

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**GLICOSAMINOGLICANOS – PADRONIZAÇÃO DE  
MÉTODO E AVALIAÇÃO QUANTITATIVA EM URINA DE  
FELINOS EM CRESCIMENTO**

**MARCY LANCIA PEREIRA**

**ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marileda Bonafim Carvalho**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp – Jaboticabal – SP, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária

**JABOTICABAL- SP**

março de 2007

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**MARCY LANCIA PEREIRA** – nascida em 21 de setembro de 1981, em Piracicaba, SP, é veterinária formada pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, *campus* de Jaboticabal – FCAV/UNESP, em janeiro de 2005. Há 2 anos, é veterinária do Setor de Nefrologia e Urologia Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel da FCAV/UNESP Jaboticabal. Em agosto de 2005 ingressou no Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da FCAV/UNESP Jaboticabal, sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marileda Bonafim Carvalho.

## **Dedico este trabalho**

Aos queridos pacientes, animaizinhos doentes que por mim passaram... e aos que ainda virão... meu esforço e minha dedicação só têm uma razão: VOCÊS!

## **AGRADECIMENTOS**

À FCAV-UNESP Jaboticabal, ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária e ao Hospital Veterinário pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao CNPq, pela minha bolsa de mestrado.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marileda Bonafim Carvalho, pela orientação e pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Carvalho, por ter cedido gentilmente seu Laboratório de Pesquisa em Suínos para que eu pudesse abrigar meus animais e conduzir meu experimento.

Ao Prof. Dr. João Martins Pizauro Júnior, por ter cedido seu Laboratório de Enzimologia Aplicada para minhas análises laboratoriais.

Ao Prof. Dr. Gener Tadeu Pereira, ao Prof. Dr. João Ademir de Oliveira e à pós-graduanda Daniela por terem me auxiliado com as análises estatísticas.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Aos meus pais, por acreditarem em mim e permitissem que eu continuasse a buscar um “algo mais” em minha profissão que amo tanto!

À professora Marileda, minha querida orientadora, por me permitir aprender um pouquinho com ela desde a Iniciação Científica... pelos ensinamentos, pela paciência e por todo apoio!

Ao professor Pizauro, pela amizade, pelo incentivo, por ter acreditado em mim e não desistir... que as coisas dariam certo!

Aos funcionários e professores do HV, pelos ensinamentos cedidos durante o período de atendimento no Setor de Nefrologia e Urologia Veterinária.

Ao professor Luiz Fernando, por ter sido paciente nos momentos de correção dos trabalhos e permitisse que roubasse por “algumas” horinhas a professora Marileda...!

Aos meus colegas da Nefrologia Alexandre, Ana Paula, Ângela, Camilla, Daniel, Fernanda, Gaby, Lilian, Marcos, Sandra e Viviane, pelo companheirismo, trabalho compartilhado e pelos ensinamentos!

Aos residentes e pós-graduandos do HV, pelo companheirismo, compartilhamento de casos, pela amizade, pelas risadas...

À Fátima, Vanessa, Gisele, ao Flávio, pela amizade, por terem me recebido de braços abertos no laboratório e me auxiliado quando precisei com meu experimento.

Ao Eder, meu amor, pelos anos de convivência, carinho e compreensão, por sempre ter me incentivado a crescer, nunca desistir e seguir com meus objetivos!

À Gaby, minha amiga, irmã... por mais de 6 anos de convívio, além dos ensinamentos de nefro e da vida!

Às minhas queridas ex-vizinhas Ingrid e Bituca, pela amizade, pelo companheirismo em todos os momentos!

À Bituca, minha querida amiga e atual companheira de casa, por todos os anos de convivência e alegria!

À Carol, Sofia e Virginia, companheiras de casa queridas!

À Bianca, minha amiga pra todas as horas!

A todos os meus colegas e amigos de Jaboticabal pela convivência, pelas festas, por todos os momentos de alegria!

Aos meus lindos filhotinhos de experimento, meus gatinhos: Bibi, Bidu, Doguinho, Juca, Lila, Lili, Manolo, Max, Mick, Mingau, Narizinho e Pipoca, e pelas mãezinhas Fufa, Preta e Neguinha... vocês foram e sempre serão muito especiais pra mim! Obrigada pelos meses de convivência, pelo carinho, por terem sido dóceis, carinhosos! Que vocês sejam muito felizes!

Aos pacientes atendidos por mim no Serviço de Nefrologia e Urologia Veterinária, animaizinhos queridos que colaboraram para o meu aprendizado!

A todas as outras pessoas que, de alguma forma, auxiliaram em minha caminhada, fizeram ou fazem parte de minha vida e são especiais pra mim!

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS .....	ii
LISTA DE TABELAS .....	iii
LISTA DE FIGURAS .....	iv
RESUMO .....	1
SUMMARY .....	2
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	3
Introdução .....	3
Revisão de Literatura .....	4
Referências .....	7
CAPÍTULO 2 - PADRONIZAÇÃO DE MÉTODO PARA AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE GLICOSAMINOGLICANOS EM AMOSTRAS DE URINA DE FELINOS .....	13
Resumo .....	13
Introdução .....	13
Material e Métodos .....	15
Resultados .....	19
Discussão .....	30
Conclusões .....	34
Referências .....	35
CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO DA EXCREÇÃO URINÁRIA DE GLICOSAMINOGLICANOS EM FELINOS EM CRESCIMENTO .....	41
Resumo .....	41
Introdução .....	42
Material e Métodos .....	43
Resultados .....	46
Discussão .....	47
Conclusões .....	51
Referências .....	52

**LISTA DE ABREVIATURAS**

A: absorbância

Å: ângstrons

AB: Alcian Blue

CI: cistite intersticial

creat: creatinina

DMB: azul de dimetilmetileno

GAG: glicosaminoglicano

SCC: sulfato de condroitina C

TCA: ácido tricloroacético

U-GAG/C: relação glicosaminoglicano:creatinina urinária

$\Delta$ OD: variação de densidade óptica

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Dosagem de SCC adicionado à urina de felino, com corante composto por Azure A e B, sob leitura a 610nm .....	22
Tabela 2 - Testes com diferentes volumes de urina de felino com uso de reagentes Azure A e B, sob leitura a 610 nm .....	22
Tabela 3 - Testes com diferentes volumes de urina humana com uso de corantes Azure A e B, sob leitura a 610 nm .....	22
Tabela 4 - Padrão de SCC (1µg/5µL) e urina de felino com corantes Azure A e B, tratadas com etanol, sob leitura a 610nm .....	22
Tabela 5 - Padrão com SCC (1µg/20µL), sob leitura a 535nm, utilizando solução complexadora / descomplexadora .....	27
Tabela 6 - Quantificação de SCC em teste contendo urina de felino, com corante DMB em tampão acetato sódico. Tratamentos - nenhum, centrifugação a 1500rpm por 5 minutos e a 14000rpm por 5 minutos, sob leitura a 648nm .....	28
Tabela 7 - Médias, desvios padrões e teste de Tukey para os valores de GAG (mg/dL) de 12 felinos (7 machos e 5 fêmeas) avaliados neste estudo, dos 30 aos 114 dias de idade .....	46
Tabela 8 - Médias, desvios padrões e teste de Tukey para os valores de U-GAG/C de 12 felinos (7 machos e 5 fêmeas) avaliados neste estudo, dos 30 aos 114 dias de idade .....	46

## LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1 -	Espectro de absorção do corante composto por Azure A e B, (A) na ausência e (B) na presença de 5µg de SCC .....	20
Figura 2 -	Representação gráfica da concentração de SSC <i>versus</i> absorbância utilizando o corante composto por Azure A e B, sob leitura a 610nm .....	20
Figura 3 -	Curva padrão para o SCC com corante composto por Azure A e B, sob leitura a 610nm, com solução de corantes diluída a (—) 1:9 e (■) 1:14 para a solução de trabalho proveniente de (A) solução estoque e (B) solução estoque corrigida .....	21
Figura 4 -	Curva padrão de SCC com solução de corantes composta por Azure A e B, sob leitura a 610nm, para avaliação da influência do tempo e da temperatura .....	23
Figura 5 -	Espectro de absorção para o DMB em tampão formato sódico, na ausência (A) e presença (B) de 20µg de SCC .....	24
Figura 6 -	Curva padrão de SCC com corante DMB em tampão formato sódico, sob leitura a 540nm.....	24
Figura 7 -	Representação gráfica do espectro de absorção para (A) solução complexadora de corantes, (B) solução descomplexadora e (C) padrão com 4µg de SCC .....	26
Figura 8 -	Espectro de absorção da solução de corante DMB em tampão acetato sódico na ausência (A) e presença (B) de padrão com 4µg de SCC .....	27
Figura 9 -	Representação gráfica da curva padrão do SCC com corante DMB em tampão acetato sódico, sob leitura a 648nm, de 0 a 15µg de SCC .....	28
Figura 10 -	Variações de densidade óptica de testes com diferentes volumes de urina de felino com corante DMB em tampão acetato de sódio, sob leitura imediata a 648nm .....	29
Figura 11 -	Representação gráfica dos tempos de leitura, a 648nm, de teste com urina de felino, com corante DMB em tampão acetato sódico ..	29
Figura 12 -	Representação gráfica de médias e erros padrões para (A) GAG (mg/dL) e (B) para U-GAG/C, dos 30 aos 114 dias de idade dos 12 felinos avaliados neste estudo .....	47

## **GLICOSAMINOGLICANOS – PADRONIZAÇÃO DE MÉTODO E AVALIAÇÃO QUANTITATIVA EM URINA DE FELINOS EM CRESCIMENTO**

**RESUMO** – Os glicosaminoglicanos (GAGs) são mucopolissacarídeos eliminados normalmente na urina. A alteração da excreção dessas substâncias está relacionada à ocorrência de doenças sistêmicas ou do trato urinário. Dentre elas, a cistite intersticial, cuja fisiopatogenia ainda não foi esclarecida, acomete seres humanos, e os felinos, por apresentarem quadro semelhante, têm sido considerados o melhor modelo para estudo desta doença. Considerando que os GAGs podem estar envolvidos nos mecanismos da enfermidade, é importante a padronização de métodos para dosagem destes mucopolissacarídeos em urina de felinos, bem como o estabelecimento de valores de referência para a espécie. Foram avaliados 12 felinos saudáveis, dos 30 aos 114 dias de idade. Amostras de urina foram coletadas a cada 28 dias para quantificação de GAGs sulfatados. Para as mensurações, foram avaliados quatro métodos colorimétricos em busca do mais sensível, barato e reprodutível. Dentre eles, o de desempenho melhor foi o que emprega azul de dimetilmetileno (DMB) em tampão acetato sódico, padrão com sulfato de condroitina C (SCC) após modificação do volume de urina empregado na reação, do tempo de leitura dos testes, além da dispensa da centrifugação das amostras de urina. A excreção urinária de GAG sulfatado não foi influenciada pelo sexo, mas foi modificada pelo fator idade. Os valores foram significativamente mais altos aos 30 e aos 58 dias de idade em relação aos observados para as idades subsequentes (86 e 114 dias), revelando declínio das quantidades desta substância na urina de felinos desta faixa etária.

Palavras-chave: gatos, glicosaminoglicanos, trato urinário, métodos de quantificação.

## **GLYCOSAMINOGLYCANS – METHOD STANDARDIZATION AND QUANTITATIVE AVALIATION IN URINE OF GROWING KITTENS**

**SUMMARY** - Glycosaminoglycans (GAGs) are mucopolisacarides usually eliminated in urine. The altered excretion of these substances is related to occurrence of systemic or urinary diseases. Among them, interstitial cystitis, which physiopatogenesis has not been elucidated yet, is observed mainly in humans, and felines, that present similar signs, have been considered the best model for study of this illness. Considering that GAGs may be involved with disease mechanisms, the standardization of methods to measure mucopolissacarides in feline urine, as the establishment of reference values for the species, are very important. Twelve healthy kittens were studied, from 30 to 114 days old, and specimens of urine were collected every 28 days for quantification of GAGs. Four colorimetric methods were analyzed, in order to find the most sensible, cheap and reproducible for dosage. The selected method, that employs dimethylmethylene blue (DMB) with sodium acetate buffer and standard with chondroitin C sulfate, was modified with regard to the volume of urine employed, reading time of the tests, and dispense of urine centrifugation. Values were significantly higher at ages 30 and 58 days old when compared to those observed at subsequent ages (86 and 114 days), revealing decline of these substance quantities in feline urine on this age interval.

Keywords: cats, glycosaminoglycans, urinary tract, methods.

## **CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS**

### **Introdução**

Os glicosaminoglicanos (GAGs) são macromoléculas presentes nos tecidos animais e podem ser encontrados livres ou ligados a proteínas sob a forma de proteoglicanos. Existem diversos tipos de GAGs, como o ácido hialurônico ou hialuronana, heparina, sulfato de heparana, sulfatos de condroitina A e C, de dermatana e de queratana. Essas substâncias estão presentes em cartilagens, superfícies celulares, vesículas secretoras em leucócitos, membranas basais e epitélios e, também, são encontradas no plasma sanguíneo e na urina.

As moléculas de GAG presentes na urina podem ter origem no próprio trato urinário ou virem do plasma através da filtração glomerular. Há evidências de que essas substâncias desempenham papel funcional no urotélio, participando da regulação dos processos de transporte em membranas celulares e na proteção das mucosas.

A excreção urinária dos GAGs pode estar alterada em seres humanos em casos de neoplasias, diabetes mellitus, osteoartrite, aterosclerose, hipertensão arterial, leiomioma, lúpus eritematoso e mucopolissacaridose, dentre outros. Quanto ao trato urinário, pode haver mudanças da concentração urinária de GAG nas glomerulopatias, litíases, infecções de trato urinário e cistite intersticial.

A cistite intersticial (CI), doença de fisiopatogenia ainda desconhecida, acomete a espécie humana e a felina, que vem sendo considerada o melhor modelo de ocorrência natural da enfermidade. A diminuição da excreção urinária total de GAGs em humanos acometidos pela CI já foi demonstrada. No caso dos gatos, a mesma alteração parece estar presente, mas os estudos ainda não foram conclusivos.

Parte das dificuldades para a identificação e caracterização das mudanças de concentração de GAGs na urina de felinos pode estar relacionada aos métodos de

dosagem, que incluem os quantitativos colorimétricos e os que utilizam cromatografia e eletroforese. As diferenças metodológicas evidenciadas nas pesquisas, além do número pequeno de publicações em relação à espécie felina, resultam na falta de valores de referência, que constitui outro fator crítico.

Este trabalho descreve a padronização de método fácil, rápido, de custo baixo, reproduzível e sensível para a quantificação GAGs urinários sulfatados totais na urina de filhotes felinos saudáveis de 30 a 114 dias de idade.

## **Revisão de Literatura**

Os glicosaminoglicanos (GAGs) são macromoléculas que constituem a matriz extracelular. Eles são constituídos por cadeias polissacarídicas não-ramificadas compostas de unidades dissacarídicas repetidas. Eles são chamados GAGs porque um dos dois açúcares no dissacarídeo repetido é sempre um amino açúcar que é, na maioria das vezes, sulfatado. O segundo açúcar é normalmente o ácido glicurônico ou idurônico. Os grupos sulfato ou carboxil ocorrem na maioria dos açúcares, o que faz com que os GAGs sejam carregados negativamente e atraiam íons sódio o que, conseqüentemente, torna a matriz celular extremamente hidratada.

Os (GAGs) estão geralmente ligados a núcleos de proteínas sob a forma de proteoglicanos. As classes de GAGs mais importantes incluem o ácido hialurônico ou hialuronana, heparina, sulfato de heparana, sulfatos de condroitina A e C e sulfatos de dermatana e de queratana. As cartilagens são os tecidos que contêm as concentrações maiores de sulfato de condroitina e queratana (ALBERTS et al., 1997). Nos rins, o sulfato de heparana tem papel importante na seletividade tubular (HURST et al., 1987 e HURST, 1994) e na filtração glomerular (MORITA et al., 2005), enquanto o sulfato de dermatana prevalece em vasos sanguíneos (MARQUEZINI et al., 1999) e no miométrio (BERTO et al., 2001).

Os principais GAGs encontrados na superfície do epitélio vesical de humanos são os sulfatos de condroitina e de heparana e mais profundamente predominam ácido hialurônico e sulfatos de heparana e dermatana (HURST et al., 1987). Em função de

sua carga negativa, os GAGs da superfície atraem íons sódio e, conseqüentemente, moléculas de água, formando uma camada de gel (ALBERTS et al., 1997).

Embora NEGRETE et al. (1996) admitam que a propriedade de barreira protetora do urotélio seja exercida exclusivamente pela camada lipídica da membrana apical, há evidências (ALBERTS et al., 1997) de que os GAGs constituam um filme de gel protetor. Esta barreira evita aderência de bactérias e microcristais (PARSONS et al., 1975) e, segundo HURST et al. (1987) e PARSONS et al. (1990), também pode ter papel importante para manter a impermeabilidade do urotélio às moléculas presentes na urina. A penetração de substâncias, em decorrência de defeitos quali ou quantitativos na camada de gel protetora, poderia causar lesão tecidual e liberação local de neurotransmissores e mediadores inflamatórios (PARSONS et al., 1990).

Diversos estudos mostraram alterações na excreção urinária de GAGs em pacientes com cistite intersticial (HURST et al., 1993, HURST et al., 1996 e ERICKSON et al., 1997), infecção de trato urinário (CENGIZ et al., 2005), carcinoma vesical (HENNESSEY et al., 1981, ATAHAN et al., 1996 e PASSEROTTI et al., 2006) e renal (SARICA et al., 1997), urolitíase vesical (AKÇAY et al., 1999 e ERTURK et al., 2002) e renal (TSUJIHATA et al., 2001 e TSUJIHATA et al., 2006), enurese noturna isolada ou combinada a incontinência urinária diurna (FERRARA et al., 2000), glomerulonefrite crônica (DE MURO et al., 2005) e amiloidose renal (TENCER et al., 1997).

A cistite intersticial (CI), que acomete humanos e animais, tem como sinais crônicos e recidivantes a hematúria, polaquiúria, urgência na micção, noctúria, dor abdominal ou pélvica, sem achados anormais em cultura convencional de urina ou achados patognomônicos em estudos citológicos. Nos Estados Unidos, cerca de 300 a 500 mil pessoas, dentre elas 80 a 85% mulheres, sofrem com a doença e pouco é sabido sobre sua fisiopatogenia (FALL et al., 1987). Foram avaliados vários modelos animais de ocorrência natural para estudo desta enfermidade e concluiu-se que o gato é o melhor, pois, nesta espécie, a doença tem manifestações muito semelhantes às que ocorrem em humanos (WESTROPP & BUFFINGTON, 2002). Em estudo realizado por RECHE et al. (1998), foram avaliados felinos atendidos na cidade de São Paulo com sinais de doença do trato urinário inferior e, dos 50 pacientes, 14 (28%) apresentavam

hematúria, polaquiúria e disúria sem obstrução uretral e desses, 57% eram machos e 43% eram fêmeas.

Em estudo desenvolvido por HURST et al. (1993) com humanos acometidos por CI, constatou-se diminuição da concentração de GAGs na urina, o que foi atribuído a provável aumento da ligação dessas substâncias ao urotélio lesado. ERICKSON et al. (1997) relataram diminuição da concentração de GAGs totais urinários de pacientes com CI em relação ao grupo controle, porém a razão entre GAG e creatinina urinária permaneceu similar, fato atribuído à constatação de diluição da urina em pacientes acometidas pela doença. BUFFINGTON et al. (1996) avaliaram felinos e verificaram diminuição de GAGs em amostras de urina de gatos com CI em relação a gatos normais e apontaram as anormalidades de síntese, retenção ou inativação do GAG na superfície vesical como causa de sua redução na urina.

KHAN & KOK (2004) atribuem aos GAGs e às glicoproteínas atividade inibitória sobre a formação de urólitos. SMITH (2004) avaliou a aderência de cristais de oxalato de cálcio à bexiga de ratos após tratamento com solução ácida e verificou que o sulfato de dermatana inibiu o processo, enquanto o ácido hialurônico e os sulfatos de condroitina A e C não tiveram influência. TSUJIHATA et al. (2001) e TSUJIHATA et al. (2006) observaram concentração maior de GAGs urinários em indivíduos normais quando comparados a pacientes com nefrolitíase.

Diversos métodos vêm sendo empregados para a identificação e quantificação de GAGs urinários, dentre eles, destacam-se a cromatografia e eletroforese (LEE et al., 2003, PEREIRA et al., 2004 e VIEIRA et al., 2005). Entretanto, estes métodos têm como desvantagem a necessidade de várias etapas para isolamento e quantificação da substância desejada, o que os torna mais onerosos e menos rápidos. Como alternativas menos dispendiosas e mais rápidas, são descritos os métodos colorimétricos, que utilizam como corantes Azure A e B (THUY & NYHAN, 1992 e ERTURK et al., 2002), Alcian Blue (GOLD, 1981 e DE JONG et al., 1994) e azul de dimetilmetileno (PANIN et al., 1986, FARNDALÉ et al., 1986, TEMPLETON, 1988, WHITLEY et al., 1989, DE JONG et al., 1993, MITSUHASHI et al., 1993, DE JONG et al., 1994, BUFFINGTON et al., 1996, AKÇAY et al., 1999, BARBOSA et al., 2003 e GRANT et al., 2006).

## Referências

AKÇAY, T., KONUKOGLU, D., DINÇER, Y. Urinary glycosaminoglycan excretion in urolithiasis. **Archives of Disease in Childhood**, London, v. 80, p. 271-272, 1999.

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. D. In: **Biologia Molecular da célula**, 3ª ed., Artes Médicas, Porto Alegre, 1997, p. 972-978.

ATAHAN, O., DAYIGIL, O., HIZEL, N., YAVUZ, O., METIN, A. Urinary glycosaminoglycan excretion in bladder carcinoma. **Scandinavian Journal of Urology and Nephrology**, Stockholm, v. 30, n. 3, p. 173-177, 1996.

BARBOSA, I., GARCIA, S., BARBIER-CHASSEFIÈRE, V., CARUELLE, J. P., MARTELLY, I., PAPY-GARCIA, D. Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies. **Glycobiology**, Oxford, v. 13, n. 9, p. 647-653, 2003.

BERTO, A. G. A., OBA, S. M., MICHELACCI, Y. M., SAMPAIO, L. O. Galactosaminoglycans from normal myometrium and leiomyoma. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo. 34, p. 633-637, 2001.

BUFFINGTON, C. A. T., BLAISDELL, J. L., BINNS, S. P., WOODWORTH, B. E. Decreased urine glycosaminoglycan excretion in cats with interstitial cystitis. **The Journal of Urology**, Baltimore, v. 155, p. 1801-1804, 1996.

CENGİZ, N., BASKIN, E., ANARAT, R., AGRAS, P. I., YILDIRIM, S. V., TIKER, F., ANARAT, A., SAATCI, U. Glycosaminoglycans in childhood urinary tract infections. **Pediatric Nephrology**, Berlin, v. 20, p. 937-939, 2005.

DE JONG, J. G., WEVERS, R. A., LAARAKKERS, C., POORTHUIS, B. J. Dimethylmethylene blue-based spectrophotometry of glycosaminoglycans in untreated

urine: a rapid screening procedure for mucopolysaccharidoses. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 39, n. 1, p. 163-164, 1993.

DE JONG, J. G., HEIJS, W. M., WEVERS, R. A. Mucopolysaccharidoses screening: dimethylmethylene blue versus alcian blue. **Annals of Clinical Biochemistry**, London, v. 31, n. 3, p. 267-271, 1994.

DE MURO, P., FAEDDA, R., SATTA, A., DONATELLA, F., MASALA, A., CIGNI, A., SANNA, G. M., CHERCHI, G. M. Urinary glycosaminoglycan composition in chronic glomerulonephritis. **Journal of Nephrology**, Roma, v. 18, n. 2, p. 154-160, 2005.

ERICKSON, D. R., ORDILLE, S., MARTIN, A., BHAVANANDAN, V. P. Urinary chondroitin sulfates, heparan sulfate and total sulfated glycosaminoglycans in interstitial cystitis. **The Journal of Urology**, Baltimore, v. 157, p. 61-64, 1997.

ERTURK, E., KIERNAN, M. SCHOEN, S. R. Clinical Association with urinary glycosaminoglycans and urolithiasis. **Urology**, New York, v. 59, n. 4, p. 495-499, 2002.

FALL, M., JOHANSSON, S. L., ALDENBORG, F. Chronic interstitial cystitis: a heterogeneous syndrome. **The Journal of Urology**, Baltimore, v. 137, p. 35-38, 1987.

FARNDAL, W. R., BUTTLE, D. J., BARRETT, A. L. Improved quantitation and discrimination of sulfated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 883, p. 173-177, 1986.

FERRARA, P., RIGANTE, D., LAMBERT-GARDINI, S., SALVAGGIO, E., RICCI, R., CHIOZZA, M. L., ANTUZZI, D. Urinary excretion of glycosaminoglycans in patients with isolated nocturnal enuresis or combined with diurnal incontinence. **British Journal of Urology International**, Oxford, v. 86, p. 824-825, 2000.

GOLD, E. W. The quantitative spectrophotometric estimation of total sulfated glycosaminoglycan levels. Formation of soluble alcian blue complexes. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 673, n. 4, p. 408-415, 1981.

GRANT, D. C., FORRESTER, D., PANCIERA, D. L., MELDRUM, J. B. Measurement of urinary glycosaminoglycans in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.67, n. 1, p. 51-55, 2006.

HENNESSEY, P. T., HURST, R. E., HEMSTREET, G. P., CUTTER, G. Urinary glycosaminoglycan excretion as a biochemical marker in patients with bladder carcinoma. **Cancer Research**, Baltimore, v. 41, p. 3868-3873, 1981.

HURST, R. E., RHODES, S. W., ADAMSON, P. B., PARSONS, C. L., ROY, J. B. Functional and structural characteristics of the glycosaminoglycans of the bladder luminal surface. **The Journal of Urology**, Baltimore, v. 138, p. 433, 1987.

HURST, R. E., PARSONS, C. L., ROY, J. B., YOUNG, J. L. Urinary glycosaminoglycan excretion as a laboratory marker in the diagnosis of interstitial cystitis. **The Journal of Urology**, Baltimore, v. 149, p. 31-35, 1993.

HURST, R. E. Structure, function, and pathology of proteoglycans and glycosaminoglycans in the urinary tract. **World Journal of Urology**, Berlin, v.12, n. 1, 1994.

HURST, R. E., ROY, J.B., MIN, K. W., VELTRI, R. W., MARLEY, G., PATTON, K., SHACKELFORD, D. L., PARSONS, C. L. A deficit of chondroitin sulfate proteoglycans on the bladder uroepithelium in interstitial cystitis. **Urology**, New York, v. 48, n. 5, p. 817-821, 1996.

KHAN, S R., KOK, D. J. Modulators of urinary stone formation. **Frontiers in Bioscience**, Tampa, v. 1, n. 9, p. 1450-1482, 2004.

LEE, E. Y., KIM, S. H., WHANG, S. K., KWANG, K. Y., YANG, J. O., HONG, S. Y. Isolation, identification and quantitation of urinary glycosaminoglycans. **American Journal of Nephrology**, Basel, v. 23, n. 3, p. 152-157, 2003.

MARQUEZINI, M. V., DALLAN, L. A. O., TOLEDO, O. M. S. Distribuição comparativa dos glicosaminoglicanos em artérias e veias de diferentes mamíferos. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, São Paulo, v. 14, n. 4, p. 325-330, 1999.

MITSUHASHI, H., TSUKADA, Y., ONO, K., YANO, S., NARUSE, T. Urine glycosaminoglycans and heparan sulfate excretions in adult patients with glomerular diseases. **Clinical Nephrology**, Baltimore, v. 39, n. 5, p. 231-238, 1993.

MORITA, H., YOSHIMURA, A., INUI, K., IDEURA, T., WATANBE, H., WANG, L., SOININEN, R., TRYGGVASON, K. Heparan sulfate of perlecan is involved in glomerular filtration. **Journal of the American Society of Nephrology**, Baltimore, v. 16, n. 6, p. 1703-1710, 2005.

NEGRETE, H. O., LAVELLE J. P., BERG, J., LEWIS, S. A., ZEIDEL, M. L. Permeability properties of the intact mammalian bladder epithelium. **American Journal of Physiology: Renal Fluid Electrolyte Physiology**, Bethesda, v. 271, F886-894, 1996.

PANIN, G., NAIA, S., DALL'AMICO, R., CHIANDETTI, L., AZCHELLO, F., CATASSI, C., FELICI, L., COPPA, G. V. Simple spectrophotometric quantification of urinary excretion of glycosaminoglycan sulfates. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 32, n. 11, p. 2073-2076, 1986.

PARSONS, C. L., GREENSPAN, C., MULHOLLAND, S. G. The primary antibacterial defense mechanism of the bladder. **Investigative Urology**, Baltimore, v. 13, p. 72-76, 1975.

PARSONS, C. L., BOYCHUK, D., JONES, S., HURST, R., CALLAHAN, H. Bladder surface glycosaminoglycans: an epithelial permeability barrier. **The Journal of Urology**, Baltimore, v. 143, p. 139-142, 1990.

PASSEROTTI, C. C., BONFIM, A., MARTINS, J. R. M., DALL'OGGIO, M. F., SAMPAIO, L. O., MENDES, A., ORTIZ, V., SROUGI, M., DIETRICH, C. P., NADER, H. B. Urinary hyaluronan as a marker of the presence of residual transitional cell carcinoma of the urinary bladder. **European Urology**, Basel, v. 49, p. 71-75, 2006.

PEREIRA, D. A., AGUIAR, J. A., HAGIWARA, M. K., MICHELACCI, Y. M. Changes in cat urinary glycosaminoglycans with age and in feline urologic syndrome. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1672, n. 1, p. 1-11, 2004.

RECHE, A., HAGIWARA, M. K., MAMIZUKA, E. Estudo clínico da doença do trato urinário inferior em gatos domésticos de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, Seropédica, v. 35, n. 2, p. 69-74, 1998.

SARICA, K., TURKOLMEZ, K., SOYGUR, T., OZER, G., YAMAN, M. O., BALTACI, S., BEDUK, Y., MUFTUOGLY, Y. Z. Evaluation of urinary glycosaminoglycan in patients with renal cell carcinoma. **European Urology**, Basel, v. 31, n. 1, p. 54-57, 1997.

SMITH, C. L. Calcium oxalate crystal adherence in the rat bladder: restoration of anti-adherence after acid treatment. **The Journal of Urology**, Baltimore, v. 171, n. 2, part 1, p. 882-884, 2004.

TEMPLETON, D. M. The basis and applicability of the Dimethylmethylene blue binding assay for sulfated glycosaminoglycans. **Connective Tissue Research**, Philadelphia, v. 17, n. 1, p. 23-32, 1988.

TENCER, J., TORFFVIT, O., GRUBB, A., BJÖRNSSON, S., THYSELL, H., RIPPE, B. Decreases excretion of urine glycosaminoglycans as marker in renal amyloidosis. **Nephrology Dialysis Transplantation**. New York, v. 12, p. 1161-1166, 1997.

THUY, L. P., NYHAN, W. L. A new quantitative assay for glycosaminoglycans. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 212, p. 17-26, 1992.

TSUJIHATA, M., MIYAKE, O., YOSHIMURA, K., KAKIMOTO, K., TAKAHAR, S., OKUYAMA, A. comparison of fibronectin content in urinary macromolecules between normal subjects and recurrent stone formers. **European Urology**, Basel, v. 40, n. 4, p. 458-462, 2001.

TSUJIHATA, M., TSUJIKAWA, K., TEL, N., YOSHIMURA, K., OKUYAMA, A. Urinary macromolecules and renal tubular cell protection from oxalate injury: comparison of normal subjects and recurrent stone formers. **International Journal of Urology**, Tokyo, v. 13, n. 3, p. 197-201, 2006.

VIEIRA, F. A. C., BACCARIN, R. Y. A., AGUIAR, J. A. K., MICHELACCI, Y. M. Urinary excretion of glycosaminoglycans in horses: changes with age, training, and osteoarthritis. **Journal of Equine Veterinary Medicine**, v. 25, n. 9, p. 387-400, 2005.

WESTROPP, J. L., BUFFINGTON, C. A. In vivo models of interstitial cystitis. **The Journal of Urology**, Baltimore, v. 167, n. 2, part 1, p. 694-702, 2002.

WHITLEY, C. B., RIDNOUR, M. D., DRAPER, K. A., DUTTON, C. M., NEGLIA, J. P. Diagnostic test for mucopolysaccharidosis. I. Direct method for quantifying excessive urinary glycosaminoglycan excretion. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 35, n. 3, p. 374-379, 1989.

## **CAPÍTULO 2 – PADRONIZAÇÃO DE MÉTODO PARA AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE GLICOSAMINOGLICANOS EM AMOSTRAS DE URINA DE FELINOS**

**Resumo** – Diversos métodos vêm sendo utilizados para a quantificação de glicosaminoglicanos urinários como, por exemplo, cromatografia associada a eletroforese e métodos colorimétricos, mais baratos e rápidos, que empregam como corantes o Azure A e B, Alcian Blue (AB) e o azul de dimetilmetileno (DMB). Este estudo foi realizado com o objetivo de padronizar um método barato e reprodutível para a dosagem de GAGs, com uso de sulfato de condroitina C como padrão para os GAGs sulfatados totais, na urina de felinos. Foram testados métodos que empregam o Azure A e B e o azul de dimetilmetileno. O método escolhido para as análises quantitativas foi o que emprega o azul de dimetilmetileno em tampão acetato sódico, por ter se mostrado fácil, barato e sensível. O método publicado por GRANT et al. (2006) sofreu adaptações para ser empregado na quantificação de GAGs na urina de gatos. As modificações realizadas referem-se à modificação do volume de urina empregado para as mensurações, alteração do tempo de leitura dos testes e dispensa da centrifugação das amostras de urina dos felinos.

**Palavras-chave** – método colorimétrico, DMB, quantificação, glicosaminoglicano, urina, felino.

### **Introdução**

Os glicosaminoglicanos (GAGs) são macromoléculas extracelulares que incluem o ácido hialurônico ou hialuronana, heparina, sulfato de heparana, sulfatos de

condroitina A e C e sulfatos de dermatana e de queratana. Estas substâncias estão presentes em diversos tecidos, inclusive no trato urinário (HURST et al., 1987; HURST, 1994, ALBERTS et al., 1997 e MORITA et al., 2005). Os GAGs são encontrados na urina, exceto a heparina, e podem ter suas concentrações modificadas em várias doenças, tais como a cistite intersticial (HURST et al., 1993, HURST et al., 1996 e ERICKSON. et al., 1997). O interesse por investigações para determinação de métodos apropriados para quantificação de GAG na urina é grande, tanto em relação à espécie humana quanto a felina, uma vez que essa é tida como modelo para estudo de CI.

Com relação à espécie felina, há poucos estudos sobre a quantificação de GAGs. A maioria dos trabalhos refere-se ao aumento da excreção urinária de GAGs em pacientes acometidos por mucopolissacaridose, um grupo de desordens metabólicas hereditárias que resultam em deficiência de enzimas responsáveis pelo catabolismo dos GAGs (WRAIT, 1995).

Os métodos mais descritos para identificação e quantificação de GAGs urinários incluem eletroforese e cromatografia (LEE et al., 2003, PEREIRA et al., 2004 e VIEIRA et al., 2005) e os métodos colorimétricos que utilizam como corantes Azure A e B sem precipitação (THUY & NYHAN, 1992 e ERTURK et al., 2002) ou com precipitação com cloridrato de cetilpiridinium (DIAL et al., 1997), Alcian Blue (GOLD, 1981 e DE JONG et al., 1994) e azul de dimetilmetileno sem precipitação (FARNDALÉ et al., 1986, TEMPLETON, 1988, BUFFINGTON et al., 1996, MITSUHASHI et al., 1993, DE JONG et al., 1993, DE JONG et al., 1994 e GRANT et al., 2006), ou com precipitação com cloridrato de cetilpiridinium (PANIN et al., 1986 e CENGIZ et al., 2005).

Em relação ao Alcian Blue (AB), resultados contraditórios têm sido encontrados. GOLD (1981) relata que o método com AB é rápido, conveniente e reproduzível. Já THUY & NYHAN (1992), acreditam que a técnica com AB não é sensível o suficiente; a solução de corante é muito ácida e há influência de outras glicoproteínas. DE JONG et al. (1994) compararam os métodos que utilizam azul de dimetilmetileno (DMB) e AB e concluíram que o primeiro fornece resultados com mais sensibilidade e especificidade. Em estudo realizado por MABE et al. (2004), o teste com DMB foi capaz de detectar 100% dos casos de mucopolissacaridose em humanos.

MITSUHASHI et al. (1993) compararam as curvas de concentração *versus* absorvância para o SC e o sulfato de heparana em método que utiliza DMB. Esses autores verificaram que o comportamento desses GAGs sulfatados é muito semelhante, o que mostra que o DMB não discrimina os tipos de GAGs. Segundo FARNDALÉ et al. (1986), o sulfato de queratana e de dermatana são mensurados juntamente com o SC e, para a individualização dos GAGs, é necessário uso de liases polissacarídicas. Como o SC corresponde a 80% dos GAGs urinários totais em humanos adultos e a 92% em crianças (MICHELACCI et al., 1989) e predomina na urina de felinos (PEREIRA et al., 2004), é utilizado como padrão para GAGs sulfatados totais em estudos colorimétricos.

Para THUY & NYHAN (1992) e GRANT et al. (2006), discrepâncias entre os estudos colorimétricos podem ocorrer devido a variações no preparo das soluções tamponantes, diferenças entre os comprimentos de onda para as leituras e possível interferência de substâncias presentes.

WHITLEY et al. (1989) exploraram a sensibilidade do DMB para GAGs sulfatados na urina de pacientes com mucopolissacaridose. Segundo os autores, o método direto com DMB é tecnicamente simples, rápido e barato, não sofre interferência da albumina, além da necessidade de menos de 0,1mL de urina para o teste, o que o torna bastante apropriado para pacientes neonatos.

Os principais GAGs encontrados na superfície do epitélio vesical de humanos são os sulfatos de condroitina e de heparana e mais profundamente predominam ácido hialurônico e sulfatos de heparana e dermatana (HURST et al., 1987).

Com a finalidade de selecionar um método eficiente, rápido e com custo baixo para quantificar GAGs sulfatados totais na urina de gatos, foram testados quatro métodos colorimétricos.

## **Material e Métodos**

Para a dosagem de glicosaminoglicanos em urina de felinos, foram testados os métodos relatados por THUY & NYHAN (1992), BUFFINGTON et al. (1996), BARBOSA et al. (2003) e GRANT et al. (2006), conforme descrição que se segue.

Todos os ensaios foram realizados no Laboratório de Enzimologia Aplicada do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Júlio de Mesquita Filho, UNESP Jaboticabal, sob a supervisão do Prof. Dr. João Martins Pizauro Júnior. Para a execução de todos os ensaios foram utilizados tubos plásticos e água Milli Q e as leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro Hitachi U-2000<sup>1</sup>.

### **Determinação de GAGs em amostras de urina com utilização dos corantes Azure A e Azure B (THUY & NYHAN, 1992)**

Os autores propuseram a quantificação de GAGs em urina de humanos sadios e de pacientes pediátricos acometidos por mucopolissacaridose pela utilização de ligação com reagente composto pelos corantes Azure A e Azure B.

#### **PROTOCOLO**

solução estoque	100mg de Azure A <sup>2</sup> e 100mg de Azure B <sup>2</sup> em 1,0L de água
solução de trabalho	solução estoque diluída em 1:10 (estável por uma semana, sob temperatura ambiente, em frasco plástico)
branco	2,7mL da solução de trabalho + 0,3mL de água
padrão	2,7mL da solução de trabalho + solução de SCC <sup>2</sup> em concentrações 0 a 20µg + água q.s.p. 3mL
teste 1	2,7mL da solução de trabalho + 50µL de urina + água q.s.p. 3mL
teste 2	2,7mL da solução de trabalho + 100µL de urina + água q.s.p. 3mL

<sup>1</sup> Hitachi Ltd, Tokyo

<sup>2</sup> Sigma Chemicals Co, St Louis, MO

## MODIFICAÇÕES TESTADAS

Azure A e B diluídos separadamente - Azure A diluído em 60mL e o Azure B em 20mL. A seguir, as soluções foram misturadas, o volume final foi completado para 100mL
Solução estoque contendo 182mg de Azure A e 118mg de Azure B, correspondendo a 100mg do princípio ativo de cada corante (solução estoque corrigida)
Variações de concentração da solução de trabalho (1:9, 1:10, 1:11, 1:12 e 1:14), feitas a partir da solução estoque e da solução estoque corrigida
Variações dos volumes dos reagentes nas soluções para branco, padrão e testes
Concentração (10x) de SCC em solução, por meio de precipitação com etanol gelado ou ácido tricloroacético 10% (TCA) e ressuspensão em volume menor de água
Descanso da solução padrão sob temperatura constante (37°C) por 12 horas

Para aferição da sensibilidade do método original ou modificado, após obtenção de uma curva padrão, foram testadas urinas de humanos além de urina de felinos. Também foram analisadas amostras de urina de felinos enriquecidas pela adição de SCC, com a finalidade de ter controle sobre a recuperação. Neste caso, o volume da solução de trabalho foi reduzido para 164µL.

### **Determinação de GAGs sulfatados em amostras de urina com utilização do corante Azul de dimetilmetileno**

Os métodos que utilizam azul de dimetilmetileno (DMB) diferenciam-se pela forma de preparo dos corantes. BUFFINGTON et al. (1996) utilizaram o formato sódico como tampão, já BARBOSA et al. (2003) realizaram o protocolo com uso de duas soluções contendo guanidina, enquanto GRANT et al. (2006) quantificaram GAGs pelo uso de padrão de sulfato de condroitina com DMB em tampão acetato sódico.

#### ***Método descrito por BUFFINGTON et al. (1996)***

O método utilizado pelos autores empregou o SCC como padrão para quantificação de GAGs em urina de felinos sadios e acometidos por cistite intersticial.

**PROTOCOLO**

reagente	16mg de DMB + 5mL de etanol 95%, diluídos em 1L de tampão formato sódico (2g de formato sódico e 2mL de ácido fórmico/L, em pH 3,5).
branco	2,5mL de reagente + 250µL de água
padrão	2,5mL de reagente + solução de SCC <sup>2</sup> em concentrações 0 a 10µg + água q.s.p. 250µL
teste	2,5mL de reagente + 250µL de urina

***Método descrito por BARBOSA et al. (2003)***

Neste método, os autores quantificaram GAGs urinários provenientes de tecidos musculares e pele de ratos previamente tratados com proteinase k.

**PROTOCOLO**

solução complexadora	16mg de DMB <sup>2</sup> + 25mL etanol 5% filtrados em papel. A esta solução, adição de 100mL de hidrocloreto de guanidina <sup>3</sup> 1M + 1g de formato sódico + 1mL de ácido fórmico 98% + água q.s.p 500mL
solução descomplexadora	50mM de tampão acetato sódico (pH 6,8) + 10% de propanol-1 em hidrocloreto de guanidina para concentração final de 4M
padrão	1mL da solução complexadora + 1 a 5µg de SCC – precipitação e adição de 1mL de solução descomplexadora
teste	1mL da solução complexadora + amostra biológica – precipitação e adição de 1mL de solução descomplexadora

***Método descrito por GRANT et al. (2006)***

O método utilizado pelos autores empregou o SCC como padrão para quantificação de GAGs urinários de cães saudáveis.

---

<sup>3</sup> AMRESCO, Cleveland, OH

## PROTOCOLO

reagente	11mg de DMB <sup>2</sup> + 1L de tampão acetato sódico 0,05M em pH 4,75 (estável a temperatura ambiente em recipiente escuro por até um mês)
branco	2,5mL de reagente + 250µL de água
padrão	2,5mL de reagente + solução de SCC <sup>2</sup> em concentrações 0 a 35µg + água q.s.p. 250µL
teste	2,5mL de reagente + 250µL de urina

## MODIFICAÇÕES TESTADAS

Varição do volume de urina do teste
Dosagens de SCC do padrão e do teste imediatamente após a homogeneização da amostra e em tempos seqüenciais que não excederam 12 minutos do preparo das amostras

Para a padronização do método, também foi investigada a necessidade de centrifugação da urina de felino antes da dosagem do SCC. As amostras foram centrifugadas a 1500rpm e a 14000rpm, durante cinco minutos, antes do preparo do teste.

## Resultados

### Corantes Azure A e Azure B (THUY & NYHAN, 1992)

O espectro de absorção da solução de corantes de Azure A e B foi obtido na ausência e na presença de 5µg de SCC (Figura 1). Os resultados mostraram que o comprimento de onda que apresentou melhor absorção situou-se na faixa entre 601 e 640nm. Apesar de o espectro obtido apresentar perfil diferente daquele obtido por THUY & NYHAN (1992), escolheu-se 610nm devido ao fato dos autores afirmarem que o método apresentava boa sensibilidade e linearidade nesse comprimento de onda. Entretanto, conforme pode ser observado na Figura 2, a representação de absorbância *versus* concentração não foi linear e, de acordo com a equação da reta apresentada, o

b é negativo ( $b = -0,1666$ ), sugerindo que em concentrações baixas esse método não possui sensibilidade para detectar a presença de SCC na urina.

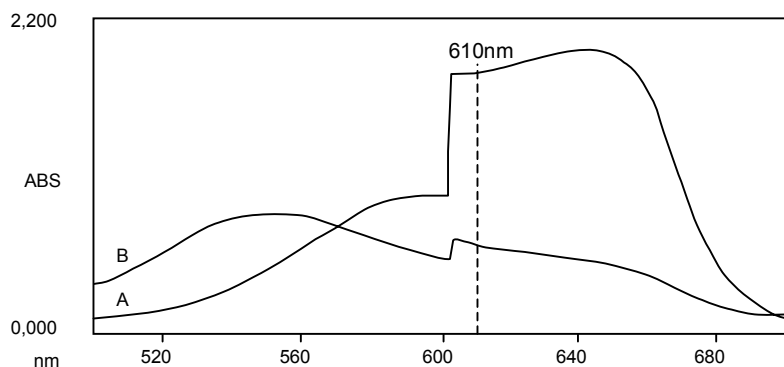


Figura 1 - Espectro de absorção do corante composto por Azure A e B, (A) na ausência e (B) na presença de 5µg de SCC.

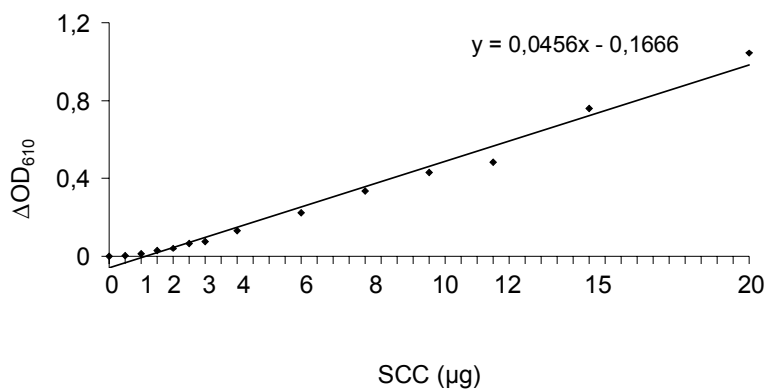


Figura 2 – Representação gráfica da concentração de SCC versus absorbância utilizando o corante composto por Azure A e B, sob leitura a 610nm.

Comportamento semelhante ao mostrado na Figura 2 foi observado quando as soluções dos corantes Azure A e B foram preparadas separadamente e diluídas na proporção recomendada pelos autores.

Como os autores do método não explicitaram se para as quantidades dos reagentes Azure A e B foram considerados os pesos dos produtos ou dos princípios

ativos puros, o método também foi testado com preparo de solução estoque corrigida. Este procedimento não modificou os resultados previamente obtidos.

Dentre as diluições testadas para a solução de trabalho, preparadas a partir da solução estoque e da solução estoque corrigida, os resultados melhores foram obtidos com as diluições 1:9 e 1:14. Houve melhora da sensibilidade para concentrações baixas sem, no entanto, melhorar a linearidade da curva para ambas as soluções (Figura 3).

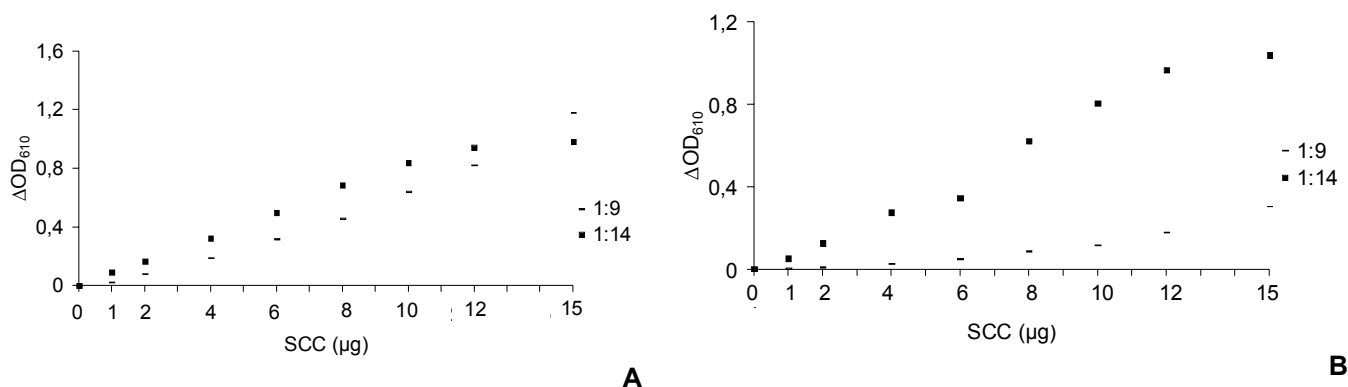


Figura 3 - Curva padrão para o SCC com corante composto por Azure A e B, sob leitura a 610nm, com solução de corantes diluída a (○) 1:9 e (■) 1:14 para a solução de trabalho proveniente de (A) solução estoque e (B) solução estoque corrigida.

A adição de SCC na urina de felino e sua recuperação utilizando volume de solução de corantes diferente do recomendado pelos autores mostrou valores não proporcionais (Tabela 1).

No que se refere às amostras preparadas com urina de felino e de humano para a quantificação de SCC, as leituras foram muito baixas, o que poderia explicar a obtenção de resultados desproporcionais (Tabelas 2 e 3). O aumento do volume de urina acarretou em alteração da cor do meio de reação, interferindo assim na dosagem do SCC urinário. Nesse sentido, outra estratégia realizada foi a precipitação de SCC, presente na amostra contendo o referido padrão ou urina, com etanol gelado e sua solubilização em volume menor. Tal procedimento também não resolveu o problema devido à baixa recuperação de SCC no precipitado e à obtenção de leituras baixas, conforme exemplifica a Tabela 4.

Tabela 1 - Dosagem de SCC adicionado à urina de felino, com corante composto por Azure A e B, sob leitura a 610nm.

Corante (µL)	SCC (µg)	Urina (µL)	Água (µL)	Leitura do branco (Å)	Leitura da amostra (Å)	$\Delta OD_{610}$
	0		836		1,693	0,080
164	4	1000	816	1,773	1,644	0,129
	8		796		1,583	0,190

Tabela 2 - Testes com diferentes volumes de urina de felino com uso de reagentes Azure A e B, sob leitura a 610 nm.

Urina (µL)	Água (µL)	Leitura do branco (Å)	Leitura da amostra (Å)	$\Delta OD_{610}$
110	40		1,712	0,021
150	0	1,733	1,708	0,025

Tabela 3 - Testes com diferentes volumes de urina humana com uso de corantes Azure A e B, sob leitura a 610 nm.

Urina (µL)	Água (µL)	Leitura do branco (Å)	Leitura da amostra (Å)	$\Delta OD_{610}$
50	100		1,757	0,050
100	50	1,807	1,671	0,136

Tabela 4 - Padrão de SCC (1µg/5µL) e urina de felino com corantes Azure A e B, tratadas com etanol, sob leitura a 610nm.

Amostra	Volume da amostra (µL)	Volume de etanol (µL)	Leitura do branco (Å)	Leitura da amostra (Å)	$\Delta OD_{610}$
urina	400	1200		1,666	0,012
SCC	400	1200	1,678	1,729	-0,051

A última modificação realizada foi a avaliação do efeito do tempo de incubação dos reagentes com o SCC e da temperatura, na qual não se evidenciou diferença significativa entre as curvas (Figura 4).

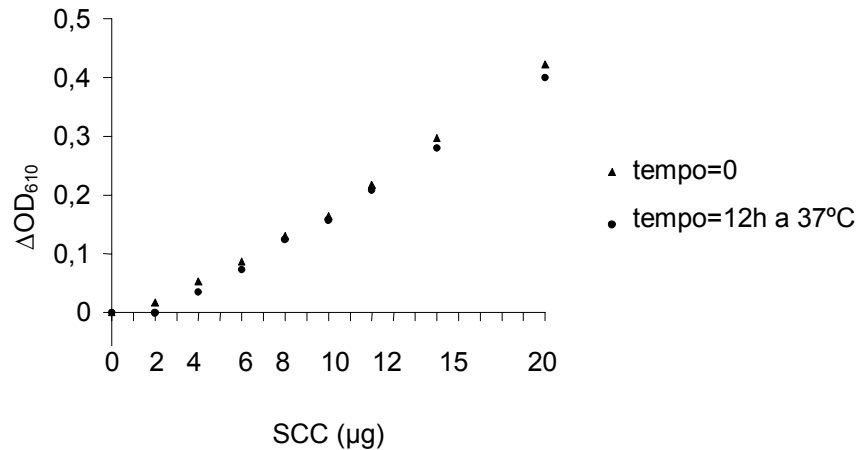


Figura 4 - Curva padrão de SCC com solução de corantes composta por Azure A e B, sob leitura a 610nm, para avaliação da influência do tempo e da temperatura.

Apesar das tentativas, o método não se mostrou adequado para a determinação de SCC na urina de felinos ou humanos. Outro fato que contribuiu para a procura de outros métodos foi a informação dada por um dos autores de que o método havia sido abandonado em seu laboratório.

## **Corante DMB**

### ***Método descrito por BUFFINGTON et al. (1996)***

O corante foi preparado de acordo com a metodologia proposta pelos autores e o espectro de absorção foi obtido na ausência e na presença de 20µg de SCC, conforme representado na Figura 5. Na ausência de SCC, o pico de absorção ocorreu a 643nm (leitura de absorbância - A - de 0,920). Na presença de 20µg de SCC houve pico a 523nm (leitura de 0,573). A escolha do comprimento de onda baseou-se na interseção entre as curvas, que ocorreu a 543nm e, assim, estabeleceu-se 540nm como adequado para os estudos subsequentes.

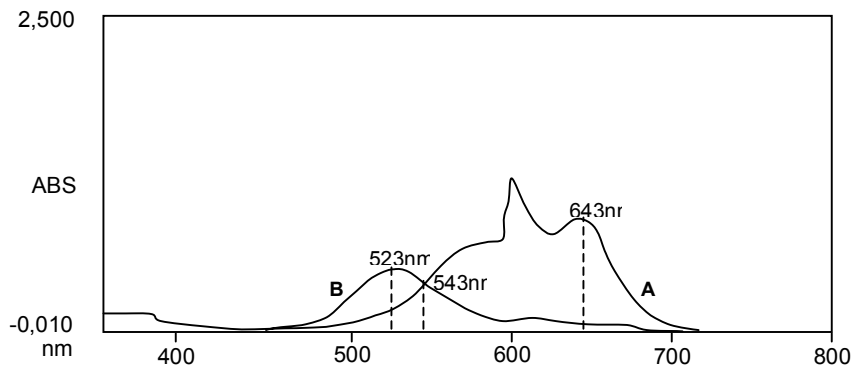


Figura 5 - Espectro de absorção para o DMB em tampão formato sódico, na ausência (A) e presença (B) de 20µg de SCC

Os resultados obtidos do estudo do efeito da concentração de SCC sobre a absorbância mostraram que o valor máximo de  $\Delta OD$  foi muito baixo (para 10µg de SCC, A de 0,117). Além disso, a curva padrão mostrou-se linear somente até 4µg de SCC (Figura 6), fatos que sugeriram que o método não apresentou sensibilidade adequada para a realização das quantificações.

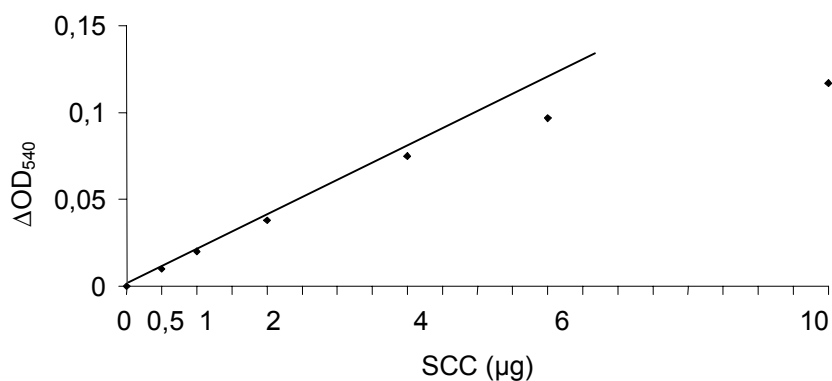


Figura 6 - Curva padrão de SCC com corante DMB em tampão formato sódico, sob leitura a 540nm.

### ***Método descrito por BARBOSA et al. (2003)***

O espectro de absorção da solução complexadora de corantes revelou pico de absorção a 650nm (A de 0,892) e platô entre 530 e 570nm (leituras entre 0,486 e 0,556), como mostra a Figura 7A. A solução descomplexadora de corantes mostrou platô entre 520 e 560nm (leituras entre 0,486 e 0,546), como se encontra na Figura 7B. Na presença de padrão com 4µg de SCC, houve pico a 654nm (leitura de 1,973) e platôs de 610 a 630nm (leituras entre 1,568 e 1,568) e de 520 a 560nm (leituras entre 0,266 e 0,375), conforme pode ser visualizado na Figura 7C. O comprimento de onda escolhido para as leituras foi de 535nm devido aos platôs semelhantes entre os três espectros de absorção avaliados.

Entretanto, após centrifugação da amostra contendo a solução complexadora e SCC, etapa essencial para retirada do corante não ligado, o precipitado colorido formado não era estável e, ao ser descartado o sobrenadante, era facilmente perdido, o que prejudicou a precisão do método.

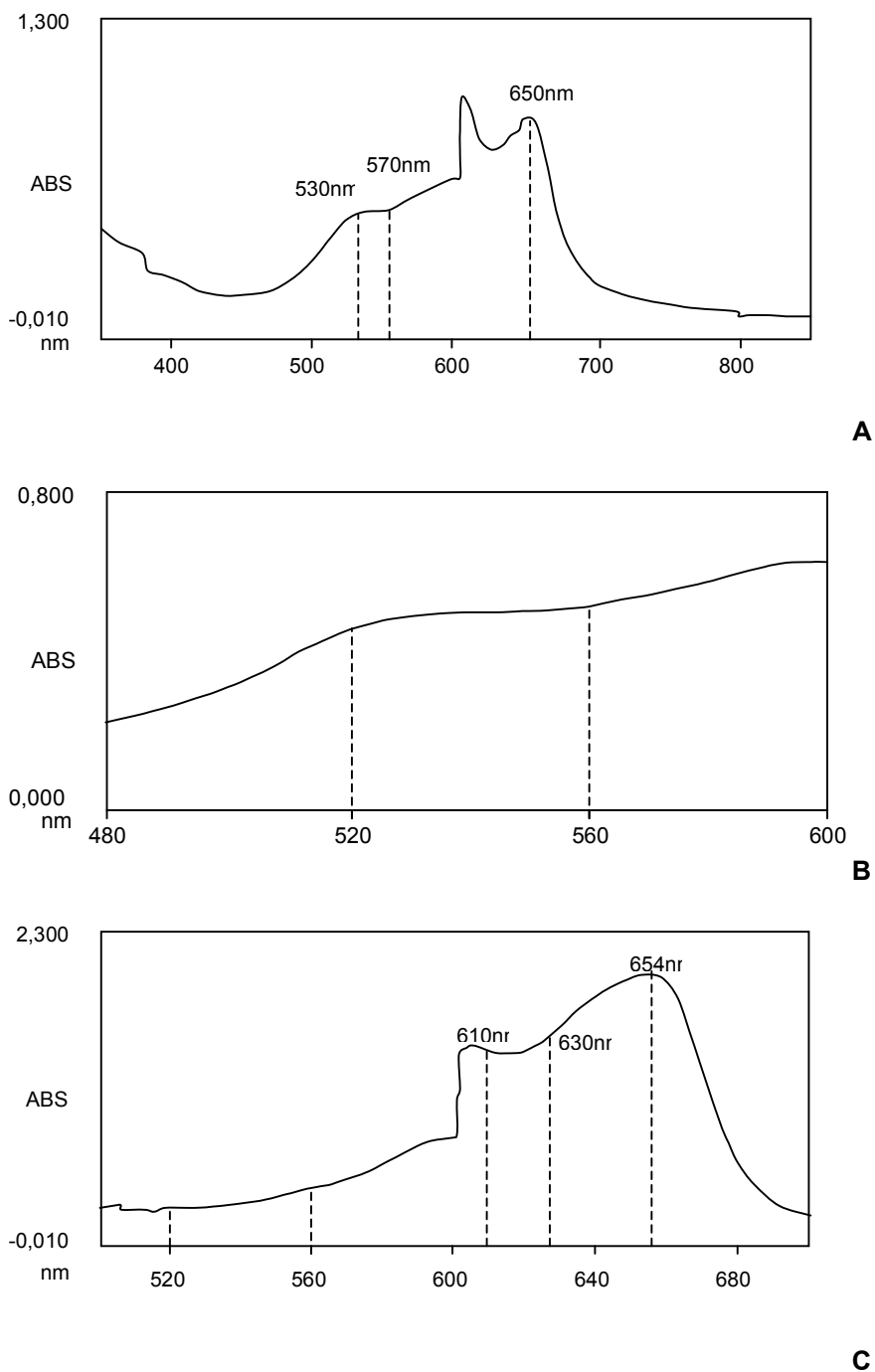


Figura 7 - Representação gráfica do espectro de absorção para (A) solução complexadora de corantes, (B) solução descomplexadora e (C) padrão com 4 $\mu$ g de SCC.

A fim de investigar a recuperação do complexo formado, foram utilizadas duas concentrações diferentes de SCC. As leituras obtidas a 535nm não foram proporcionais, o que mostrou a inadequação do método (Tabela 5).

Tabela 5 - Padrão com SCC (1 $\mu$ g/20 $\mu$ L), sob leitura a 535nm, utilizando solução complexadora / descomplexadora.

SCC ( $\mu$ g)	Leitura do branco ( $\text{\AA}$ )	Leitura da amostra ( $\text{\AA}$ )	$\Delta\text{OD}_{535}$
3	0,483	0,292	0,191
5		0,288	0,195

### **Método descrito por GRANT et al. (2006)**

A solução de corante DMB preparada em tampão acetato de sódio foi submetida à análise do espectro de absorção na ausência e na presença de 4 $\mu$ g de SCC, como representado na Figura 8. Para ambas as situações, houve maior pico de absorção a 648nm (A de 0,712 na ausência e de 0,536 na presença de SCC) e outro menor a 590nm (A de 0,629 na ausência e de 0,462 na presença de 4 $\mu$ g SCC). O comprimento de onda escolhido para as análises subseqüentes foi o de 648nm.

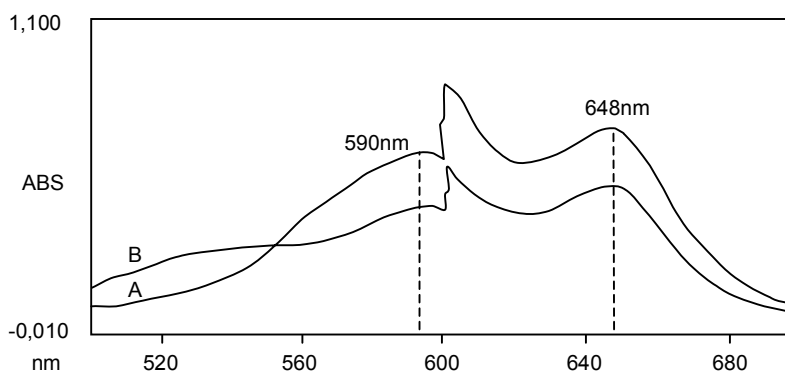


Figura 8 - Espectro de absorção da solução de corante DMB em tampão acetato sódico na ausência (A) e presença (B) de padrão com 4 $\mu$ g de SCC.

O estudo do efeito da concentração do SCC sobre a absorvância mostrou linearidade e sensibilidade adequadas para concentrações de 0 a 15 $\mu$ g (Figura 9A), com coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,9977.

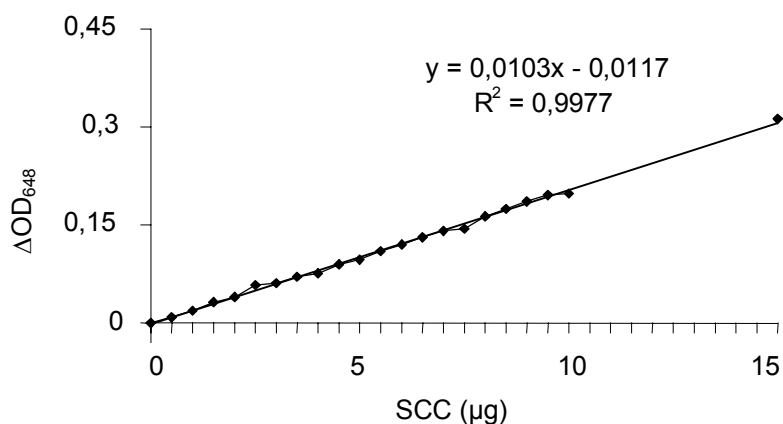


Figura 9 - Representação gráfica da curva padrão do SCC com corante DMB em tampão acetato sódico, sob leitura a 648nm, de 0 a 15µg de SCC.

Para avaliar a necessidade de centrifugação da urina para as análises, foram testadas amostras na forma não tratada e centrifugada (Tabela 6). Não houve diferença significativa entre as leituras das urinas sob os diferentes tratamentos. Assim, empregou-se como padrão a urina não tratada.

Tabela 6 - Quantificação de SCC em teste contendo urina de felino, com corante DMB em tampão acetato sódico. Tratamentos - nenhum, centrifugação a 1500rpm por 5 minutos e a 14000rpm por 5 minutos, sob leitura a 648nm.

Tratamento	Volume de urina (µL)	Leitura do branco (Å)	Leitura da amostra (Å)	$\Delta OD_{648}$
Nenhum	50	0,651	0,341	0,310
	125		0,312	0,339
Centrifugação a 1500rpm por 5 min	50	0,651	0,341	0,310
	125		0,305	0,346
Centrifugação a 14000rpm por 5 min	50	0,651	0,443	0,208
	125		0,330	0,321

Para determinar o volume de urina a ser empregado nas mensurações, foram utilizados volumes crescentes de urina de felino e verificou-se que há linearidade somente entre 20 e 50µL (Figura 10), o que sugere que, a partir desse volume, a cor da urina interfere no método.

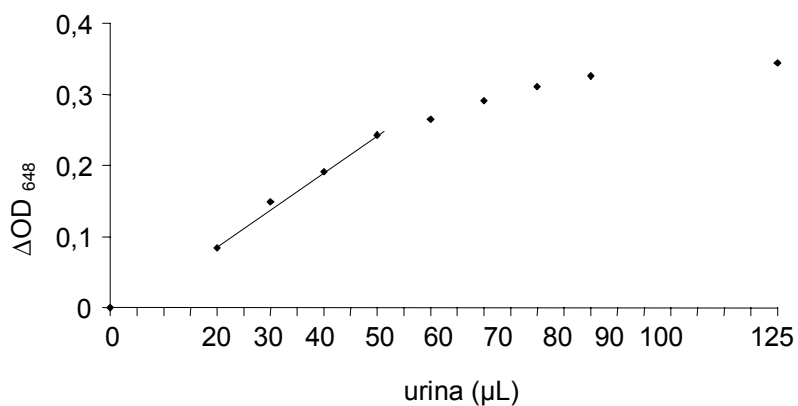


Figura 10 - Variações de densidade óptica de testes com diferentes volumes de urina de felino com corante DMB em tampão acetato de sódio, sob leitura imediata a 648nm.

A estabilidade do complexo formado entre o GAG e o corante, avaliada pela leitura de absorbância entre 0 a 12 minutos após a homogeneização do meio de reação, pode ser visualizada na Figura 11, que mostra que a leitura das amostras deve ser imediata.

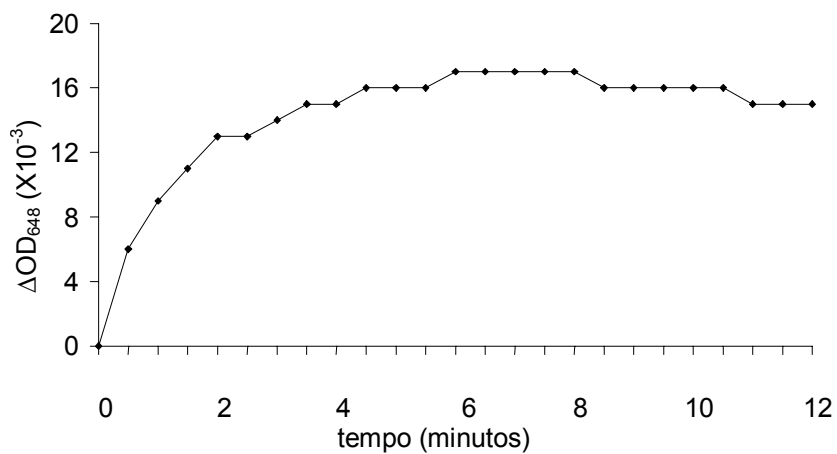


Figura 11 - Representação gráfica dos tempos de leitura, a 648nm, de teste com urina de felino, com corante DMB em tampão acetato sódico.

## Discussão

Dentre os GAGs presentes no organismo, as formas sulfatadas encontradas na urina (sulfatos de heparana, dermatana, queratana e de condroitina A e C), podem ser mensuradas, tanto para estudo de doenças sistêmicas como do próprio trato urinário. Métodos quantitativos colorimétricos distintos têm sido propostos, tais como os descritos por THUY & NYHAN (1992), BUFFINGTON et al. (1996), BARBOSA et al. (2003) e GRANT et al. (2006). A sucessão de publicações de métodos diferentes é sugestiva de que os pesquisadores interessados pela dosagem de GAGs ainda estão em busca de um método com as características ideais, ou seja, sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, facilidade de execução e custo baixo. Assim, ainda não existe um método definitivo, mas os resultados relativos às aplicações testadas parecem ser suficientemente satisfatórios para dar continuidade a esta metodologia.

THUY & NYHAN (1992) quantificaram GAGs urinários de pacientes pediátricos acometidos por mucopolissacaridose. Para este fim, propuseram teste com corante composto por Azure A e B e o compararam a outros que empregam os corantes AB e DMB. A técnica testada com AB não foi sensível o suficiente e, embora o método do DMB tenha sido considerado melhor, sua sensibilidade limitou-se ao intervalo de 1 a 6 $\mu$ g de GAGs. Segundo os autores, a técnica proposta com os corantes Azure A e B utiliza 50 ou 100 $\mu$ L de urina e a curva padrão apresenta função linear de 1 a 20 $\mu$ g de GAGs sob leitura a 610nm. No presente estudo, os ensaios realizados para a reprodução da técnica proposta mostraram resultados discrepantes dos publicados. As leituras foram obtidas a 610nm, comprimento de onda escolhido devido ao fato de que, segundo os autores, seria a faixa de melhor linearidade. Entretanto, neste trabalho, o comportamento da curva padrão não foi linear e, para concentrações baixas de SCC, o método não mostrou sensibilidade adequada. Além disso, modificações na técnica e tentativa de recuperação de SCC no meio de reação foram ineficientes e levaram a valores não proporcionais. Em busca de informações que viabilizassem o estudo, foi feito contato com um dos autores, que informou que o referido método fora abandonado pelo laboratório de origem.

Em estudo conduzido por BUFFINGTON et al. (1996), a quantificação de GAGs sulfatados em urina de felinos foi realizada com emprego do corante DMB em tampão formato sódico e o SCC foi utilizado como padrão. Segundo os autores, o método não é influenciado por concentrações urinárias de fármacos como os antibióticos e a técnica é sensível para menos de 0,4mg/dL de SC, o que corresponderia a 10µg no meio de reação. No presente trabalho, os estudos referentes a este método mostraram que a curva padrão obtida apresentou leituras extremamente baixas e sensibilidade somente até 4µg de SCC, o que impossibilitou a reprodução do método conforme proposto.

BARBOSA et al. (2003) realizaram mensuração direta de GAGs sulfatados em amostras musculares, cutâneas e provenientes de cultivo celular mioblástico. O procedimento envolveu isolamento de precipitado insolúvel e estável gerado após complexação entre GAG e corante com DMB, o que, segundo os autores, melhorou a linearidade, acurácia e especificidade do método colorimétrico. O espectro de absorção para a solução complexadora de corantes mostrou pico a 600nm e 650nm (A de aproximadamente 0,85 e 1,30, respectivamente) e, para meio de reação contendo 5µg de SC, houve um pico a 656nm e outro a 610nm (A de aproximadamente 1,30 e 0,65, respectivamente). Na presente pesquisa, a solução complexadora de corantes revelou pico de absorção a 650nm (A de 0,892) e, havendo 4µg de SCC no meio, a 654nm (A de 1,973). Porém, apesar dos resultados obtidos terem sido semelhantes aos relatados pelos autores, verificou-se comprometimento da reprodutibilidade do método e da acurácia dos resultados. A etapa de descarte do sobrenadante subsequente à centrifugação, requerida para retirada do corante não ligado, fez com que o precipitado fosse perdido facilmente. As várias tentativas de estabilização do complexo formado e da recuperação de SCC foram improdutivas e, finalmente, o referido método foi dado como inapropriado para as quantificações desejadas.

Recentemente, GRANT et al. (2006) mensuraram glicosaminoglicanos urinários de cães adultos sadios por meio de teste colorimétrico com DMB em tampão acetato sódico e padrão com SCC. A técnica foi uma adaptação do método desenvolvido por MITSUHASHI et al. (1993) para humanos e, segundo esses autores, não há interferência de proteinúria, problema comum encontrado em outros métodos com DMB, como os que utilizam o tampão fosfato sódico. Do mesmo modo, para o presente

estudo feito com urina de gatos, foram feitas algumas adaptações. Embora GRANT et al. (2006) tenham utilizado urina centrifugada para a quantificação de SCC urinário, na presente pesquisa a centrifugação das amostras de urina não modificou a resposta dos testes. De acordo com DE JONG et al. (1989) e MITSUHASHI et al. (1993), a urina não necessita de tratamento prévio para mensurações realizadas com DMB.

Outra modificação foi relacionada ao volume da amostra de urina para os testes, uma vez que se observou, na primeira oportunidade, mudança do espectro de cor (de azul para cinza esverdeado) com a adição de urina. O DMB possui propriedade de metacromasia, ou seja, o corante mostra coloração azul na ausência de GAGs sulfatados e torna-se róseo na presença dessas substâncias (TEMPLETON, 1988). Quando da realização dos procedimentos para a curva padrão, foram observados, claramente, os gradientes de conversão de azul para rosa, o que permitiu a conclusão de que os pigmentos da urina poderiam ser a causa da tonalidade verde. No ensaio desenvolvido por GRANT et al. (2006) foram empregados 250µL, então se optou por testar volumes menores de urina de felino, sem alteração do volume total da solução. Os resultados revelaram linearidade somente para os volumes de 20 a 50µL de urina. Assim, no presente estudo, foram empregados 30µL. Sobre este aspecto, outros pontos devem ser salientados. Os gatos podem apresentar urina tão diluída (50mOsm/kg) quanto as de cães ou de humanos, mas, comumente, sua urina é bem mais concentrada. A osmolalidade da urina de gatos pode atingir valores superiores a 3200mOsm/kg, enquanto a de cães chega a 2700mOsm/kg e a de humanos não ultrapassa 1500mosm/kg (OSBORNE et al., 1995). A coloração normal da urina é dada pela presença de pigmentos representados, principalmente, pelo urocromo e pela urobilina. Quanto maior for a concentração da urina, maior será a quantidade destes pigmentos. Sabidamente, conforme a intensidade da cor da urina podem ocorrer graus variados de interferência com os resultados dos testes colorimétricos (OSBORNE et al., 1995).

A curva obtida por GRANT et al. (2006), sob leitura a 520nm, mostrou linearidade entre 0 e 7,5mg/dL de SCC, que corresponde a 18,75µg no meio de reação, além de  $R^2 > 0,98$ . No presente trabalho, observou-se linearidade entre 0 e 15µg de SCC e  $R^2 = 0,9977$ . Com relação ao espectro de absorção do corante, houve um pico a 648nm e

outro a 590nm. Esses achados corroboram os dados de TEMPLETON (1988) que, estudando as propriedades de absorção do DMB em reação com GAGs sulfatados, encontrou espectro de absorção para o corante com picos a 648nm e a 593nm, havendo ou não SC na solução.

Embora GRANT et al. (2006) tenham realizado leitura do meio de reação um minuto após a homogeneização, na presente pesquisa, observou-se que decorridos 30 segundos, houve queda evidente de densidade óptica. De fato, FARNDALE et al. (1986) apontaram que o complexo entre GAG e DMB pode precipitar rapidamente (perda de aproximadamente 4% do complexo em um minuto), o que exige que as amostras sejam lidas nos primeiros 15 segundos após o preparo. Assim, utilizou-se como padrão para este estudo a leitura imediata após homogeneização do meio de reação. Além disso, neste estudo foi utilizado material de plástico descartável, conforme recomendado por FARNDALE et al. (1986), uma vez que o complexo entre GAG e DMB tende a aderir às paredes dos tubos.

## Conclusões

1. Dos métodos colorimétricos testados para a mensuração de GAGs urinários de felinos, o único que se mostrou adequado, após algumas modificações, foi o descrito por GRANT et al. (2006), que emprega o corante DMB;
2. as modificações consistiram de (a) redução do volume de urina de 250 $\mu$ L para 30 $\mu$ L com adição de 220 $\mu$ L de água, (b) alteração do intervalo entre a preparação da solução teste e a leitura, que era de 1 minuto e foi eliminado, passando-se para leitura imediata, e (c) dispensa da centrifugação das amostras de urina, que quando provenientes de gatos saudáveis, são límpidas; e
3. assim, o método descrito neste trabalho, dadas suas características técnicas, facilidade de execução e custo baixo, pode ser indicado para dosagem de GAGs fosfatados totais em amostras de urina de gatos.

## Referências

AKÇAY, T., KONUKOĞLU, D., DINÇER, Y. Urinary glycosaminoglycan excretion in urolithiasis. **Archives of Disease in Childhood**, London, v. 80, p. 271-272, 1999.

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. D. In: **Biologia Molecular da célula**, 3ª ed., Artes Médicas, Porto Alegre, 1997, p. 972-978.

ATAHAN, O., DAYIGIL, O., HIZEL, N., YAVUZ, O., METIN, A. Urinary glycosaminoglycan excretion in bladder carcinoma. **Scandinavian Journal of Urology and Nephrology**, Stockholm, v. 30, n. 3, p. 173-177, 1996.

BARBOSA, I., GARCIA, S., BARBIER-CHASSEFIÈRE, V., CARUELLE, J. P., MARTELLY, I., PAPY-GARCIA, D. Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies. **Glycobiology**, Oxford, v. 13, n. 9, p. 647-653, 2003.

BUFFINGTON, C. A. T., BLAISDELL, J. L., BINNS, S. P., WOODWORTH, B. E. Decreased urine glycosaminoglycan excretion in cats with interstitial cystitis. **The Journal of Urology**, Baltimore, v. 155, p. 1801-1804, 1996.

CENGİZ, N., BASKIN, E., ANARAT, R., AGRAS, P. I., YILDIRIM, S. V., TIKER, F., ANARAT, A., SAATCI, U. Glycosaminoglycans in childhood urinary tract infections. **Pediatric Nephrology**, Berlin, v. 20, p. 937-939, 2005.

DE JONG, J. G. N., WEVERS, R. A., LAARAKKERS, C., POORTHULS, B. H. H. M. Dimethylmethylene blue-based spectrophotometry of glycosaminoglycans in untreated urine: a rapid screening procedure for mucopolysaccharidoses. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 35, n. 7, p. 1472-1477, 1989.

DE JONG, J. G., WEVERS, R. A., LAARAKKERS, C., POORTHUIS, B. J. Dimethylmethylene blue-based spectrophotometry of glycosaminoglycans in untreated

urine: a rapid screening procedure for mucopolysaccharidoses. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 39, n. 1, p. 163-164, 1993.

DE JONG, J. G., HEIJS, W. M., WEVERS, R. A. Mucopolysaccharidoses screening: dimethylmethylene blue versus alcian blue. **Annals of Clinical Biochemistry**, London, v. 31, n. 3, p. 267-271, 1994.

DE MURO, P., FAEDDA, R., SATTA, A., DONATELLA, F., MASALA, A., CIGNI, A., SANNA, G. M., CHERCHI, G. M. Urinary glycosaminoglycan composition in chronic glomerulonephritis. **Journal of Nephrology**, Roma, v. 18, n. 2, p. 154-160, 2005.

DIAL, S. M., BYRNE, T., HASKINS, M., GASPER, P. W., ROSE, B., WENGER, D. A., THRALL, M. A. Urine glycosaminoglycan concentrations in mucopolysaccharidosis VI-affected cats following bone marrow transplantation or leukocyte infusion. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 263, p. 1-14, 1997.

ERICKSON, D. R., ORDILLE, S., MARTIN, A., BHAVANANDAN, V. P. Urinary chondroitin sulfates, heparan sulfate and total sulfated glycosaminoglycans in interstitial cystitis. **The Journal of Urology**, Baltimore, v. 157, p. 61-64, 1997.

ERTURK, E., KIERNAN, M. SCHOEN, S. R. Clinical Association with urinary glycosaminoglycans and urolithiasis. **Urology**, New York, v. 59, n. 4, p. 495-499, 2002.

FARNDAL, W. R., BUTTLE, D. J., BARRETT, A. L. Improved quantitation and discrimination of sulfated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 883, p. 173-177, 1986.

FERRARA, P., RIGANTE, D., LAMBERT-GARDINI, S., SALVAGGIO, E., RICCI, R., CHIOZZA, M. L., ANTUZZI, D. Urinary excretion of glycosaminoglycans in patients with isolated nocturnal enuresis or combined with diurnal incontinence. **British Journal of Urology International**, Oxford, v. 86, p. 824-825, 2000.

GOLD, E. W. The quantitative spectrophotometric estimation of total sulfated glycosaminoglycan levels. Formation of soluble alcian blue complexes. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 673, n. 4, p. 408-415, 1981.

GRANT, D. C., FORRESTER, D., PANCIERA, D. L., MELDRUM, J. B. Measurement of urinary glycosaminoglycans in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.67, n. 1, p. 51-55, 2006.

HENNESSEY, P. T., HURST, R. E., HEMSTREET, G. P., CUTTER, G. Urinary glycosaminoglycan excretion as a biochemical marker in patients with bladder carcinoma. **Cancer Research**, Chicago, v. 41, n. 10, p. 3868-3873, 1981.

HURST, R. E., RHODES, S. W., ADAMSON, P. B., PARSONS, C. L., ROY, J. B. Functional and structural characteristics of the glycosaminoglycans of the bladder luminal surface. **The Journal of Urology**, Baltimore, v. 138, p. 433, 1987.

HURST, R. E., PARSONS, C. L., ROY, J. B., YOUNG, J. L. Urinary glycosaminoglycan excretion as a laboratory marker in the diagnosis of interstitial cystitis. **The Journal of Urology**, Baltimore, v. 149, p. 31-35, 1993.

HURST, R. E. Structure, function, and pathology of proteoglycans and glycosaminoglycans in the urinary tract. **World Journal of Urology**, Berlin, v.12, n. 1, 1994.

HURST, R. E., ROY, J.B., MIN, K. W., VELTRI, R. W., MARLEY, G., PATTON, K., SHACKELFORD, D. L., PARSONS, C. L. A deficit of chondroitin sulfate proteoglycans on the bladder uroepithelium in interstitial cystitis. **Urology**, New York, v. 48, n. 5, p. 817-821, 1996.

LEE, E. Y., KIM, S. H., WHANG, S. K., KWANG, K. Y., YANG, J. O., HONG, S. Y. Isolation, identification and quantitation of urinary glycosaminoglycans. **American Journal of Nephrology**, Basel, v. 23, n. 3, p. 152-157, 2003.

MABE, P., VALIENTE, A., SOTO, V., CORNEJO, V., RAIMANN, E. Evaluation of reliability for urine mucopolysaccharidosis screening by dimethylmethylene blue and Berry spot tests. **Journal of the American Society of Nephrology**, Baltimore, v. 16, n. 6, p. 1703-1710, 2004.

MICHELACCI, Y. M., GLASHAN, R. Q., SCHOR, N. Urinary excretion of glycosaminoglycans in normal and stone forming subjects. **Kidney International**, New York, v. 36, p. 1022-1028, 1989.

MITSUHASHI, H., TSUKADA, Y., ONO, K., YANO, S., NARUSE, T. Urine glycosaminoglycans and heparan sulfate excretions in adult patients with glomerular diseases. **Clinical Nephrology**, Baltimore, v. 39, n. 5, p. 231-238, 1993.

MORITA, H., YOSHIMURA, A., INUI, K., IDEURA, T., WATANBE, H., WANG, L., SOININEN, R., TRYGGVASON, K. Heparan sulfate of perlecan is involved in glomerular filtration. **Journal of the American Society of Nephrology**, Baltimore, v. 16, n. 6, p. 1703-1710, 2005.

OSBORNE, C. A., STEVENS, J. B., LULICH, J. P., ULRICH, L. K., BIRD, K. A., KOEHLER, L. A., SWANSON, L. L. A clinician's analysis of urinalysis. In: OSBORNE, C. A., FINCO, D. R. **Canine and Feline Nephrology and Urology**, Williams & Wilkins, Baltimore, 1995, p. 136-205.

PANIN, G., NAIA, S., DALL'AMICO, R., CHIANDETTI, L., AZCHELLO, F., CATASSI, C., FELICI, L., COPPA, G. V. Simple spectrophotometric quantification of urinary excretion of glycosaminoglycan sulfates. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 32, n. 11, p. 2073-2076, 1986.

PARSONS, C. L., BOYCHUK, D., JONES, S., HURST, R., CALLAHAN, H. Bladder surface glycosaminoglycans: an epithelial permeability barrier. **The Journal of Urology**, Baltimore, v. 143, p. 139-142, 1990.

PASSEROTTI, C. C., BONFIM, A., MARTINS, J. R. M., DALL'OGGIO, M. F., SAMPAIO, L. O., MENDES, A., ORTIZ, V., SROUGI, M., DIETRICH, C. P., NADER, H. B. Urinary hyaluronan as a marker of the presence of residual transitional cell carcinoma of the urinary bladder. **European Urology**, Basel, v. 49, p. 71-75, 2006.

PEREIRA, D. A., AGUIAR, J. A., HAGIWARA, M. K., MICHELACCI, Y. M. Changes in cat urinary glycosaminoglycans with age and in feline urologic syndrome. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1672, n. 1, p. 1-11, 2004.

SARICA, K., TURKOLMEZ, K., SOYGUR, T., OZER, G., YAMAN, M. O., BALTACI, S., BEDUK, Y., MUFTUOGLY, Y. Z. Evaluation of urinary glycosaminoglycan in patients with renal cell carcinoma. **European Urology**, Basel, v. 31, n. 1, p. 54-57, 1997.

TEMPLETON, D. M. The basis and applicability of the Dimethylmethylene blue binding assay for sulfated glycosaminoglycans. **Connective Tissue Research**, Philadelphia, v. 17, n. 1, p. 23-32, 1988.

TENCER, J., TORFFVIT, O., GRUBB, A., BJÖRNSSON, S., THYSELL, H., RIPPE, B. Decreases excretion of urine glycosaminoglycans as marker in renal amyloidosis. **Nephrology Dialysis Transplantation**. New York, v. 12, p. 1161-1166, 1997.

THUY, L. P., NYHAN, W. L. A new quantitative assay for glycosaminoglycans. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 212, p. 17-26, 1992.

TSUJIHATA, M., MIYAKE, O., YOSHIMURA, K., KAKIMOTO, K., TAKAHAR, S., OKUYAMA, A. comparison of fibronectin content in urinary macromolecules between

normal subjects and recurrent stone formers. **European Urology**, Basel, v. 40, n. 4, p. 458-462, 2001.

TSUJIHATA, M., TSUJIKAWA, K., TEL, N., YOSHIMURA, K., OKUYAMA, A. Urinary macromolecules and renal tubular cell protection from oxalate injury: comparison of normal subjects and recurrent stone formers. **International Journal of Urology**, Tokyo, v. 13, n. 3, p. 197-201, 2006.

VIEIRA, F. A. C., BACCARIN, R. Y. A., AGUIAR, J. A. K., MICHELACCI, Y. M. Urinary excretion of glycosaminoglycans in horses: changes with age, training, and osteoarthritis. **Journal of Equine Veterinary Medicine**, v. 25, n. 9, p. 387-400, 2005.

WHITLEY, C. B., RIDNOUR, M. D., DRAPER, K. A., DUTTON, C. M., NEGLIA, J. P. Diagnostic test for mucopolysaccharidosis. I. Direct method for quantifying excessive urinary glycosaminoglycan excretion. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 35, n. 3, p. 374-379, 1989.

WRAIT, J. E. The mucopolysaccharidosis: a clinical review and guide to management. **Archives of Disease in Childhood**, London, v. 72, p. 263-267, 1995.

### **CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO DA EXCREÇÃO URINÁRIA DE GLICOSAMINOGLICANOS EM FELINOS EM CRESCIMENTO**

**Resumo** - Os glicosaminoglicanos (GAGs) são mucopolissacarídeos eliminados normalmente na urina. Vários autores sugerem que uma de suas funções seja de proteção ao epitélio vesical. Sua excreção urinária apresenta-se modificada em algumas doenças, como a cistite intersticial, de fisiopatogenia ainda não esclarecida e que acomete principalmente humanos e felinos. Os gatos têm sido considerados o melhor modelo para estudo da cistite intersticial. Esta pesquisa visou a contribuir com informações a respeito da excreção urinária de GAGs em felinos saudáveis em crescimento. Foram avaliados doze gatos, incluindo sete machos e cinco fêmeas, dos 30 aos 114 dias de vida, dos quais foram coletadas amostras de urina a cada 28 dias para quantificação de GAGs sulfatados totais. Para as mensurações, foi empregado o método de GRANT et al. (2006) com adaptações realizadas neste estudo. A excreção urinária de GAG sulfatado não foi influenciada pelo sexo, mas foi modificada pelo fator idade. Os valores foram significativamente mais altos aos 30 e aos 58 dias de idade em relação aos observados para as idades subsequentes (86 e 114 dias), revelando declínio das quantidades desta substância na urina de felinos desta faixa etária.

**Palavras-chave** – felinos, crescimento, urina, glicosaminoglicanos, sulfato de condroitina C.

## Introdução

Os glicosaminoglicanos (GAGs), macromoléculas extracelulares de natureza mucopolissacarídica, estão presentes em todo o organismo e são excretados normalmente na urina. Os principais GAGs incluem o ácido hialurônico, a heparina, os sulfatos de condroitina A e C, de queratana, heparana e dermatana (ALBERTS et al., 1997).

Os GAGs têm a propriedade de atrair íons sódio e, conseqüentemente, moléculas de água, dando origem a uma camada de gel (ALBERTS et al., 1997). Segundo HURST et al. (1987) e PARSONS et al. (1990), essa camada pode ter papel importante para manter a impermeabilidade do urotélio às moléculas presentes na urina. A penetração de substâncias, em decorrência de defeitos na camada de gel protetora, poderia causar lesão tecidual e liberação local de neurotransmissores e mediadores inflamatórios (PARSONS et al., 1990).

Diversos estudos com seres humanos mostraram alterações na excreção urinária de GAGs em pacientes com cistite intersticial (HURST et al., 1993, HURST et al., 1996 e ERICKSON et al., 1997), infecção de trato urinário (CENGIZ et al., 2005), carcinoma vesical (HENNESSEY et al., 1981, ATAHAN et al., 1996 e PASSEROTTI et al., 2006) e renal (SARICA et al., 1997), urolitíase vesical (ERTURK et al., 2002 e AKÇAY et al., 1999) e renal (TSUJIHATA et al., 2001 e TSUJIHATA et al., 2006), enurese noturna isolada ou combinada a incontinência urinária diurna (FERRARA et al., 2000), glomerulonefrite crônica (DE MURO et al., 2005) e amiloidose renal (TENCER et al., 1997). Os gatos são vitimados por muitas doenças do trato urinário inferior e a cistite intersticial (CI) é um problema grave e muito comum. BUFFINGTON et al. (1996) avaliaram felinos e verificaram diminuição do SCC em amostras de urina de gatos com CI em relação a gatos normais e apontaram as anormalidades de síntese, retenção ou inativação do GAG na superfície vesical como causa de sua redução na urina.

ERTURK et al. (2002) acreditam que incidência baixa de urolitíase em pacientes pediátricos pode estar associada às concentrações mais altas de GAGs urinários em crianças do que em adultos, fato bem documentado na literatura. Contudo, LEE et al. (2003), estudando indivíduos normais com 7 a 60 anos de idade, observaram que

independentemente do sexo, as concentrações urinárias de GAGs parecem ser baixas na infância, aumentam alcançando pico máximo na adolescência (10 a 19 anos de idade), após a qual há diminuição seguida por valores constantes com o passar da idade. Neste mesmo estudo, os autores verificaram que, com a idade, ocorre redução significativa da proporção de sulfato de condroitina em relação aos GAGs totais. VIEIRA et al. (2005) avaliaram a excreção urinária de GAGs em cavalos e observaram que os tipos mais comuns são os sulfatos de condroitina, de dermatana e de heparana. Além disso, os animais mais jovens apresentaram concentração maior de GAGs totais em relação aos adultos, achado semelhante aos observados para as espécies humana e felina.

A exemplo do que já foi descrito para seres humanos, os felinos podem apresentar modificações fisiológicas da concentração urinária de GAGs em função da idade. O objetivo deste estudo foi quantificar a excreção urinária de GAGs sulfatados em felinos em crescimento, durante o período compreendido entre os 30 e 114 dias de idade.

## **Material e Métodos**

### **Animais**

Foram avaliados 12 felinos sem raça definida, em fase de crescimento (três ninhadas de 2, 3 e 7 filhotes, totalizando 7 machos e 5 fêmeas), dos 30 aos 114 dias de idade. Os animais nasceram no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias da Unesp de Jaboticabal, para onde as mães foram levadas antes do parto.

### **Manejo e alimentação**

Mães e filhotes foram mantidos em gaiolas de aço inoxidável com 1m<sup>3</sup> de espaço disponível, onde havia caixa de papelão, potes com água e ração, e caixa sanitária.

Os filhotes foram mantidos com suas respectivas mães até o desmame. Durante os momentos reservados para limpeza das gaiolas, os gatinhos eram soltos para permitir diversão e socialização. De acordo com a época do desmame e a afinidade entre os filhotes, eles foram reagrupados aos pares.

A alimentação foi feita com ração comercial para filhotes felinos com 34% de proteína.

### **Coleta de material**

Foram coletadas amostras de urina dos felinos aos 30, 58, 86 e 114 dias de idade, totalizando 4 coletas. Para tanto, a micção era estimulada por meio de expressão manual da bexiga, no período compreendido entre 17:00h e 19:00h, que era estendido até 22:00 h quando algum animal apresentava a bexiga vazia.

Foram aproveitadas as urinas do jato médio coletadas em frascos estéreis (coletores universais). Após a homogeneização, as amostras foram armazenadas em dois criotubos estéreis com anel de vedação e capacidade para 1,5mL. O primeiro criotubo foi armazenado a -20°C e destinou-se à dosagem de creatinina urinária. O segundo foi conservado a -70°C para a quantificação de GAG.

### **Dosagem de creatinina urinária**

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Nefrologia e Urologia do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Júlio de Mesquita Filho, Unesp de Jaboticabal. Para a quantificação de creatinina urinária, utilizou-se o kit creatinina k<sup>4</sup>. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro modelo LabQuest<sup>4</sup>. Todas as amostras foram analisadas em duplicata para maior confiabilidade.

---

<sup>4</sup> LABTEST Diagnóstica, S. A., Lagoa Santa, MG

## **Dosagem de glicosaminoglicano urinário**

Todos os ensaios foram realizados no Laboratório de Enzimologia Aplicada do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Júlio de Mesquita Filho, Unesp Jaboticabal, sob a supervisão do Prof. Dr. João Martins Pizauro Júnior.

Para as quantificações, utilizou-se o método descrito por GRANT et al. (2006) com modificações feitas neste estudo.

A solução de corante foi composta de 11mg de DMB em 1L de tampão acetato sódico 0,05M em pH 4,75. A solução de DMB é estável a temperatura ambiente (23°C) em recipiente de plástico escuro por até um mês. A curva padrão contendo SCC<sup>2</sup> foi confeccionada em concentrações finais de 0 a 15µg.

O meio de reação, preparado em tubos de plástico, constituiu-se de 2500µL do corante, 30µL de urina e 220µL de água. As amostras que apresentaram leitura muito baixa foram repetidas, utilizando-se no máximo 50µL de urina e 200µL de água. O comprimento de onda para as leituras foi de 648nm.

No preparo das soluções para o ensaio foi usada água Milli Q e as leituras de absorbância foram realizadas a 648nm em espectrofotômetro Hitachi U-2000<sup>1</sup>.

## **Análise dos dados**

Os resultados da quantificação de GAG, obtidos em µg, foram convertidos para mg/dL e, juntamente com os resultados de creatinina urinária (em mg/dL) foram utilizados para obtenção da razão glicosaminoglicano:creatinina urinária (U-GAG/C) dos felinos, com a finalidade de excluir o efeito dado pelo grau de concentração da urina (FINCO, 2005).

Para análise dos resultados foi empregado o Statistical Analysis System (SAS), com o Teste de Normalidade de Anderson-Darling, o ANOVA para realizar a análise estatística descritiva e o teste de Tukey com confiança de 5% para comparação de médias dos valores de GAG (mg/dL) e da razão U-GAG/C, buscando diferenças para os fatores sexo e idade de coleta de urina dos felinos.

## Resultados

As médias dos valores obtidos de GAG (mg/dL) e da razão U-GAG/C encontram-se nas Tabelas 7 e 8 e na Figura 12. Os valores apresentaram distribuição normal e não houve diferença significativa quando se analisaram sexo ( $P=0,4852$  para GAG e  $P=0,5941$  para U-GAG/C), animal em relação ao sexo ( $P=0,9023$  para GAG e  $P=0,8174$  para U-GAG/C) e interação sexo e idade de coleta ( $P=0,0908$  para GAG e  $P=0,068$  para U-GAG/C). A variável idade de coleta mostrou diferença significativa entre as médias tanto para GAG ( $P<0,0001$ ) quanto para U-GAG/C ( $P=0,0004$ ). Para ambas as variáveis analisadas, as médias dos felinos para a idade de 58 dias revelaram valores mais altos e, para a idade de 114 dias, foram obtidas as médias mais baixas.

TABELA 7 - Médias, desvios padrões e teste de Tukey para os valores de GAG (mg/dL) de 12 felinos (7 machos e 5 fêmeas) avaliados neste estudo, dos 30 aos 114 dias de idade.

Idade (dias)	Sexo		
	Machos	Fêmeas	Média dos sexos
30	33,00 ± 14,10	31,08 ± 18,69	32,15 ± 15,21 <sup>ac</sup>
58	55,93 ± 16,88	72,14 ± 13,83	62,68 ± 17,39 <sup>b</sup>
86	38,64 ± 13,25	44,26 ± 13,59	40,98 ± 13,55 <sup>a</sup>
114	29,79 ± 7,85	29,03 ± 5,79	29,48 ± 6,98 <sup>c</sup>

\* Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5%.

TABELA 8 - Médias, desvios padrões e teste de Tukey para os valores de U-GAG/C de 12 felinos (7 machos e 5 fêmeas) avaliados neste estudo, dos 30 aos 114 dias de idade.

Idade (dias)	Sexo		
	Machos	Fêmeas	Média dos sexos
30	1,23 ± 0,97	0,58 ± 0,32	0,94 ± 0,79 <sup>ab</sup>
58	0,99 ± 0,46	1,23 ± 0,49	1,09 ± 0,47 <sup>a</sup>
86	0,55 ± 0,25	0,74 ± 0,36	0,63 ± 0,31 <sup>bc</sup>
114	0,49 ± 0,25	0,51 ± 0,27	0,50 ± 0,26 <sup>c</sup>

\* Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5%.

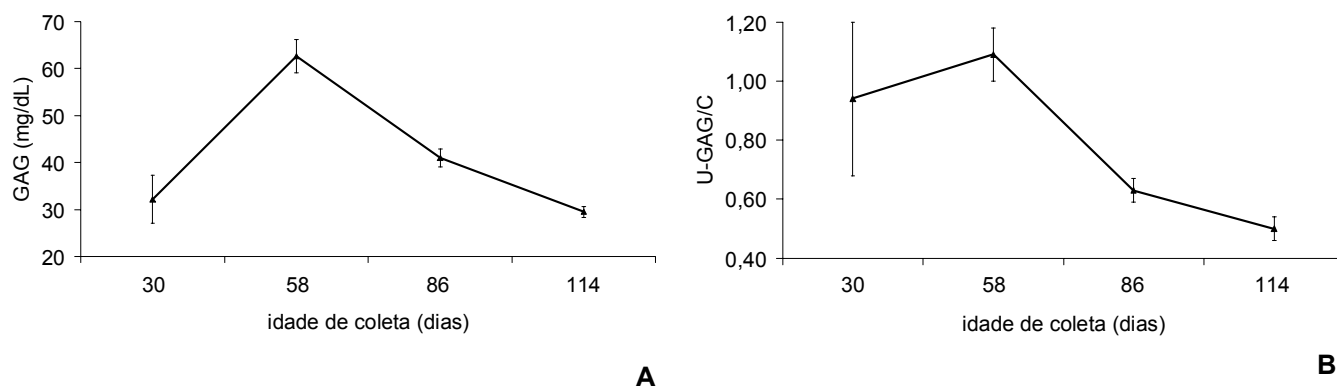


FIGURA 12 - Representação gráfica de médias e erros padrões para (A) GAG (mg/dL) e (B) para U-GAG/C, dos 30 aos 114 dias de idade dos 12 felinos.

## Discussão

O estudo dos GAGs vem ganhando importância na literatura, na medida em que diversas doenças vêm sendo associadas à alteração na sua excreção urinária. Para animais, a falta de um método padronizado para a mensuração dessas substâncias e a escassez de dados que contribuam para o estabelecimento de valores de referência, representam as maiores barreiras. As diferenças de metodologias e resultados apresentados nas pesquisas, bem como o número pequeno de publicações, dificultam a elucidação de doenças que podem estar relacionadas à alteração na excreção de GAGs. Para determinação de valores de referência, devem ser avaliados os aspectos que medeiam a mensuração dessas substâncias.

Segundo FARNDAL et al. (1986), dentre os GAGs quantificados em urina, os sulfatos de queratana e de dermatana são mensurados juntamente com o SC e, de acordo com esses autores, para a individualização dessas substâncias, faz-se necessário o uso de liases polissacarídicas específicas.

De acordo com MICHELACCI et al. (1989), do total de GAG excretado na urina de crianças, 92% são de SC e, em adultos, este valor corresponde a 80%. VIEIRA et al. (2005) quantificaram GAGs urinários em cavalos jovens, adultos sadios e acometidos por osteoartrite e verificaram que o SC prevalece sobre os demais.

No que diz respeito aos gatos, há poucos estudos, a maior parte deles está relacionada à doença metabólica mucopolissacaridose e existem poucos trabalhos

acerca da excreção de GAGs relacionada ao trato urinário. PEREIRA et al. (2004) identificaram os GAGs urinários de felinos filhotes, adultos sadios e acometidos por doenças idiopáticas do trato urinário inferior. De acordo com esses autores, o GAG mais prevalente foi o SC e, para os filhotes de 2.5 a 10 semanas de idade incluídos no estudo, os teores de SC excretados foram tão altos que não foi possível a sua separação do sulfato de dermatana, por eletroforese. Por outro lado, DIAL et al. (1997) identificaram os GAGs urinários de filhotes com menos de 12 semanas, idade compatível à dos felinos avaliados no presente estudo, e verificaram que o SC foi o único GAG excretado.

Conforme evidenciado pela literatura, o fato do SC ser o GAG urinário mais abundante e, uma vez que BUFFINGTON et al. (1996) utilizaram o SCC como representativo dos GAGs urinários sulfatados para avaliação de felinos, tomou-se o SCC como padrão para as análises pertinentes a esta pesquisa.

A maior parte dos estudos acerca de GAGs urinários refere-se a humanos. LEE et al. (2003) avaliaram humanos normais com 7 a 60 anos de idade e observaram que, independentemente do sexo, as concentrações urinárias de GAGs parecem ser baixas na infância e aumentam alcançando pico máximo na adolescência (10 a 19 anos de idade), após a qual há diminuição seguida por valores constantes com o passar da idade. Além disso, com a idade, ocorre redução significativa da proporção de SC em relação aos GAGs totais.

PEREIRA et al. (2004) caracterizaram os GAGs urinários de felinos filhotes e adultos atendidos pelo HOVET-USP. Os autores observaram, nos filhotes de 2.5 a 10 meses de vida, queda de GAGs urinários com a idade, dada principalmente por diminuição do SC. Em adultos de 1 a 17 anos, somente o SC decresceu com o avanço da idade e as concentrações de sulfatos de dermatana e de queratana permaneceram constantes.

Na presente pesquisa, na qual foram avaliados 12 filhotes sadios, dos 30 aos 114 dias de vida, não se observaram diferenças nas concentrações urinárias de GAG em função do sexo. Tal achado corrobora o descrito por DIAL et al. (1997) e PEREIRA et al. (2004) para filhotes e por BUFFINGTON et al. (1996) em relação a felinos adultos.

Não foram encontrados relatos sobre excreção urinária de gatos tão jovens quanto os do presente estudo. A análise dos dados deve ser criteriosa, principalmente nos primeiros 60 dias de idade. Os rins dos filhotes de gatos podem concentrar urina em graus variados e a maturação renal ocorre com a idade, como concluído por HOSKINS et al. (1991). Segundo os autores, na idade de 7 a 12 semanas, os filhotes passam a apresentar urina tão concentrada quanto a produzida por animais com 6 meses de idade. Neste estudo, houve diferença significativa quando considerado o fator idade dos animais. As médias maiores para excreção de GAG urinário ocorreram aos 30 e aos 58 dias, seguindo-se diminuições consecutivas até a idade de 114 dias, quando foram finalizadas as coletas. A concentração de GAG expressa em mg/dL, aos 30 dias, aparenta ser baixa devido à diluição da urina. Esta observação pode ser corretamente interpretada pela análise da U-GAG/C, já que creatinina elimina o fator concentração urinária e, dessa forma, permite visualizar que a excreção urinária de GAG é igualmente alta para as idades de 30 e 58 dias.

Os dados do presente estudo encerram a vantagem de terem sido obtidos, ao longo do tempo, nos mesmos animais. Outras publicações (DIAL et al., 1997 e PEREIRA et al., 2004) trazem dados referentes a várias idades, mas empregam grupos distintos de gatos.

Os estudos para quantificação de GAG na urina têm evidenciado que os valores obtidos para jovens são maiores do que os para adultos. Isto já foi descrito para seres humanos (MICHELACCI et al., 1989), para eqüinos (VIEIRA et al., 2005), e para felinos (DIAL et al., 1997; PEREIRA et al., 2004). Estes achados, concordantes entre si, foram obtidos por métodos distintos. No presente estudo, foi verificado que os filhotes iniciam a diminuição da excreção urinária de GAG, em algum momento, a partir de 8 semanas de idade, chegando à décima terceira semana com valores cerca de 50% menores. Ao ser considerado o intervalo de valores das médias obtidas na presente pesquisa, verifica-se que as médias de U-GAG/C variaram de 0,5 a 1,09. A magnitude destes valores parece bastante distinta das de outros publicados. DIAL et al. (1997), por meio de eletroforese, obtiveram excreção de GAGs de 14,9 a 98,3µg/mg de creatinina para felinos filhotes e 2,6 a 26,9µg/mg de creatinina para adultos. BUFFINGTON et al. (1996), ao quantificarem GAGs urinários de felinos adultos por meio de método

colorimétrico com DMB em tampão formato sódico, obtiveram média de U-GAG/C de  $0,094 \pm 0,052$ . Tais divergências podem estar relacionadas às diferenças de especificidade dos métodos empregados.

## **Conclusões**

1. Não há influência do sexo sobre a excreção urinária de GAGs sulfatados de filhotes felinos;
2. a excreção urinária de GAGs em felinos é maior no período de 30 a 58 dias de idade quando comparada aos valores obtidos aos 86 e 114 dias de vida;
3. a mensuração das quantidades de GAG feita em amostras pontuais de urina está sujeita às variações de concentração e, portanto, os resultados devem ser expressos em função da creatinina; e
4. os resultados das mensurações de GAG em amostras de urina de felinos, obtidos por meio de métodos diferentes, mesmo que sejam todos colorimétricos, não são comparáveis entre si.

## Referências

AKÇAY, T., KONUKOGLU, D., DINÇER, Y. Urinary glycosaminoglycan excretion in urolithiasis. **Archives of Disease in Childhood**, London, v. 80, p. 271-272, 1999.

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. D. In: **Biologia Molecular da célula**, 3ª ed., Artes Médicas, Porto Alegre, 1997, p. 972-978.

ATAHAN, O., DAYIGIL, O., HIZEL, N., YAVUZ, O., METIN, A. Urinary glycosaminoglycan excretion in bladder carcinoma. **Scandinavian Journal of Urology and Nephrology**, Stockholm, v. 30, n. 3, p. 173-177, 1996.

BUFFINGTON, C. A. T., BLAISDELL, J. L., BINNS, S. P., WOODWORTH, B. E. Decreased urine glycosaminoglycan excretion in cats with interstitial cystitis. **The Journal of Urology**, Baltimore, v. 155, p. 1801-1804, 1996.

CENGİZ, N., BASKIN, E., ANARAT, R., AGRAS, P. I., YILDIRIM, S. V., TIKER, F., ANARAT, A., SAATCI, U. Glycosaminoglycans in childhood urinary tract infections. **Pediatric Nephrology**, Berlin, v. 20, p. 937-939, 2005.

DE MURO, P., FAEDDA, R., SATTA, A., DONATELLA, F., MASALA, A., CIGNI, A., SANNA, G. M., CHERCHI, G. M. Urinary glycosaminoglycan composition in chronic glomerulonephritis. **Journal of Nephrology**, Roma, v. 18, n. 2, p. 154-160, 2005.

DIAL, S. M., BYRNE, T., HASKINS, M., GASPER, P. W., ROSE, B., WENGER, D. A., THRALL, M. A. Urine glycosaminoglycan concentrations in mucopolysaccharidosis VI-affected cats following bone marrow transplantation or leukocyte infusion. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 263, p. 1-14, 1997.

ERICKSON, D. R., ORDILLE, S., MARTIN, A., BHAVANANDAN, V. P. Urinary chondroitin sulfates, heparan sulfate and total sulfated glycosaminoglycans in interstitial cystitis. **The Journal of Urology**, Baltimore, v. 157, p. 61-64, 1997.

ERTURK, E., KIERNAN, M. SCHOEN, S. R. Clinical Association with urinary glycosaminoglycans and urolithiasis. **Urology**, New York, v. 59, n. 4, p. 495-499, 2002.

FERRARA, P., RIGANTE, D., LAMBERT-GARDINI, S., SALVAGGIO, E., RICCI, R., CHIOZZA, M. L., ANTUZZI, D. Urinary excretion of glycosaminoglycans in patients with isolated nocturnal enuresis or combined with diurnal incontinence. **British Journal of Urology International**, Oxford, v. 86, p. 824-825, 2000.

FINCO, D. R. Urinary Protein Loss. In: OSBORNE, C. A., FINCO, D. R. **Canine and Feline Nephrology and Urology**, Williams & Wilkins, Baltimore, 1995, p. 211-215.

GRANT, D. C., FORRESTER, D., PANCIERA, D. L., MELDRUM, J. B. Measurement of urinary glycosaminoglycans in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.67, n. 1, p. 51-55, 2006.

HENNESSEY, P. T., HURST, R. E., HEMSTREET, G. P., CUTTER, G. Urinary glycosaminoglycan excretion as a biochemical marker in patients with bladder carcinoma. **Cancer Research**, Baltimore, v. 41, p. 3868-3873, 1981.

HOSKINS, J. D., TURNWALD, G. H., KEARNEY, M. T. Quantitative urinalysis in kittens from four to thirty weeks after birth. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 52, n. 8, 1991.

HURST, R. E., RHODES, S. W., ADAMSON, P. B., PARSONS, C. L., ROY, J. B. Functional and structural characteristics of the glycosaminoglycans of the bladder luminal surface. **The Journal of Urology**, Baltimore, v. 138, p. 433, 1987.

HURST, R. E., PARSONS, C. L., ROY, J. B., YOUNG, J. L. Urinary glycosaminoglycan excretion as a laboratory marker in the diagnosis of interstitial cystitis. **The Journal of Urology**, Baltimore, v. 149, p. 31-35, 1993.

HURST, R. E., ROY, J.B., MIN, K. W., VELTRI, R. W., MARLEY, G., PATTON, K., SHACKELFORD, D. L., PARSONS, C. L. A deficit of chondroitin sulfate proteoglycans on the bladder uroepithelium in interstitial cystitis. **Urology**, New York, v. 48, n. 5, p. 817-821, 1996.

LEE, E. Y., KIM, S. H., WHANG, S. K., KWANG, K. Y., YANG, J. O., HONG, S. Y. Isolation, identification and quantitation of urinary glycosaminoglycans. **American Journal of Nephrology**, Basel, v. 23, n. 3, p. 152-157, 2003.

MICHELACCI, Y. M., GLASHAN, R. Q., SCHOR, N. Urinary excretion of glycosaminoglycans in normal and stone forming subjects. **Kidney International**, New York, v. 36, p. 1022-1028, 1989.

PARSONS, C. L., BOYCHUK, D., JONES, S., HURST, R., CALLAHAN, H. Bladder surface glycosaminoglycans: an epithelial permeability barrier. **The Journal of Urology**, Baltimore, v. 143, p. 139-142, 1990.

PASSEROTTI, C. C., BONFIM, A., MARTINS, J. R. M., DALL'OGGIO, M. F., SAMPAIO, L. O., MENDES, A., ORTIZ, V., SROUGI, M., DIETRICH, C. P., NADER, H. B. Urinary hyaluronan as a marker of the presence of residual transitional cell carcinoma of the urinary bladder. **European Urology**, Basel, v. 49, p. 71-75, 2006.

PEREIRA, D. A., AGUIAR, J. A., HAGIWARA, M. K., MICHELACCI, Y. M. Changes in cat urinary glycosaminoglycans with age and in feline urologic syndrome. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1672, n. 1, p. 1-11, 2004.

SARICA, K., TURKOLMEZ, K., SOYGUR, T., OZER, G., YAMAN, M. O., BALTACI, S., BEDUK, Y., MUFTUOGLY, Y. Z. Evaluation of urinary glycosaminoglycan in patients with renal cell carcinoma. **European Urology**, Basel, v. 31, n. 1, p. 54-57, 1997.

TENCER, J., TORFFVIT, O., GRUBB, A., BJÖRNSSON, S., THYSELL, H., RIPPE, B. Decreases excretion of urine glycosaminoglycans as marker in renal amyloidosis. **Nephrology Dialysis Transplantation**. New York, v. 12, p. 1161-1166, 1997.

TSUJIHATA, M., MIYAKE, O., YOSHIMURA, K., KAKIMOTO, K., TAKAHAR, S., OKUYAMA, A. comparison of fibronectin content in urinary macromolecules between normal subjects and recurrent stone formers. **European Urology**, Basel, v. 40, n. 4, p. 458-462, 2001.

TSUJIHATA, M., TSUJIKAWA, K., TEL, N., YOSHIMURA, K., OKUYAMA, A. Urinary macromolecules and renal tubular cell protection from oxalate injury: comparison of normal subjects and recurrent stone formers. **International Journal of Urology**, Tokyo, v. 13, n. 3, p. 197-201, 2006.

VIEIRA, F. A. C., BACCARIN, R. Y. A., AGUIAR, J. A. K., MICHELACCI, Y. M. Urinary excretion of glycosaminoglycans in horses: changes with age, training, and osteoarthritis. **Journal of Equine Veterinary Medicine**, v. 25, n. 9, p. 387-400, 2005.