

Ácido hialurônico

O ácido hialurônico é o maior mucopolissacarídeo componente da matriz extracelular e está presente na maioria dos tecidos e fluidos corporais, sendo particularmente abundante em tecido conectivo frouxo. É sintetizado na membrana citoplasmática de fibroblastos e de outras células, visto que uma pequena parte é metabolizada neste local. Através dos vasos linfáticos chega à corrente sanguínea e é rapidamente eliminado pelo fígado ao nível do sinusóide hepático (Lee & Spicer, 2000). No fígado, é eliminado da circulação através da ligação com as moléculas de adesão CD44 das células endoteliais sinusoidais, sendo posteriormente transportado para dentro dos hepatócitos.

Em adultos saudáveis a meia vida do AH no plasma é em torno de 2,5-5,5 minutos (Trivedi et al, 1993). Níveis elevados do HA são encontrados em várias doenças, tais como na artrite reumatóide, cirrose hepática ou rejeição de transplante de fígado, disfunção, uremia ou durante a septicemia. (Engstrom-Laurent A, 1989; Adams DH et al, 1989; Schutz E, et al, 1996; Ramadori G, et al, 1991).

Em pacientes com doença hepática crônica, a elevação dos níveis de AH ocorre devido ao comprometimento da função da célula endotelial hepática e ao aumento da sua liberação na circulação como resultado da fibrogênese hepática (Tamaki et al, 1996; Trivedi et al, 1993; Kobayashi et al, 1999; Wyatt et al, 2002). Outra situação que pode elevar o nível sérico do AH é o aumento de sua produção, como acontece na doença inflamatória crônica (Engstrom-Laurent, 1997). Além desta situação, Fraser & Gibson (2005) avaliaram a influência da dieta na variação do nível sérico de AH e concluíram que a dieta pode elevar o nível sérico devido à vasodilatação e ao aumento do fluxo linfático intestinal. Essa elevação pode alcançar valores sugestivos de fibrose hepática mesmo em pacientes saudáveis, sugerindo desta forma, que a coleta deve ser realizada em jejum.

A dosagem sérica do AH tem sido amplamente estudada em adultos como marcador não invasivo de fibrose hepática progressiva em várias enfermidades, tais como: hepatite

viral crônica (Mchutchuson et al, 2000; Zeng et al, 2005; Montazeri et al, 2005; Halfon et al, 2005), doença hepática causada pelo álcool (Stickel et al, 2003; Phillips et al, 2003), esteatose hepática não alcoólica (Susuki et al, 2005) e cirrose biliar primária (Nyberg et al, 1992). Em pediatria, o AH tem sido estudado na avaliação da hepatopatia secundária e atresia de vias biliares (Trivedi et al, 1995; Kobayashi et al, 1999; Hasegawa et al, 2000; Dhawan et al, 2001; Chongsrisawat et al, 2004) e na hepatite viral crônica (Lebensztejn et al, 2006; Kobayashi et al, 2006; Chen et al, 2004).

Estudos recentes demonstraram que a dosagem sérica do AH pode apresentar boa correlação com a extensão da fibrose, além de ser um método pouco invasivo, de fácil execução e relativamente de baixo custo. A maioria dos estudos é realizada em pacientes adultos portadores de hepatopatia crônica por vírus C, hepatopatia crônica por álcool e esteatose hepática não alcoólica. Em pediatria, os estudos que avaliam o ácido hialurônico como marcador de doença hepática geralmente envolvem casos de atresia de vias biliares e hepatite viral crônica. Em relação à fibrose crônica há apenas dois estudos, os de Wyatt et al, (2002) e Pereira et al, (2004) discordantes sobre a relação entre hepatopatia causada pela fibrose crônica e o nível sérico de AH.

Metodologias para a dosagem de AH

Pacientes com fibrose cística:

Concomitante à coleta dos exames de rotina, uma amostra de 3mL de sangue é coletada e estocada na forma de soro a -20°C para posterior avaliação do AH. A dosagem do AH é realizada através da técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immunoassay*), sendo utilizado o kit comercial *Hyaluronic Acid Test Kit* (Corgenix Medical Corporation) conforme protocolo do fabricante, que considera como níveis normais para adultos valores de 0-75 ng/mL. Resumidamente, 20 microlitros de soro são incubados em microplaca revestida com anticorpos para o ácido hialurônico e após lavagem, a reação colorimétrica com peroxidase é lida em espectrofotômetro (450 nm), sendo os resultados expressos em ng/mL.

Câncer de bexiga:

HA-Test

O ensaio funciona em um princípio de ligação competitiva no qual 96 poços de leitura de microplaca revestidos com ácido hialurônico de cordão umbilical humano (25 microgramas/mL) são incubados em diferentes volumes de urina (0; 0,5; 1 e 2 microlitros) e com cartilagem nasal bovina biotinalada HABP (HA-binding protein -1 micrograma/mL).

Durante a incubação (16h em 23°C ou 4h em 37°C), o AH na urina compete com o AH presente em cada poço para se ligar ao HABP . Após a incubação, o HABP que não foi ligado ao HA é eliminado através de lavagem e os poços são novamente incubados com a solução Vectastain ABC e com o substrato ABTS (sistema de detecção avidina-biotina).

Para cada amostra, a concentração média do AH (ng/ml) é determinada a partir da análise de 3 alíquotas separadas da amostra de urina (por ex: 0.5, 1, 2.5 microlitros) e de um gráfico padrão (O.D 405 nm x concentração do AH no cordão umbilical – ng/ml). A concentração do AH é normalizada com o valor da quantidade de proteína urinária total (mg/mL), sendo expressada como ng HA/mg. A concentração de proteínas na urina é determinada utilizando o reagente BCA. O passo da normalização é importante porque a concentração de qualquer molécula presente na urina é influenciada pelo estado de hidratação do indivíduo.

Para a maioria dos pacientes com câncer de bexiga, este teste revela níveis de HA urinário de 500 ng/mg ou acima desse valor. Por essa razão, o valor para o limite de cutoff na detecção de câncer de bexiga é 500 ng/mg. Pelo motivo do teste ser igualmente sensível na detecção de baixo ou alto grau de tumores de bexiga, ele não é um preditor para estabelecer o grau do tumor. Uma vantagem do teste é que ele é um método não

invasivo para detectar tumores de bexiga com baixo grau, sendo que poucos testes não invasivos são capazes de detectar esses tipos de tumores com alta sensibilidade.

-Teste positivo: concentração do HA maior ou igual a 500 ng/mg (cutoff)

-Sensibilidade: 83,1%

-Especificidade: 90,1%

-Acurácia na detecção de câncer de bexiga: 86,5%

Hyaluronidase Test – HAase test

O teste avalia a atividade da proteína HAase presente na urina ao invés de quantificá-la. Os poços de leitura de microplaca revestidos com ácido hialurônico (200 microgramas/mL) são incubados com a urina dos pacientes em um tampão HAase. Durante a incubação, realizada na temperatura de 37°C, a enzima HAase presente na urina degrada o HA que foi previamente colocado em cada poço. Após este processo, o HA degradado é eliminado dos poços através da lavagem da microplaca. A quantidade do HA que permanece nos poços é determinada utilizando o HABP biotinalado (biotinylated HA-binding protein) e o sistema de detecção avidina-biotina .

Para cada amostra, a concentração média de HAase (mU/mL) é determinada a partir da análise de 3 alíquotas separadas da amostra de urina e de um gráfico padrão (O.D 405 nm x Haase de *Streptomyces hyaluronoticus*). A concentração de HAase é normalizada com o valor da quantidade de proteína urinária total (mg/mL), sendo expressada em mU HAase/mg. O teste detecta preferencialmente tumor de bexiga com alto grau.

-Teste positivo: concentração da HAase maior ou igual a 10 mU/mg (cutoff)

-Sensibilidade: 81,5%

-Especificidade: 83,8%

-Acurácia na detecção de câncer de bexiga (G2 e G3): 82,9%

HA-HAase test

O teste combinado HA-HAase detecta os níveis do HA urinário (ng/mL) e da enzima HAase (mU/mL), sendo considerado positivo quando um ou ambos os testes combinados forem positivos. Através deste teste, é possível detectar o câncer de bexiga e avaliar o seu grau. Por ser um método não invasivo com alta sensibilidade, possui uma grande importância para a detecção da doença em populações de alto risco (por exemplo, os tabagistas e as pessoas que são expostas a carcinógenos químicos) e também para monitorar a recorrência do tumor de bexiga.

O teste é mais sensível em detectar o câncer de bexiga em relação aos testes individuais porque a sua sensibilidade depende do balanço crítico entre os níveis do HA urinário e da enzima HAase.

-Sensibilidade: 91,2%

-Especificidade: 84,4%

-Acurácia na detecção de câncer de bexiga: 88,3%

Comparação entre a concentração de ácido hialurônico no humor aquoso de pacientes com glaucoma primário de ângulo aberto e indivíduos não portadores de glaucoma

Objetivo: Comparar a concentração de ácido hialurônico no humor aquoso entre pacientes com glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA) e indivíduos não portadores de glaucoma. Material e Método: Amostras de humor aquoso (100 microlitros) foram obtidas imediatamente antes da cirurgia de 22 pacientes portadores de catarata e de 22 pacientes com GPAA avançado e não controlado clinicamente. As amostras foram colhidas por punção da câmara anterior utilizando-se agulha 26 G, e imediatamente congeladas a -20°C e estocadas até o momento da análise. A dosagem de AH foi realizada por meio de um ensaio fluorométrico recentemente desenvolvido na Disciplina

de Biologia Molecular da UNIFESP, cuja sensibilidade analítica é menor que 0,2 microgramas/L. Conclusão: A concentração de AH no humor aquoso de pacientes com GPAA está diminuída em relação aos pacientes não portadores de glaucoma.

Hyaluronic acid levels can predict severe fibrosis and platelet counts can predict cirrhosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease.

BACKGROUND AND AIM: Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) represents a spectrum of liver disease from simple steatosis to cirrhosis. Therefore, markers for predicting NAFLD with advanced fibrosis are needed. The aim of this study was to establish non-invasive predictive markers of liver fibrosis in NAFLD. METHODS: One hundred and forty-eight patients were diagnosed as having biopsy-proven NAFLD. In order to separately identify severe fibrosis (bridging fibrosis plus cirrhosis) and cirrhosis, the patients were analyzed twice: first, as mild fibrosis versus severe fibrosis; and second, as non-cirrhosis versus cirrhosis. Univariate and multivariate analyses were conducted. The diagnostic ability to detect severe fibrosis and cirrhosis was assessed by the area under the receiver operating characteristic curve. The cut-off values of serum markers to detect severe fibrosis and cirrhosis were determined. RESULTS: Hyaluronic acid was selected as a predictive marker for severe fibrosis. A cut-off value of 42 ng/mL of hyaluronic acid had a 100% predictive value for patients free of severe fibrosis and was associated with an optimal combination of sensitivity (100%, 95% confidence interval [CI] 90-100%) and specificity (89%, 95%CI 80-94%). The platelet count was found to be an independent predictor of cirrhosis. A cut-off value of 16×10^4 /microL for the platelet count was associated with an optimal combination of sensitivity (100%, 95%CI 82-100%) and specificity (95%, 95%CI 90-98%). CONCLUSIONS: Hyaluronic acid levels can accurately identify NAFLD patients with severe fibrosis, and the platelet count can identify NAFLD patients with cirrhosis. Thus, these markers offer a good guideline for the assessment of hepatic fibrosis in the many patients with NAFLD.

Hyaluronan in human cerebrospinal fluid.

We studied the concentration of hyaluronan in cerebrospinal fluid (CSF) in various diseases and attempted to define its reference interval. A radioassay utilizing cartilage proteins with affinity for hyaluronan (sandwich-binding protein assay) was used in determining the concentration of 200 lumbar and 27 ventricular CSF specimens and 11 brain cyst fluids. Molecular weight distributions were determined by gel chromatography and localization in brain tissue by histochemistry. The hyaluronan level of lumbar CSF showed an increase with age; comparatively healthy children had (mean +/- SD) 50 +/- 41 micrograms/L (n = 40) and adults 166 +/- 77 micrograms/L (n = 9); i.e. significantly different values. The highest level was recorded in a patient with meningitis (> 8000 micrograms/L). More than 4000 micrograms/L was noted in a patient with tumour metastasis in the cerebellum. Significantly elevated levels were especially found with spinal stenosis, head injury and cerebral infarction, but also in inflammatory medical disorders, hydrocephalus and encephalitis. We found no significant increase in multiple sclerosis and some other neurological diseases. Ventricular CSF of adults contained significantly less hyaluronan (53 +/- 73 micrograms/L; n = 16) than lumbar CSF. Hyaluronan in cyst fluids varied from 31 to 25,000 micrograms/L. Weight average molecular weight of hyaluronan in CSF was $2.9-3.0 \times 10^5$ and in brain tumour cyst fluid 2.4×10^6 . In search for the origin of hyaluronan in CSF it was found that its concentration in the choroid plexus and leptomeninges was low, but that hyaluronan was accumulated in the superficial layer of the cerebral cortex. Continued screening for hyaluronan in CSF may be valuable in cases of inflammatory diseases, tumours and obstruction to CSF flow.

Increased serum levels of hyaluronic acid in pregnancies complicated by preeclampsia or hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome.

OBJECTIVE: Fifteen percent of patients who later have hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome develop initially have nonspecific symptoms. Early diagnosis could ensure adequate obstetric management; however, prognostic biochemical tests are lacking. We hypothesized that elevated hyaluronic acid serum levels might be an early indicator of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome because it is known to be a sensitive marker of liver cell function. STUDY DESIGN: Hyaluronic acid in serum was measured in patients with normal pregnancies (n = 109) and in those patients with pregnancies complicated by preeclampsia (n = 14) or hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome (n = 11). RESULTS: A significant increase in hyaluronic acid serum concentrations was observed in patients with hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome or with preeclampsia ($p < 0.05$). The extent of hyaluronic acid serum levels in hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome correlated with the clinical severity of the individual course of disease as measured by intensive care unit time ($r = 0.72$; $p < 0.02$). CONCLUSIONS: Serum levels of hyaluronic acid in preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome are significantly elevated and might play an important diagnostic and prognostic role in patients with hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome.

Salivary and serum hyaluronic acid concentrations in patients with Sjögren's syndrome.

HYALURONIC ACID ASSAY (radiometric assay): Saliva and blood samples were collected from patients at the same visit between 8 am and 10 am. After centrifugation they were immediately frozen and stored at -20°C until processed. Whole unstimulated

saliva was collected by spitting for 10 minutes into a test tube and its volume was recorded as previously described. The assay was carried out blindly with respect to diagnosis. HA concentrations of blood and saliva were determined using a radiometric assay (Kabi Pharmacia, Uppsala, Sweden). The test is based on the use of specific hyaluronic acid binding proteins (HABP) isolated from bovine cartilage. The intra and interassay coefficients of variation are 5.2% and 6.4%, respectively and the lower limit of detection is 10 µg/l. Increased salivary HA concentrations can serve as a marker of local inflammation and may be of value in the diagnosis of SS.

Serum levels of YKL-40 and hyaluronic acid as noninvasive markers of liver fibrosis in haemodialysis patients with chronic hepatitis C virus infection.

SERUM FIBROSIS MARKERS: Markers of fibrosis were assessed in serum collected within six months from the date of the liver biopsy. HA and YKL-40 levels were measured in serum samples, stored at -20°C, using commercially available assays. HA concentration (ng/mL) was determined using the enzyme-linked binding protein assay kits (Corgenix Inc., Denver, CO, USA).

Valor preditivo de marcadores séricos de fibrose hepática em pacientes portadores de hepatite crônica viral C.

Os níveis séricos do AH foram determinados pelo método ELISA-like, com base na afinidade do AH por proteínas específicas da cartilagem bovina desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), utilizando kits não comercializados. O valor de referência em estudo prévio avaliando 545 indivíduos normais variou de 1,1 a 97,1 ng/l. Em 40 pacientes portadores de cirrose hepática a variação foi de 96,5 a 4.580 ng/l. A sensibilidade do método é bastante elevada, sendo capaz de detectar dosagens de AH de até 0,24 ng/l.

Diagnostic significance of increased serum hyaluronic acid in juvenile rheumatoid arthritis.

MEASUREMENT OF HA: Serum levels of HA were measured in duplicate by a sandwich method using HA binding protein (HABP). Hyaluronic acid binding protein is the HA binding region of the cartilage proteoglycan, aggrecan. In short, a volume of 50 microlitros of a 0,1 mol/L NAHCO₃ solution of purified HABP (20 microgramas/mL) was coated on a microwell plate and stored overnight at 4°C. After the wells were washed and blocked, 50 microlitros of each serum sample was diluted twofold, added to the plate, and stored at room temperature for 2 h. After the plate was washed again, and 50 microlitros of horseradish peroxidase-avidin D (diluted 1:3000) with blocking solution was added. After incubation of the plate at room temperature for 45 min 100 microlitros of 0,4 mg/mL of o-phenylenediamine was added. After incubation again for 30 min at room temperature, the reaction was terminated by adding 50 microlitros of 8 mol/L NH₂SO₄. Absorbance was measured at 492 nm and HA concentrations were obtained from the standard curve. With a cut-off value of 100 ng/mL, a diagnostic value of HA in all JRA patients was 48.3% sensitivity and 98.1% specificity. In children presenting with joint symptoms, serum HA measurement is useful for diagnosing systemic and polyarticular JRA.

Practical determination of hyaluronan by a new noncompetitive fluorescence-based assay on serum of normal and cirrhotic patients.

A practical fluorescence-based assay method for determination of hyaluronan (HA) was developed. Plates were coated with hyaluronan-binding proteins (HABP) obtained from bovine cartilage and successively incubated with samples containing standard solutions of hyaluronan or serum from normal and cirrhotic patients, biotin-conjugated HABP, and europium-labeled streptavidin. After release of europium from streptavidin with enhancement solution the final fluorescence is measured in a fluorometer. The method is specific for HA even in the presence of substantial amounts of other glycosaminoglycans (chondroitin, dermatan sulfate, and heparan sulfate, and heparin) or proteins. It is possible

to quantify HA between 0.2 and 500.0 microg/L. Analyses of HA concentration in 545 normal subjects and 40 cirrhotic patients gave average values of 14.5 and 542.0 microg/L, respectively. It was also shown that older subjects (> or =51 years old) have more HA (28.0 microg/L) than younger subjects (12.0 to 14.0 microg/L). This new sandwich technique has shown high precision and sensitivity similar to those of a recently described fluorescence-based assay method, being able to measure HA in amounts as small as 0.2 microg/L. In addition, this noncompetitive assay avoids preincubation, consumes less time (<5 h) than the previous competitive fluorescence-based assay (>72 h), and avoids the use of radioactive materials.