solvente A (butanol-1-ácido acético-hidróxido de amônio, 2:3:1, v/v), Solvente B (butanol-piridina-água, 3:2:1, 5, v/v) foram empregados para cromatografia descendente em papel Whatman n.º 1. Os compostos foram detectados por nitrato de prata.

2.5. Fracionamento dos mucopolissacarídeos

Fracionamento dos mucopolissacarídeos urinários foi efetuado por electroforese em gel de agarose em larga escala, tampão barbital sódico, 0,06 M, pH 8.6 (Dietrich e colaboradores, 18).

Os mucopolissacarídeos também foram separados por cromatografia de troca iônica em Dowex-1 forma cloreto, por eluição "stepwise" com concentrações crescentes de NaCl.

2.6. Preparação dos dissacarídeos

A preparação dos dissacarídeos foi feita pela incubação de 0,1 U.I. de condroitinase AC com 5 mg de mucopolissacarídeo urinário e separado de acordo com Suzuki e colaboradores.¹

2.7. Preparação de fosfoadenosilfosfossulfato (PAPS)

Fosfoadenosilfosfossulfato (PAPS) marcado foi preparado de acordo com o método de Robbins¹⁹ e fracionado dor electroforese em papel, tampão acetato de sódio, 0,05 M pH 8,0, localizado por luz ultravioleta e eluído com água destilada.²⁰

2.8. Incorporação de $^{30}\text{SO}_4$ nos mucopolissacarídeos

Mistura contendo 150 μg de mucopolissacarídeo, 20 μl de sulfotransferase e

300.000 cpm de PAP³⁵S (volume final = 40 μl) foi incubada por 3 horas a 37°C. Mucopolissacarídeos foram separados dos outros compostos radioativos por cromatografia no solvente A.

2.9. Outros métodos

Peso molecular foi estimada por electroforese em gel de poli(acrilamida).^{21,22}

Aminoaçúcares foram dosados, após hidrólise ácida em HCl 4 N durante 6 horas a 100°C, por uma modificação da reação de Elson-Morgan.²³

Plicosamina e galactosamina foram dosadas por cromatografia no solvente B, após o mesmo tipo de hidrólise ácida, reveladas por nitrato de prata e quantificadas por densitometria (Canalco Model G, computer microdensitometer). O erro do método é ao redor de 6,2%. Os percentuais de hexosamina nos mucopolissacarídeos de algumas amostras também foram determinados por analisador de aminoácidos da Beckman Modelo 120-C. Os resultados assim obtidos foram comparáveis àqueles obtidos pela densitometria dos cromatogramas.

Ácido urônico foi dosado pelo método de Dische.²⁴

Sulfato foi dosado após hidrólise em HCl 8 N durante 6 horas a 100°C, por uma modificação do método de Dodgson.²⁵

3. RESULTADOS

3.1. Observações clínicas

Exame clínico, testes laboratoriais de rotina e exame radiológico foram utilizados no estudo dos 4 irmãos afetados (2 ♂ e 2 ♀). Retardo de crescimento era a principal queixa quando procuraram o Ambulatório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da FMUSP. O desenvolvimento foi normal até a idade de 5-6 anos quando apresentaram um de-

ficat de crescimento em relação aos seus 4 irmãos não afetados. Este deficit de crescimento era devido a um tórax curto. O estudo radiológico revelou uma diminuição generalizada da altura dos corpos vertebrais (platispondilia). Irregularidades dos discos vertebrais, mais evidente na região tóraco-lombar, também foram observadas no estudo radiológico, sem qualquer anormalidade da pelve e dos ossos longos. O intelecto era normal nos 4 irmãos afetados. A Tabela 3 resume alguns dos dados obtidos no exame clínico desses pacientes.

A síndrome de Morquio também apresenta platispondilia generalizada. A diferenciação com o nosso caso foi feita pela ausência de opacificação da córnea, de displasias epifisárias e de excesso de excreção urinária de queratan sulfato na urina desses pacientes.

Baseado nos dados clínicos, esta síndrome parece ser genética, autossômica recessiva, guardando algumas semelhanças com aquela descrita por Maroteaux como Braquiolmia.²⁶ No entanto não existe na literatura qualquer relato sobre alteração de mucopolissacarídeos na braquiolmia.

3.2. Características dos mucopolissacarídeos urinários normais

Mucopolissacarídeos urinários normais são excretados numa concentração aproximada de 10-30 mg por litro de urina. A microelectroforese em gel de agarose desses compostos apresentou pelo menos 3 bandas de migração electroforética bem distintas (Figura 2). As urinas de 50 indivíduos normais, analisadas separadamente, mantiveram esse padrão constante. Essas bandas principais foram fracionadas por electroforese em gel de agarose em larga escala (Figura 2).

O conteúdo de sulfato, hexosamina, glicosamina galactosamina, acetato urônico e poder rotatório específico de ca-

da uma das frações purificadas estão apresentados na Tabela 4. A fração 2 contém praticamente só glicogamina. Este dado ligado ao da rotação óptica dica conter essa fração heparitin sulfato. A degradação enzimática confirmou esse resultado. A presença de galactosamina como o principal amino açúcar na fração F₃, associada ao poder rotatório, é indicação da presença de ChSO₄. Os resultados da degradação enzimática demonstraram a presença de condroitins sulfatos A e C nessa fração com uma pequena quantidade de condroitin sulfato B. Nesse sistema de electroforese os ChSO₄ A e C são separados. Os resultados da análise química e a não degradação por condroitinase AC, ABC, heparinase e heparitinase sugerem ser a F₁ quarentan sulfato.

3.3. Caracterização dos mucopolissacarídeos urinários excretados na braquiolmia

A microelectroforese em gel de agarose dos mucopolissacarídeos urinários dos 4 irmãos portadores de braquiolmia revelou a presença de um composto polidisperso, encobrindo a banda do heparitin sulfato (F₂ do normal). A migração electroforética de seu maior componente mostrou ser inferior à dos condroitins sulfato A e C normais, o que permitiu uma melhor visualização do condroitin sulfato B (Figura 3). Esse mucopolissacarídeo anormal é susceptível à ação da condroitinase AC.

Fracionamento em coluna de Dowex-1, eluída com concentrações crescentes de NaCl 0,50 M à 4,00 M) revelou que os mucopolissacarídeos dos portadores de braquiolmia são menos retidos na coluna, ou seja, eluídos com concentrações menores de NaCl quando comparados com o padrão de eluição obtido para os mucopolissacarídeos urinários normais (Figura 4).

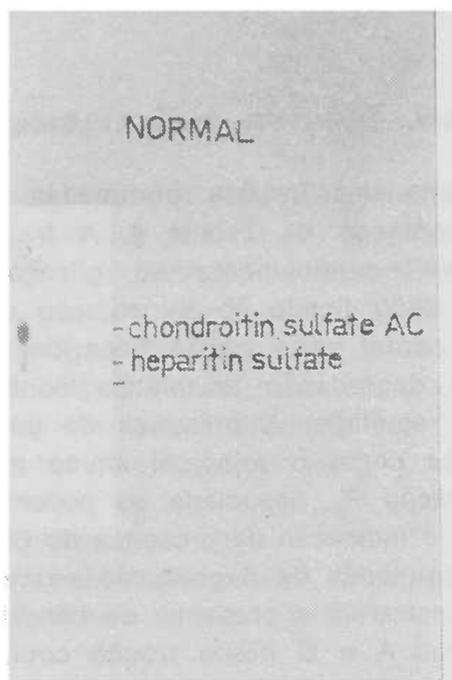


Figura 2 — Microeletroforese em gel de agarose das frações de mucopolissacarídeos urinários normais obtidas através de eletroforese em gel de agarose em larga escala. 20 μ g de mucopolissacarídeo foram aplicados no gel.

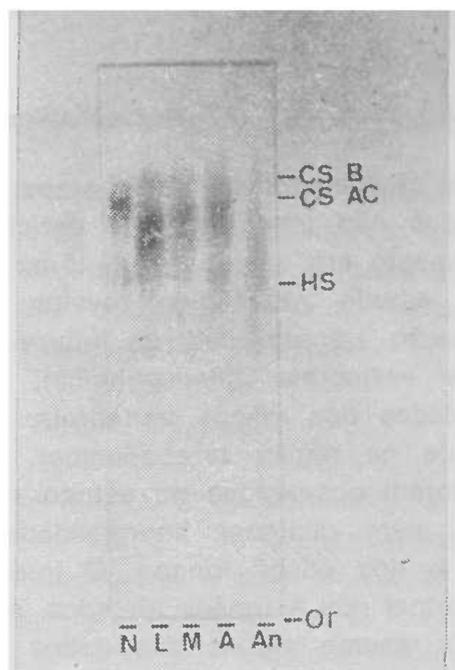


Figura 3 — Microeletroforese em gel de agarose dos mucopolissacarídeos urinários. CS B — condroitin sulfato B; CS AC — condroitin sulfato AC; HS — heparitin sulfato; O — origem; N — normal («pool» de 40 indivíduos); L, M, A, Am — mucopolissacarídeos dos pacientes.

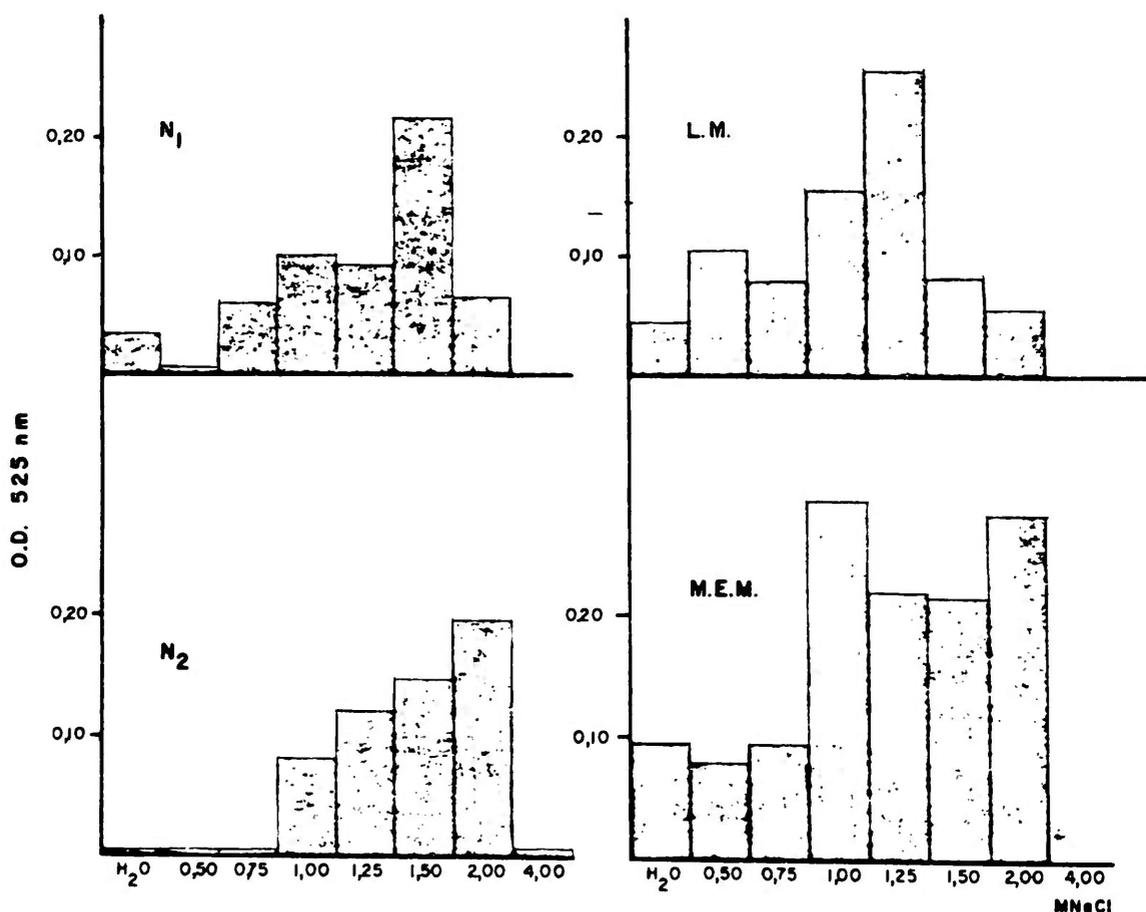


Figura 4 — Fracionamento dos mucopolissacarídeos urinários em DOWEX-1. Cerca de 4 mg de mucopolissacarídeos urinários de 2 diferentes «pool» de indivíduos normais e de 2 pacientes foram aplicadas numa coluna de DOWEX 1 — C1 — (0,7 x 10 cm) e eluídas com 8 ml de cloreto de sódio em diferentes concentrações. 200 μ l do material eluído foi usado para a reação com carbazol.

A alteração da migração electroforética e o padrão de eluição na coluna de Dowex-1, sugerem ou uma alteração da massa molecular deste mucopolissacarídeo ou uma alteração na sua carga relativa (grupos sulfatos ou carboxilas). Determinações da massa molecular dos mucopolissacarídeos demonstraram não haver nenhuma diferença significativa entre a massa molecular dos condroitins sulfatos dos afetados massa molecular média: 14.000) e dos indivíduos normais massa molecular média: 11.000). Portanto, os resultados sugerem uma alteração na carga desses compostos.

Fracionamento por electroforese em larga escala em gel de agarose dos mucopolissacarídeos urinários da braquiolmia, forneceu 3 frações distintas (Figura 5). Através da degradação enzimática pela condroitinase AC e análise dos produtos formados por electroforese em papel, observou-se formação de quantidade considerável de um produto com metade da migração electroforética dos dissacarídeos normais dos condroitins sulfatos A e C (Δ Di 4S) e (Δ Di 6S). A fração 1, de menor migração electroforética em agarose, foi a que formou este produto em maior quantidade. Esse composto de menor migração electroforética pode ser um dissacarídeo não sulfatado que está sendo formado por ação da condroitinase AC sobre ácido hialurônico ou sobre um condroitin pouco sulfatado.

O mucopolissacarídeo restante em F_1 após degradação com condroitinase AC mostrou ser heparitin sulfato, com todas as características do heparitin sulfato encontrado na urina de indivíduos normais (F_2 do normal).

A cromatografia em papel no solvente A dos produtos de degradação dos mucopolissacarídeos normais pela condroitinase AC revelou dois compostos principais: o Δ Di 4S (proveniente do ChSO_4 A) e o Δ Di 6S (proveniente do ChSO_4 C) e quantidades mínimas (1-5%)

do dissacarídeo insaturado não sulfatado (Δ Di OS). Os mucopolissacarídeos dos portadores de braquiolmia tratados pela mesma enzima apresentaram um aumento intenso de Δ Di OS (50% em um dos casos). Esse dissacarídeo não sulfatado poderia ser formado a partir de condroitin pouco sulfatado ou de ácido hialurônico. Entretanto, o dissacarídeo proveniente do ácido hialurônico tem uma migração cromatográfica maior (Figura 6).

Preparação em larga escala dos produtos formados pela condroitinase AC sobre os mucopolissacarídeos urinários e a análise química desses produtos permitiu a caracterização dos 3 dissacarídeos. A presença de galactosamina no dissacarídeo não sulfatado confirmou sua origem a partir de condroitin sulfato e não de ácido hialurônico. A Tabela 5 resume esses dados.

A proporção dos dissacarídeos formados pela condroitinase AC sobre os mucopolissacarídeos urinários normais e dos indivíduos afetados está mostrada na Tabela 6. Os indivíduos afetados apresentaram um aumento intenso de Δ Di OS (chegando a 50% em um dos casos) e diminuição proporcional do Δ Di 6S. O Δ Di 4S permaneceu em percentagens normais. Esses dados indicam uma deficiência de sulfatação do condroitin sulfato C (condroitin 6 sulfato).

Não há aumento na excreção urinária de mucopolissacarídeos nos indivíduos afetados (Tabela 6).

3.4. Incorporação de "sulfato ativado" nos mucopolissacarídeos por sulfotransferases de embrião de galinha e de soro humano

Condrosulfotransferases são enzimas responsáveis pela transferência de sulfato a partir do fosfoadenosilfosfosulfato (PAPS) ou "sulfato ativado" para as

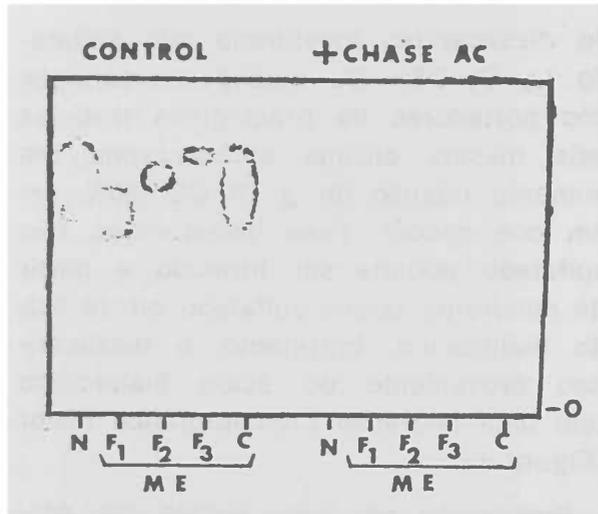


Figura 5 — Frações dos mucopolissacarídeos urinários dos portadores de Braqui-olmia. O fracionamento foi feito por eletroforese em gel de agarose em larga escala. F₁ — heparitin sulfato e condroitin sulfato C anormal; F₂ — condroitin sulfato AC; F₃ — condroitin sulfato B; N — mucopolissacarídeos urinários normais; ME — mucopolissacarídeos urinários de um dos pacientes.

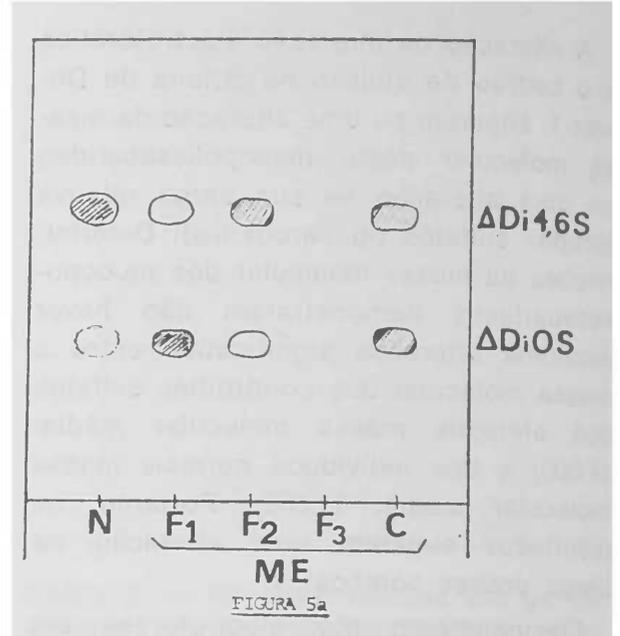


Figura 5a — Eletroforese em papel dos produtos formados pela ação da condroitinase AC sobre as frações de mucopolissacarídeos urinários. Revelação com nitrato de prata.

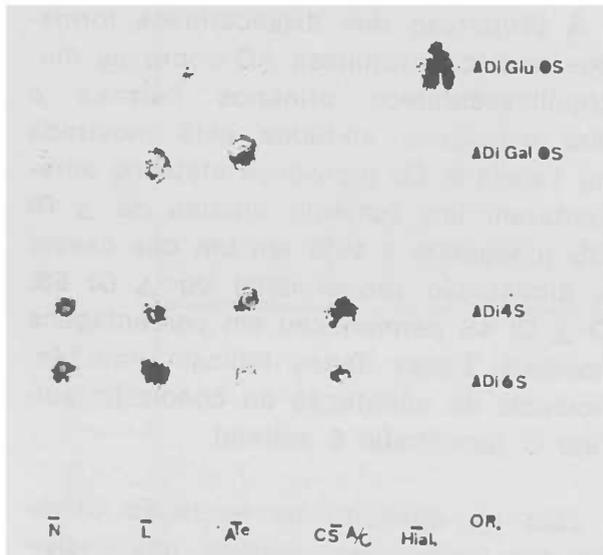


Figura 6 — Cromatografia em papel dos dissacarídeos formados pela ação da condroitinase AC sobre os mucopolissacarídeos urinários. 100 μg de mucopolissacarídeo urinário de um «pool» de 40 indivíduos normais (N); de 2 pacientes (L, Ate); condroitin sulfato AC (Ch A/C) e ácido hialurônico (Hial) foram incubados com condroitinase AC. OR — origem; ΔDi Gal OS — dissacarídeo insaturado não sulfatado contendo gaactose; ΔDi Glu OS — dissacarídeo insaturado não sulfatado do ácido hialurônico.

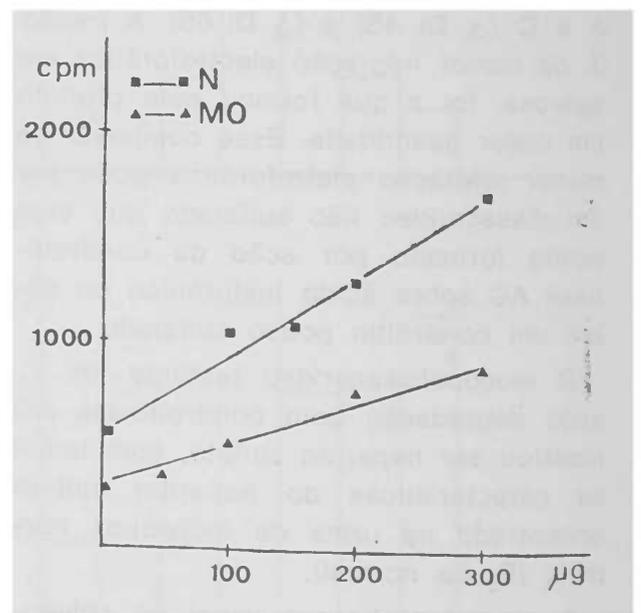


Figura 7 — Condroitin sulfato A como acceptor de sulfotransferase de soro humano. Condroitin sulfato A e PAP^{35S} (100.000 cpm) foram incubados com soro de indivíduos normais e de um dos pacientes. O ^{35S}SO₄ incorporado ao mucopolissacarídeo foi medido como descrito no texto.

posições 4 e 6 da N-acetil galactosamina. Na braquiolmia, caracterizada por um ChSO_4C urinário pouco sulfatado, esperamos encontrar uma deficiência de 6-sulfotransferase ou ChSO_4C -sulfotransferase.

O condroitin sulfato urinário desses pacientes incubado com sulfotransferase de embrião de galinha e PAPS marcado (^{35}S), mostrou ser melhor acceptor de sulfato (até 10 vezes em um dos casos) do que o condroitin sulfato urinário normal ou mesmo o condroitin sulfato de tecido (Tabela 7). Este resultado é mais uma confirmação sobre a deficiência de sulfatação do condroitin sulfato desses pacientes. Dos mucopolissacarídeos urinários, o melhor acceptor de sulfato foi o heparitin sulfato.

Degradação enzimática pela condroitinase AC dos mucopolissacarídeos sulfatados pela sulfotransferase (mucopolissacarídeo radioativo) demonstrou que os condroitins sulfatos A e C incorporam $^{35}\text{SO}_4$ nas posições 4 e 6 da N-acetil galactosamina (Tabela 8). Apesar de demonstrada a existência de 2 enzimas — 4 e 6 sulfotransferases^{27,28} — os condroitins sulfatos A e C não são aceptores “específicos” para essas enzimas, ou seja, são sulfatados indiferentemente nas posições 4 e 6. Mesmo o condroitin sulfato C urinário, excretado na braquiolmia também incorpora $^{35}\text{SO}_4$ na posição 4 em quantidade considerável. Para a maioria dos autores, a porção proteica da molécula de proteoglican é que determina a “especificidade” das sulfotransferases.²⁹ Os condroitins sulfatos urinários e os comerciais já não apresentam a porção proteica do proteoglican, perderam, portanto, a “especificidade”

Presença de sulfotransferases no soro humano foi demonstrada por Adams.³⁰ A presença do condroitin sulfato C pouco sulfatado sugere uma possível deficiên-

cia de 6-sulfotransferase ou ChSO_4C -sulfotransferase nesses pacientes. Usando condroitin sulfato A e C comercial como substratos para as sulfotransferases, o soro desses pacientes apresentou uma deficiência relativa de condrosulfotransferases quando comparados aos irmãos normais de idade semelhante (Figuras 7 e 8). Entretanto, ainda é necessário investigar se a deficiência é de 6-sulfotransferase ou de 4-sulfotransferase ou de ambas.

3.5. Conteúdo de condroitin sulfato A e condroitin sulfato C nas cartilagens de crescimento das vértebras e dos ossos longos

Deficiência no crescimento dos corpos vertebrais (platispondilia) é a única característica clínica importante na braquiolmia. Não há alteração importante no crescimento dos ossos longos. Portanto, o condroitin sulfato C alterado deve ser importante apenas na ossificação das vértebras, não representando papel importante na ossificação dos ossos longos.

Mucopolissacarídeos extraídos das cartilagens de crescimento dos corpos vertebrais e dos ossos longos (úmero e fêmur) obtidas de indivíduos sem qualquer alteração óssea foram analisados por degradação enzimática pela condroitinase AC. Vértebras mostraram uma concentração maior de condroitin sulfato C. Para os ossos longos o condroitin sulfato A foi o mucopolissacarídeo encontrado em maior quantidade (Tabela 9). Electroforese em acetato de celulose (tampão: acetato de cobre) confirmou os resultados obtidos pela degradação com condroitinase AC (Figura 9).

Condroitin sulfato foi praticamente o único mucopolissacarídeo encontrado nas cartilagens de crescimento dos ossos longos (95% de galactosamina). As

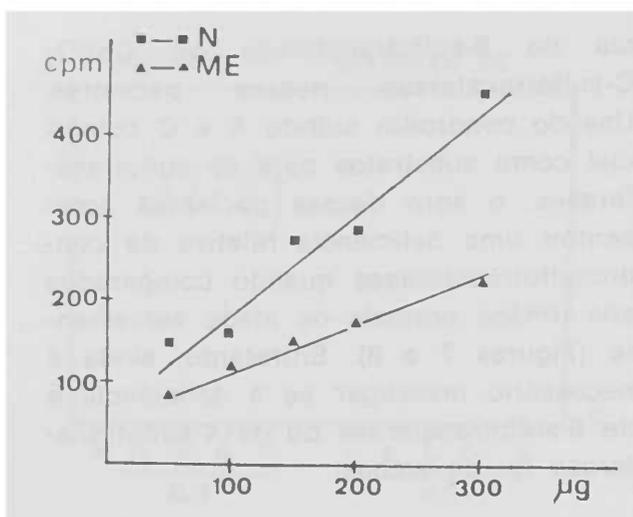


Figura 8 — Condroitin sulfato C como acceptor de sulfotransferase de soro humano.

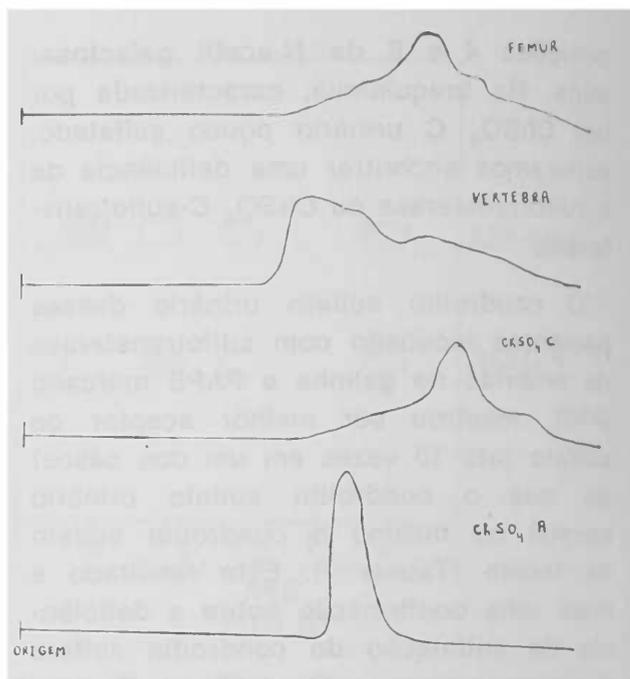


Figura 9 — Eletroforese em acetato de celulose dos mucopolissacarídeos das cartilagens de crescimento de vertebra e femur. 100 µg de mucopolissacarídeo foram usados na eletroforese. Coloração com azul de toluidina. Densimetria dos «spots» no microdensímetro Conalco modelo G à 560 mm.

Ch SO₄ A — condroitin sulfato A.
Ch SO₄ C — condroitin sulfato C.



**«A FARMACIA MAIS COMPLETA E ANTIGA DO BRASIL»
FUNDADA EM 1858**

MANIPULAÇÃO DE RECEITAS
SAIS E PRODUTOS QUÍMICOS
PRODUTOS FARMACÊUTICOS
PLANTAS MEDICINAIS
PERFUMARIA

Rua São Bento, 220 - Tel.: 33-3975, 239-2157 - São Paulo

controle seguro e eficaz
da **inflamação...**
*independente da
duração ou
localização*



CELESTONE*

(betametasona)

no tratamento durante anos...
ou apenas por alguns dias

Schering

BRASIL
AFILIADA DE
SCHERING CORPORATION U.S.A.
CET-S 522772 A

Apresentações
do
CELESTONE*

comprimidos
gotas
elixir
injetável
soluspan
colírio
unguento oftálmico

Copyright © 1973 - Schering Corporation, Bloomfield, New Jersey U.S.A. * Marca Registrada

**A partir
dos 40**



**LINHA
GERIÁTRICA | MERCK**

Encefabol[®]

Esclerovitan[®]

Gerontabol-Merck

Gerontavit[®]

Pasuma[®]

Reactivan[®]

**Preparados à base de princípios ativos
vitalizantes, especificamente dirigidos
às pessoas maduras e senescentes**

MERCK

vértebras mostraram, além de condroitin sulfato, 15-20% de mucopolissacarídeo contendo glicosamina.

Esses resultados sugerem um mecanismo diferente na diferenciação e ossificação das vértebras e dos ossos longos. Até então poucos estudos tinham sido feitos sobre o papel dos diferentes mucopolissacarídeos na ossificação. Excetuando o trabalho de Suzuki, que relata a participação do condroitin sulfato A na ossificação do fêmur,³¹ nenhum outro trabalho foi encontrado sobre o assunto.

4. SUMÁRIO

Uma nova mucopolissacaridase envolvendo o condroitin sulfato C foi descrita neste trabalho, sendo caracterizada por um condroitin sulfato C urinário quimicamente anormal (pouco sulfatado), apesar de excretado em níveis normais.

Foram encontradas diferenças no conteúdo de condroitins sulfatos A e C nas cartilagens de crescimento de vértebras e ossos longos, estando de acordo com os dados clínicos dos pacientes portadores desta ChSO_4 C-mucopolissacaridose.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

Todas as mucopolissacaridoses descritas são caracterizadas por um aumento

na excreção urinária de mucopolissacarídeos. Este caso apresenta mucopolissacarídeos urinários em níveis normais, apesar de alterados estruturalmente. Possivelmente, estudando mucopolissacarídeos urinários de pacientes com deformidades ósseas genéticas, mesmo quando excretados em níveis normais, utilizando os métodos aqui descritos, será possível encontrar outras alterações estruturais dos mucopolissacarídeos. Relacionando-as com as alterações clínicas poderemos obter novos dados sobre o metabolismo e função desses compostos.

Novos dados sobre diferenças no processo de ossificação de vértebras e ossos longos provavelmente serão obtidos pelo estudo dos proteoglicans das cartilagens de crescimento desses 2 tipos de ossos.

Deficiência de condrosulfotransferase nesta nova mucopolissacaridose é evidente (Figuras 7,8), entretanto resta esclarecer se há deficiência apenas de 6 sulfotransferase ou de ambas as sulfotransferases. O uso de proteoglicans como substrato "específico" para essas enzimas poderá ser útil nesses estudos.

AGRADECIMENTO: Agradecemos ao Dr. Sérgio P. A. Toledo, do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, pelo auxílio na obtenção dos dados clínicos dos pacientes.

BIBLIOGRAFIA

1. T. Yamagata, H. Saito, O. Habuchi and S. Suzuk, *The Journal of Biological Chemistry* 243, 1523-35 (1968)
2. C. P. Dietrich, *Biochemistry* 8, 2089 (1969)
3. C. P. Dietrich, *Can. J. Biochem.* 48, 725 (1970)
4. C. P. Dietrich e S.M.C. Dietrich, *Analytical Chemistry* 46, 209-215 (1972)
5. J. C. Pita e F. Müller, *Federation Proceedings* 32 nº 4, 1481-84 (1973)
6. A. Dorfman, *Pediatrics* 22, 576 (1958)
7. E. A. Balazs e H. J. Rogers, *The Amino Sugar*, Academic Press vol. II A, 293 (1965)
8. McKusick, *Heritable Disorders of Connective Tissue*
9. C. P. Dietrich, H. B. Nader e P.A.S. Mourão, *Biochemical Medicine*, em impressão.
10. G. R. Thompson, N. A. Nelson, C. W. Castor e S. L. Grobelney, *Annals of Internal Medicine* 75, 421-426 (1971)
11. M. Philippart e G. I. Sugarman, *The Lancet*, October 18, 1969.
12. C. P. Dietrich, H. B. Nader, P.A.S. Mourão e S.A.P. Toledo, *Biochemistry of the glycosidic Linkage* PAABS Symposium vol. 2 741-749 (1972)
13. K. Meyer, A. Linker, Davidson and Weissmann, *The Journal of Biological Chemistry* 205, 611-616 (1953)
14. C. P. Dietrich, *J. Biochem.* 111, 91 (1969)
15. E. Meezan e E. A. Davidson, *The Journal of Biological Chemistry* 242, 1685 (1967)
16. K. Meyer, M. M. Grumbach, A. Linker e P. Hoffmann, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 97, 275 (1958)

17. R. Hata e Y. Nagai, *Analytical Biochemistry* 45, 1462-1468 (1972)
18. C. P. Dietrich, H. B. Nader, L. R. G. Britto e M. E. Silva, *Biochim. Biophys. Acta* 237, 430-441 (1971)
19. P. W. Robbins, *Methods Enzymology* VI, 770.
20. S. Suzuki e J. L. Strominger, *The Journal of Biological Chemistry* 235, 257-266 (1960)
21. J. C. Hilborn e P. A. Anastassiads, *Analytical Biochemistry* 39, 88 (1971)
22. M. B. Mathews e L. Decker, *Biochim. Biophys. Acta* 244, 30-34 (1971)
23. C. J. M. Randle e W. T. J. Morgan, *Biochem. J.* 61, 586 (1955)
24. Z. Dische, *Journal of Biological Chemistry* 167, 189 (1947)
25. K. S. Dodgson, *Biochem. J.* 78, 312 (1961)
25. K. S. Dodgson, *Biochem. J.* 78, 312 (1961)
26. P. Maroteaux, *Birth Defects* 5, National Foundation (1969)
27. S. Suzuki, R. H. Trenn e J. L. Strominger, *Biochim. Biophys. Acta* 50, 169-170 (1961)
28. M. Momburg, H. W. Stuhlsatz, R. Kisters e H. Greiling, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 353, 1351-1361 (1972)
29. L. Rodin, *Metabolic Conjugation and Metabolic Hydrolysis* vol. 2, Academic Press (1970)
30. J. B. Adams, *Biochim. Biophys. Acta* 83, 127-129 (1964)
31. H. K. Suzuki, *J. Ark. Med. Soc.* 59, 376-378 (1963)

T A B E L A 2

CLASSIFICAÇÃO DAS MUCOPOLISSACARIDOSES (McKUSICK)

	Aspectos clínicos	Aspectos genéticos	Aspectos bioquímicos (urina)
I (Síndrome de Hurler)	opacidade da córnea; manifestações somáticas e nervosas severas	autossômica recessiva	condroitin sulfato B heparitin sulfato
II (Síndrome de Hunter)	não opacidade da córnea; manifestações somáticas e nervosas mais amenas	ligada ao cromosomo X recessiva	condroitin sulfato B heparitin sulfato
III (Síndrome de Sanfilipo)	manifestações somáticas não severas; efeitos severos sobre o sistema nervoso central	autossômica recessiva	heparitin sulfato
IV (Síndrome de Morquio)	alterações ósseas severas de tipos distintos; córnea opaca intelecto +/-, regurgitação aórtica	autossômica recessiva	queratan sulfato
V (Síndrome de Scheie)	articulações rígidas; face grotesca; córnea opaca; intelecto +/-, regurgitação aórtica	autossômica autossômica	condroitin sulfato B
VI (Síndrome de Maroteaux-Lamy)	severas alterações ósseas; alteração da córnea; intelecto normal	recessiva recessiva	condroitin sulfato B

T A B E L A 3
DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES

Caso	Idade	Sexo	Altura (cm)	Envergadura (cm)	Escoliose Lombar e Cifose Dorsal	Platispondilia generalizada
L.M.	8	♀	119	117	—	+
M.E.M.	10	♀	123	124	+	+
A.S.M.	17	♂	159	169	+	++
A.F.M.	22	♂	154	162	++	++

(—) ausente, (+) presente, (++) muito evidente

T A B E L A 4
PROPORÇÕES MOLARES DAS FRAÇÕES DOS MUCOPOLISSACARÍDEOS URINÁRIOS NORMAIS

Fração	Hexosamina Total	Clicosamina	Galactosamina	Ácido Urônico	Sulfato Total	Rotação Óptica $\alpha_{D_{20}}$
F ₁	1,0	0,80	0,20	1,47	0,27	— 7,1
F ₂	1,0	0,89	0,11	1,40	0,65	+ 82,8
F ₃	1,0	0,15	0,85	1,06	0,62	— 15,0
Hep. SO ₄	1,0	0,90	0,10	1,32	1,40	+ 45,0
ChSO ₄ AC	1,0	0,08	0,92	1,30	0,89	— 25,0

Hep. SO₄ — Heparin sulfato ChSO₄ AC — condroitins sulfatos A e C (mistura)

T A B E L A 5
PROPORÇÕES MOLARES DOS DISSACARÍDEOS DO CONDRITIN SULFATO

Composto	Hexosamina	Ácido Urônico	Sulfato	Galactosamina	Clicosamina
Δ Di 4S	1,0	1,16	0,75	1,0	0
Δ Di 6S	1,0	1,17	0,85	1,0	0
Δ Di 0S	1,0	1,22	0,16	1,0	0
ChSO ₄ AC	1,0	1,30	0,89	0,92	0,08

Δ Di 4S — dissacarídeo insaturado 4-sulfato

Δ Di 6S — dissacarídeo insaturado 6-sulfato

Δ Di 0S — dissacarídeo insaturado não sulfatado

ChSO₄AC — condroitins sulfatos A e C (mistura)

T A B E L A 6

QUANTIDADE DE DISSACARÍDEO INSATURADO FORMADO PELA AÇÃO DA CONDROITINASE AC SOBRE OS MUCOPOLISSACARÍDEOS URINÁRIOS

MPS urinário obtido de	MPS (mg/litro)	% de dissacarídeo formado pela condroitinase AC		
		Δ Di-4S	Δ Di-6S	Δ Di-0S
Normal ("pool" de 40 indivíduos)	10	37	62	1
Normal ("pool" de 10 indivíduos)*	—	36	54	7
L.M.	30	46	31	24
M.E.M.	12	38	38	23
A.S.M.	7	24	16	50
A.F.M.	10	27	25	49

* Murata e col. — Clin. Chim. Acta 28, 1 (1970)

T A B E L A 7

INCORPORAÇÃO DE ³⁵S NOS MUCOPOLISSACARÍDEOS PELAS SULFOTRANSFERASES DE EMBRIÃO DE GALINHA

	³⁵ S incorporado em MPS susceptível à ação da condroitinase AC	³⁵ S incorporado em MPS não susceptível à ação da condroitinase AC
Normal	3.673	27.217
L.M.	9.206	6.079
M.E.M.	35.351	23.174
A.F.M.	16.380	18.341
ChSO ₄ A	8.764	1.921
ChSO ₄ C	5.615	1.155

T A B E L A 8

INCORPORAÇÃO DE ³⁵S NAS POSIÇÕES 4 E 6 DA N-ACETILGALACTOSAMINA PELAS SULFOTRANSFERASES DE EMBRIÃO DE GALINHA

MPS de	Δ Di-4S	Δ Di-6S
Normal	1.065	2.608
L.M.	4.030	5.176
M.E.M.	12.633	22.718
A.F.M.	3.966	12.414
ChSO ₄ A	4.640	6.124
ChSO ₄ C	2.463	3.152

T A B E L A 9

DISSACARÍDEOS OBTIDOS PELA AÇÃO DA CONDRITINASE AC SOBRE OS MUCO-POLISSACARÍDEOS DE CARTILAGENS DE VÉRTEBRAS E OSSOS LONGOS

CASOS (idade em anos)	PRODUTOS FORMADOS PELA CONDRITINASE AC (%)											
	VÉRTEBRA					FÊMUR					ÚMERO	
	Δ Di-6S	Δ Di-4S	Δ Di-6S	Δ Di-4S	Δ Di-6S	Δ Di-4S	Δ Di-6S	Δ Di-4S	Δ Di-6S	Δ Di-4S	Δ Di-6S	Δ Di-4S
A (1)	62	38	35	65	—	—	—	—	—	—	—	—
B (3)	75	25	15	85	—	—	—	—	—	—	—	—
C (3)	86	14	64	36	—	—	—	—	—	—	—	—
D (4)	85	15	—	—	—	—	—	—	—	46	54	54
E (5)	79	21	45	55	42	58	42	58	42	58	58	58
Média	77.4	22.6	39.8	60.2	44	56	44	56	44	56	56	56
Relação Δ Di-6S/Δ Di-4S	3.4		0.7		0.8							

Beminal*

Garantia de uma
terapêutica adequada
de Fatores do
Complexo B + Vitamina C

1 COMPRIMIDO DIÁRIO

é o suplemento indispensável dos portadores de

**HEPATOPATIAS • DIABETES MELLITUS
PERTURBAÇÕES NEUROPSÍQUICAS
DOENÇAS PARASITÁRIAS E INFECCIOSAS**

Apresentação — Frasco com 30 comprimidos revestidos

