

GLICOSAMINOGLICANOS PLASMÁTICOS EM PORTADORES DE CORONARIOPATIA E HIPERLIPIDEMIA

SÉRGIO DIOGO GIANNINI, CÉLIA MARIA CASSARO STRUNZ, NEUSA FORTI,
ROSELI DE ALENCAR CREDIDIO, JAYME DIAMENT, BRAINA ESTER DEREVIACKI,
JOSÉ MARCOS DE GÓIS, LUIS GASTÃO DE SERRO-AZUL

Com o objetivo de verificar se as concentrações séricas de lípides sanguíneos influenciam quantitativa e/ou qualitativamente os glicosaminoglicanos (GAG) circulantes, os autores analisaram essas substâncias em 14 indivíduos hiperlipidêmicos (13 com hiperlipidemia mista e 1 com hipercolesterolemia) tendo como controle 12 indivíduos normolipidêmicos (6 acima e 6 abaixo de 40 anos).

Os GAG foram estudados em relação a seu teor de sulfatação (GAG-HS-altamente sulfatados; GAG-LS-com baixa sulfatação) e pela separação e quantificação de seus componentes dermatan, heparan e condroitin sulfatos (condroitin 4 e condroitin 6-sulfato).

Não foram observadas diferenças significativas dos GAG e de suas frações quando confrontados indivíduos normo e hiperlipidêmicos tanto do ponto de vista quantitativo quanto qualitativo. Também não foram observadas relações de dependência entre os valores das variáveis do perfil lipídico e das frações de GAG. Os autores concluem que os fatores ambientais e/ou genéticos que determinam elevação dos lípides circulantes não atuam sobre os GAG plasmáticos.

É reconhecida a participação dos glicosaminoglicanos (GAG) na aterogênese¹, tendo sido demonstrada interação entre GAG e lipoproteínas (LP) na parede arterial e "in vitro"^{2,3}. São muito raros os trabalhos que analisam os GAG plasmáticos devido à complexidade das técnicas para seu fracionamento e os publicados^{4,5} não investigaram eventuais relações qualitativas e/ou quantitativas dessas substâncias com as diversas frações lipídicas. Estudos que relacionam GAG e LP são de interesse, pelas possíveis implicações patogênicas na aterosclerose, razão pela qual planejamos esta pesquisa, utilizando indivíduos sabidamente normo e hiperlipidêmicos, estes últimos portadores de doença aterosclerótica coronária.

MATERIAL E MÉTODOS

Níveis sanguíneos de GAG foram determinados em 12 indivíduos normolipidêmicos e em 14 hiperlipidêmicos. Os normolipidêmicos eram clinicamente normais e foram separados em dois grupos em função da idade (abaixo e acima de 40 anos)*: grupo A composto

Essa separação baseouse nos achados de Singh e col.⁵ que encontraram diferenças nas frações de GAG quando comparadas faixas etárias de 18 a 40 anos, embora sem diferença entre sexos

por 3 homens e 3 mulheres, com idades entre 19 e 31 anos (média 26,9) e grupo B formado por 6 mulheres de 42 a 66 anos (média 52,6).

Os pacientes hiperlipidêmicos (grupo C) eram portadores de coronariopatia aterosclerótica, confirmada por cinecoronariografia. Havia 11 homens e 3 mulheres, com idades entre 39 e 60 anos (média 49,9), sendo que 13 apresentavam elevação simultânea de colesterol e de triglicérides séricos (hiperlipidemia mista) e 1 apenas do colesterol (hipercolesterolemia).

As amostras de sangue eram obtidas após jejum de 12 a 14 horas, determinando-se os níveis (mg/dl) do colesterol total (CT) e dos triglicérides (Tg), por métodos enzimáticos^{6,8} e da fração (HDL-col) pelo método Wenick-Albers⁸. Indiretamente, através dessas, quando Tg < 400 mg/dl, calcularam-se os

valores de VLDL-colesterol = $\frac{Tg}{5}$ e de LDL-colesterol = CT - (HDL - col. + VLDL-col)⁹

Para a análise dos GAG, foi usado o método de Calatroni e col.⁴, separando-se duas frações: uma de adsorção muito rápida (fração livre, altamente sulfatada - GAG-HS) e outra da adsorção lenta (fra-

DISCUSSÃO

ção ligada, de baixa sulfatação - GAG-LS), ambas qualificadas através da dosagem de ácido hexurônico contido em cada fração, sendo os resultados expressos em $\mu\text{g}/10\text{m}1$. Foi calculada também a relação GAG-HS/GAG-LS.

Para a identificação dos diferentes tipos de GAG contidos no plasma (condroitin, condroitin 4 e 6, heparan e dermatan sulfatos), utilizaram-se: a) migração eletroforética em gel de agarose¹⁰ ou em fitas de acetato de celulose¹¹; b) degradação enzimática com mucopolissacaridasases específicas¹².

Comparações entre grupos, para as diferentes variáveis, foram feitas por análise de variância simples e eventuais correlações entre GAG e frações lipídicas foram investigadas através da determinação do coeficiente de correlação de Pearson (r), adotando-se o nível de significância de 0,05.

RESULTADOS

A) Dados Quantitativos - Os valores obtidos para as diferentes variáveis nos três grupos constam das tabelas I e II. As médias e os desvios-padrão estão nas tabelas III e IV.

A análise de variância mostrou inexistirem diferenças significativas entre os grupos A, B e C para GAG-HS e GAG-LS, pois foram obtidos respectivamente valores de $F=0,64$ (F crítico = 3,42) e $F=0,41$ (F crítico = 3,42). Também não foram observadas diferenças significativas entre os grupos no que se refere aos valores da relação GAG-HS/GAG-LS ($F=0,93$, F crítico = 3,42).

A determinação dos coeficientes de correlação (r) confrontando variáveis do perfil lipídico e frações dos GAG não revelou nenhuma relação de dependência entre elas.

B) Dados Qualitativos - Nas frações GAG-HS e GAG-LS identificaram-se os mesmos componentes: heparan, dermatan e condroitin sulfatos, sendo o condroitin 4-sulfato o principal componente.

O teor de GAG da camada intima das artérias e o nível de lípidos circulantes eleva-se progressivamente com o envelhecimento^{2,13}. Esse gradativo aumento na proporção de ambas as substâncias poderia desempenhar algum papel na aterogênese, pois está demonstrada sua interação "in vitro"³, como na parede arterial². De fato, através de diferentes mecanismos¹, sabe-se que os GAG-e as LP se unem formando complexos estáveis na parede arterial e "in vitro".

As dificuldades metodológicas para análise simultânea dos GAG intra-arteriais e lípidos circulantes fizeram. nosso interesse voltar-se para a determinação conjunta dessas substâncias no meio circulante. Deve-se ressaltar que a baixa concentração dos GAG plasmáticos foi sempre obstáculo técnico para sua determinação. Entretanto, Calatroni e col.⁴ descreveram um método que tornou mais viável essa dosagem, porém, ainda com grandes dificuldades técnicas. Utilizando esse método, Singh e col.⁵ observaram não haver diferenças entre os sexos e faixas etárias, com exceção da relação GAG-HS/GAG-LS, que foi significativamente mais elevada em indivíduos acima de 40 anos de idade. No entanto, não foram avaliados os valores de lípidos circulantes.

Nas pesquisas publicadas até o presente, não há referência sobre relações de GAG circulantes com os lípidos séricos. Dirigidos fundamentalmente a esse aspecto, nosso trabalho demonstra que GAG plasmáticos não diferiram qualitativa nem quantitativamente quando se comparou o grupo hiperlipidêmico com o normolipidêmico, independentemente do grupo etário. Além disso, não houve correlação estatisticamente significativa entre os GAG e as frações lipídicas.

Paralelamente, os valores de GAG plasmáticos nos normolipidêmicos não diferem entre os indivíduos abaixo e acima de 40 anos mesmo para a rela-

TABELA I - Grupos controles. Valores das diferentes frações do perfil lipídico e dos glicosaminoglicanos.

Variáveis	Perfil lipídico (mg/dl)							Glicosaminoglicanos					
	Pac. n.º	Idade (anos)	Colesterol Total	Triglicérides	HDL-col	LDL-col	VLDL-col	GAG-HS*	GAG-LS*	GAG-LS	Total	CS**	C4S**
Grupo											%	%	
A	1	26	164	77	33	116	15	4,4	46,1	0,09	50,5	100,0	100,0
	2	31	198	92	45	135	18	28,7	37,9	0,75	66,6	100,0	51,2
	3	29	184	133	35	122	27	13,5	63,8	0,21	77,3	100,0	100,0
	4	26	140	56	42	87	11	18,3	53,7	0,34	72,0	79,7	56,1
	5	30	164	71	39	111	14	16,8	65,1	0,25	81,9	66,3	100,0
	6	19	141	48	58	73	10	12,2	49,0	0,24	61,2	88,1	100,0
B	1	66	214	57	53	150	11	25,2	54,9	0,45	80,1	100,0	53,3
	2	45	176	129	44	106	26	34,2	36,6	0,93	70,8	100,0	100,0
	3	50	207	170	44	129	34	13,2	35,1	0,37	48,3	100,0	100,0
	4	57	220	132	43	151	26	26,4	53,6	0,49	80,1	100,0	100,0
	5	42	129	64	46	70	13	19,5	35,1	0,43	64,6	100,0	78,9
	6	56	240	46	54	177	9	9,7	45,3	0,21	55,0	67,3	100,0

* GAG-HS e GAG-LS – Glicosaminoglicanos altamente e pouco sulfatados, respectivamente. Valores expressos em μg de ácido hexurônico / 10 ml de plasma; ** CS e C4S – Condroitin-sulfato e condroitin-4-sulfato, respectivamente. Valores expressos em concentração relativa, obtidos a partir de densitografia no padrão eletrorético, em acetato de celulose.

TABELA II - Grupo C. Valores das diferentes trações do perfil lipídico e dos glicosaminoglicanos.

ente	Variáveis		Perfil lipídico (mg/dl)				Glicosaminoglicanos					
	Idade (anos)	Colesterol total	Triglicérides	HDL-col	LDL-col	VLDL-col	GAG-HS*	GAG-LS*		Total *	CS** %	C4S** %
								GAG-LS	GAG-LS			
1	52	369	548	41	-	-	9,9	87,8	0,11	97,7	100,0	70,2
2	53	399	374	39	285	75	28,7	60,4	0,47	89,1	100,0	69,9
3	41	293	398	43	170	80	10,4	40,1	0,25	50,5	100,0	50,2
4	41	288	341	35	185	68	50,5	66,8	0,75	117,3	69,6	68,7
5	53	308	278	31	222	56	19,3	46,0	0,41	65,3	100,0	100,0
6	55	358	927	27	-	-	27,8	62,9	0,44	90,7	100,0	100,0
7	47	435	626	16	-	-	27,9	33,7	0,82	61,6	72,2	51,9
8	39	399	372	24	301	74	23,5	45,8	0,51	69,3	80,1	89,7
9	60	327	192	51	238	38	7,7	24,1	0,31	31,8	100,0	60,5
10	53	386	185	54	295	37	22,2	64,2	0,34	86,4	100,0	100,0
11	58	305	332	34	205	66	30,5	39,0	0,78	69,5	74,3	57,0
12	44	348	125	37	286	25	9,3	29,5	0,31	38,8	65,8	100,0
13	45	342	228	34	262	46	14,0	43,4	0,32	57,4	79,7	100,0
14	59	362	527	22	-	-	13,5	51,4	0,26	64,9	71,8	100,0

* GAG-HS e GAG-LS - Glicosaminoglicanos altamente e pouco sulfatados, respectivamente. Valores expressos em µg de ácido hexurônico / 10 ml de plasma; ** CS e C4S - Condroitin-sulfato e condroitin-4-sulfato, respectivamente. Valores expressos em concentração relativa, obtidos a partir da densitografia no padrão eletroretórico, em acetato de celulose.

TABELA III - Perfil lipídico. Média e desvio-padrão das trações lipídicas séricas nos Grupos A, B e C.

Grupos	Colesterol total		Triglicérides		HDL-colesterol		LDL-colesterol		VLDL-colesterol	
	(mg/dl)		(mg/dl)		(mg/dl)		(mg/dl)		(mg/dl)	
	x	Sx	x	Sx	x	Sx	x	Sx	x	Sx
A	165,1	23,0	79,5	30,4	42,0	8,9	107,3	23,0	15,8	6,1
B	197,6	39,5	99,6	50,6	47,3	4,8	130,5	38,1	19,8	10,1
C	351,3	44,1	389,5	212,0	34,8	10,6	244,9	47,8	56,5	19,0

* Média: Sx - Desvio-padrão.

TABELA IV - Glicosaminoglicanos. Média e desvio-padrão dos valores obtidos nos Grupos A, B e C.

Grupos	GAG - HS*		GAG - LS*		GAG - HS		Total*		C S**		C 4 S**	
					GAG - LS				%			
	x	Sx	x	Sx	x	Sx	x	Sx	x	Sx	x	Sx
A	15,6	8,0	52,6	10,5	0,31	0,22	68,2	11,4	89,0	13,9	84,5	23,9
B	21,3	9,0	45,1	8,2	0,48	0,24	66,4	13,0	90,0	15,5	88,7	19,2
C	21,0	11,7	49,6	17,1	0,43	0,21	70,7	23,4	86,6	14,2	80,0	19,8

* GAG-HS e GAG-LS - Glicosaminoglicanos altamente e pouco sulfatados, respectivamente. Valores expressos em µg de ácido hexurônico / 10 ml de plasma; ** CS e C4S - Condroitin-sulfato e condroitin-4-sulfato, respectivamente. Valores expressos em concentração relativa, obtidos a partir da densitografia no padrão eletroretórico, em acetato de celulose. X - média; Sx - desvio padrão.

ção GAG-HS/GAG-LS, diferentemente do observado por Singh e col.⁵. Entretanto, apesar do uso do mesmo método, não encontramos explicação para os valores mais elevados por nós observados quando comparado aos de Calatroni e col.⁴ e Singh e col.⁵ para os grupos etários semelhantes. Talvez diferenças populacionais possam explicá-los.

Deve-se ressaltar também que a separação qualitativa dos diferentes componentes das frações GAG-HS e GAG-LS não mostrou diferenças, sendo o condroitin sulfato o principal glicosaminoglicano em ambas, quer a condição clínica fosse de normo ou hiperlipidemia. Estes resultados estão de acordo com os dados em artérias de cadáveres¹⁴.

A associação de hiperlipidemia a aterosclerose coronária, presente em nossos pacientes, não esteve relacionada com a variação plasmática dos GAG.

Apesar do pequeno número de casos, nossos resultados sugerem que fatores ambientais e/ou genéticos, que determinam variações do colesterol e dos triglicérides, não parecem atuar sobre os GAG plasmáticos. Assim, os fenômenos que determinam a interação GAG- lipoproteínas na parede arterial podem não atuar no meio circulante.

SUMMARY

Determinations of serum lipids (total cholesterol, triglycerides, HDL - LDL - and VLDL-cholesterol) and plasma glycosaminoglycans (GAGO) were performed in samples obtained from three groups of patients: A) normolipidemic, three males and three females, 1931 years old; B) six normolipidemic females, 42-66 years old; C) 14 hyperlipidemic with obstructive co-

ronary artery disease, eleven men and three females, 39-60 years old.

Plasma GAG were identified by the Calatroni method and two fractions were separated as to high and low sulfate content (GAG-HS and GAG-LS, respectively). Their values were expressed as μg of hexuronic acid/10 ml of plasma. Dermatan, heparan and chondroitin sulfates were separated by electrophoretic and enzymatic methods. The ratio GAG-HS/GAG-LS was also determined.

Statistical analyses showed the following results. 1) plasma GAG did not differ between the two normolipidemic groups nor between normo and hyperlipidemic patients; 2) there was no significant correlation between plasma GAG and lipid fractions in normal and hyperlipidemic patients with coronary artery disease.

There was no qualitative difference between the groups regarding the GAG components heparan, dermatan and chondroitin 4-sulfate.

These results seem to indicate that genetic and environmental factors which determine hyperlipidemia and obstructive coronary artery disease do not change plasma GAG.

REFERÊNCIAS

1. Iverius, P. H. - Possible role of glycosaminoglycans in the genesis of atherosclerosis. *Ciba Found. Symp.* 12, 1973. p. 185.
2. Toledo, O. M. S.; Mourão, P. A. S. - Sulfated glycosaminoglycans of human aorta: chondroitin 6-sulfate increase with age. *Biochem. Bioph. Res. Comm.* 89: 50, 1979.
3. Nakashima, Y.; Di Ferrante, N.; Jackson, R. L.; Poewenall, H. J. - The interaction human plasma glycosaminoglycans with plasma lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 250- 5386, 1975.
4. Calatroni, A.; Donnelly, P. V.; Di Ferrante, N. - The glycosaminoglycans of human plasma. *J. Clin. Invest.* 48, 332, 1969.
5. Singh, J.; Di Ferrante, N.; Gyorkwy, F.; Wilson, N. - Plasma glycosaminoglycans in normal individuals of various ages. *Atherosclerosis*, 28: 319, 1977.
6. Allain, C. C.; Poon, L. S.; Chan, C. S. Q.; Richmond, W.; Fu, P. C. - Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* 20: 470, 1974.
7. Wahnlefeld, R.; Bergemeyer, H. V. - Methoden der enzymatischen Analyse, 3rd ed., Verlag, Chemie, Weinheim, 1974. p. 1878.
8. Warnick, G. R.; Albers, J. J. - A comprehensive evaluation of heparin manganese precipitation procedure for estimating high density lipoprotein cholesterol. *J. Lipid Res.* 19: 65. 1978.
9. Castelli, W. P.; Levitas, I. M. - A new look at lipids. Why they're not all bad. *Current Prescribing*, 6: 39, 1977. In Livianu, J. e col. *Arq. Bras. Cardiol.* 36: 153, 1981.
10. Dietrich, C. P. Mc Duffic, N. M.; Sampaio, L. O. - Identification of acid mucopolysaccharidies by agarose gel electrophoresis. *J. Chrom.* 130: 229, 1977.
11. Habuchi, H.; Yamagata, T.; Iwata, H.; Suzuki, S. - The occurrence of a wide variety of dermatan sulphate copolymers in fibrous cartilage. *J. Biol. Chem.* 248: 6019, 1973.
12. Trevelyan, W. E.; Procter, D. P.; Harrison, J. S. - Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature*, 166: 444, 1950.
13. Stamler, J. - Atherosclerotic coronary heart disease - Etiology and Pathogenesis: Epiderniologic findings. In *Lectures Preventive Cardiology*. New York, London, Grune & Stratton, 1967. p. 63.
14. Hodora, I. H.; Figura, K. V.; Filipovic, I.; Buddecke, E - Topochemical studies on the glycosaminoglycans and lipid metabolism in arterial tissue. In: Schettler, G.; Weizel, A. ed. *Atherosclerosis III (Proc. Third Internat. Svmp.)* Berlin, Springer-Verlag, 1974. p. 853.