

GLICOSILAÇÃO AVANÇADA NA DIABETES MELLITUS*

Génese das complicações tardias

M^a CRISTINA ESTEVES, ANA M^a GONÇALVES, JORGE L. CALDEIRA

Serviço de Medicina Interna. Hospital Distrital de Santarém. Santarém. Hospital Distrital de Cascais. Cascais.
Serviço de Medicina IV. Hospital de Santa Maria. Lisboa

RESUMO

A hiperglicémia crónica contribui para a lesão de tecidos e órgãos (retina, rim e nervo), através da formação dos produtos finais de glicosilação avançada (AGE).

A acumulação dos AGE nas proteínas intra e extra celulares está implicada na patogenia das complicações da diabetes através da produção de ligações cruzadas entre as proteínas da matriz, da interação com receptores celulares específicos e da modificação de ácidos nucleicos. Estão em curso ensaios clínicos para avaliação da farmacocinética, eficácia terapêutica e toxicidade dos inibidores farmacológicos da formação dos AGE – aminoguanidina e análogos- que permitam definir qual o papel destes fármacos na prevenção e tratamento da retinopatia, nefropatia, neuropatia e aterosclerose diabéticas.

* Trabalho efectuado no âmbito do 2º Ciclo de Estudos Especiais de Diabetologia no Hospital de Santa Maria – Lisboa em 1997

Palavras-chave: glicosilação não enzimática na diabetes , complicações crónicas, doença microvascular, aminoguanidina

SUMMARY

Advanced Glycosylation of Diabetes Mellitus

Chronic hyperglycaemia contributes to tissue and organ damage retina, kidney and nerves by promoting the formation of advanced glycosylation end products (AGE).

The AGE accumulation both in intra and extracellular proteins plays an essential role in the pathogenesis of diabetic complications by production of cross links on extracellular matrix proteins, by interaction with specific cellular receptors and by modification of nucleic acids.

Human studies are being conducted to examine the pharmacokinetics efficacy and toxicity of pharmacologic agents that inhibit the AGE formation – aminoguanidine and aminoguanidine-like – in order to define its role in the prevention and treatment of retinopathy, nephropathy, neuropathy and diabetic atherosclerosis.

Key Words: diabetic nonenzymatic glycosylation, chronic complications, aminoguanidine

INTRODUÇÃO

A causa determinante para o desenvolvimento das complicações na diabetes mellitus é a exposição prolongada à hiperglicémia, verificando-se contudo, que doentes expostos ao mesmo grau e duração de hiperglicémia apresentam diferentes níveis de lesão tecidual¹.

Vários mecanismos foram propostos pelos quais a hiperglicémia causa as alterações metabólicas: aumento da actividade na via do poliol, alteração do estado redox dos piridina nucleótidos, diminuição do mio-inositol, aumento da síntese de novo de diacilglicerol e aumento da actividade da proteinoquinase C. Nos últimos anos tem vindo a valorizar-se também o processo de **glicosilação não enzimática**².

Este processo de glicosilação não enzimática ou glicação desenvolve-se em duas fases: precoce – com formação dos produtos instáveis, reversíveis e sem relação aparente com as complicações metabólicas da diabetes (dado não se acumularem nos tecidos) e a fase de glicosilação avançada com formação de AGE (advanced glycosylated end products – produtos finais da glicosilação avançada), os quais se ligam irreversivelmente às proteínas teciduais. O reconhecimento de receptores celulares para AGE, quer em células circulantes, quer em células teciduais, veio a esclarecer algumas propriedades patogénicas dos AGE, tais como a disfunção endotelial e as alterações mesangiais^{1,3}.

GLICOSILAÇÃO NÃO ENZIMÁTICA

Uma das consequências da elevação da glicémia é a glicosilação não enzimática ou glicação das proteínas plasmáticas e celulares. Esta produz-se por uma reacção entre a glucose e as terminações NH₂ dos resíduos de lisina das proteínas, conduzindo à formação de uma base de Schiff, a qual sendo lábil sofre re-arranjos bioquímicos, originando produtos mais estáveis que são as cetoaminas. Estas constituem produtos de glicosilação precoce e são denominadas de *produtos de Amadori*; com semi vida curta, não se acumulam nos tecidos e não se correlacionam com as complicações microvasculares. No entanto, os produtos de Amadori quando na presença de hiperglicémia prolongada sofrem um conjunto de reacções (fragmentação, oxidação, desidratação, condensação), originando os produtos finais de glicosilação avançada (AGE) ou *produtos de Maillard*. Estes produtos, ao contrário dos iniciais, formam ligações cruzadas com as proteínas transformando-se em compostos irreversíveis^{1,3}.

Se a glicosilação precoce, *per si*, não contribui directamente para a patologia diabética, a acumulação de moléculas glicadas em tecidos vitais, com ligação cruzada irreversível a proteínas da matriz resulta em lesão tecidual.

As proteínas com longa semi vida são as mais susceptíveis à glicosilação, mas esta compromete também proteínas de semi vida curta, lípidos e constituintes dos ácidos nucleicos^{1,3}.

EFEITOS DA GLICOSILAÇÃO AVANÇADA

a) Ligação cruzada às proteínas da matriz extra-celular

A formação dos produtos finais de glicosilação avançada origina alterações qualitativas e quantitativas dos componentes da matriz extra-celular.

- Ao nível da microcirculação diabética- glomérulo, retina,

neuroarteríola- há deposição precoce e contínua de proteínas plasmáticas de vida média curta (LDL, IgG) que na presença de AGE estabelecem ligações cruzadas com os componentes da matriz da membrana basal, tornando-se irremovíveis, e constituindo focos de formação de AGE e de adesão de novas proteínas plasmáticas extravasadas^{2,4,5}.

- A glicosilação avançada altera também as propriedades funcionais de várias moléculas da matriz, entre as quais o colagénio, que por estabelecimento de ligações covalentes intermoleculares sofrem alterações da sua estrutura, tornando-se resistentes à degradação enzimática fisiológica^{6,7}. O aumento da espessura da membrana basal e o estreitamento do lúmen arterial, características da diabetes mellitus, parecem resultar em parte desta acumulação de proteínas na membrana basal e do decréscimo da degradação enzimática dos componentes da matriz.

- A lesão dos tecidos resultante do estreitamento do lúmen arterial é ainda agravada por dois outros mecanismos relacionados com a glicosilação avançada: um é o compromisso da expansão da parede vascular (angiectasia) em resposta à diminuição do lúmen arterial, outro é a formação de radicais livres, catalisados pelos AGE formados sobre a LDL e colagénio da parede vascular^{5,6}.

- A formação e manutenção da membrana basal normal depende de um processo de interacção geométrica entre o colagénio tipo IV, a laminina e o proteoglicano⁴.

Com a formação dos AGE são alteradas as propriedades associativas dos componentes da membrana basal, o que reduz a capacidade das moléculas interagirem para formar complexos poliméricos necessários para a estruturação da membrana basal⁵. Uma das consequências é o aumento do tamanho dos poros da membrana basal, que leva a maior extravasão de proteínas plasmáticas para a parede vascular.

Outra consequência importante é a diminuição dos proteoglicanos na membrana basal (que têm efeito inibitório sobre a proliferação celular) o que resulta num aumento da síntese da membrana basal e sobreprodução da matriz, tão característica da vasculopatia diabética².

Em resumo, a formação dos AGE sobre as proteínas da matriz vai originar a acumulação de proteínas plasmáticas alteradas, a diminuição da degradação enzimática, a formação de radicais livres, a alteração da estrutura membrana basal e a diminuição do conteúdo da mesma em proteoglicanos. Consequentemente, surge o estreitamento do lúmen vascular, o espessamento da membrana basal, maior extravasão de proteínas plasmáticas e

maior proliferação da matriz.

b) Interação dos AGE com os receptores celulares

Na diabetes mellitus a acumulação da matriz vascular resulta, não só, da diminuição da sua degradação enzimática, mas também do aumento significativo da síntese dos seus componentes.

- A ligação dos AGE aos receptores situados nos monócitos, macrófagos e endotélio estimula a produção de citocinas multifuncionais - interleucina 1 (IL-1), factor de crescimento insulina-like (IGF), factor de necrose tumoral (TNF) - que actuando sobre o mesênquima, mesângio e endotélio iniciam na parede vascular uma cascata de eventos de degradação e proliferação, conduzindo à hiperplasia das células endoteliais da retina, do mesângio glomerular e do músculo liso da parede arterial e também um aumento da síntese de colagénio tipo IV no glomérulo renal⁷.

- As células do endotélio formam uma barreira dinâmica que regula a permeabilidade, hemostase e interação da parede dos vasos com as células circulantes. A interação dos AGE com os receptores endoteliais induz alterações trombogénicas na sua superfície - a diminuição da actividade da trombomodulina, aumento do factor tissular activado, aumento da síntese do péptido endotelial¹, favorecendo a consequente trombose e vasoconstrição⁸. Verifica-se também, o aumento da permeabilidade vascular causada pelas alterações dos filamentos de actina do endotélio. A actividade proliferativa na parede vascular, em resposta à interação dos AGE com os seus receptores poderá ser modulada por factores genéticos que determinarão a grande variação da susceptibilidade individual da célula à lesão mediada pela hiperglicémia.

Fundamentalmente, a interação dos AGE com os receptores celulares aumenta a produção de citocinas promotoras do crescimento resultando no aumento da síntese da matriz, hiperplasia e hipertrofia dos componentes tecidulares e indução de alterações procoagulantes na superfície do endotélio.

c) Glicosilação dos ácidos nucleicos

Algumas manifestações das complicações vasculares da diabetes mellitus poderão reflectir uma modificação da expressão dos genes causada por lesão do DNA induzida pelos AGE⁸.

A glicosilação não enzimática dos ácidos nucleicos da parede vascular do diabético poderá eventualmente estar na origem da perda dos pericitos dos capilares da retina, e tem sido implicada no aumento da frequência de anomalias congénitas nos filhos de doentes diabéticas.

Os AGE formam-se sobre todas as classes de histonas,

sugerindo que a hiperglicémia pode estabelecer ligações cruzadas de DNA com núcleo proteínicas.

A acumulação dos AGE sobre o DNA poderá ser responsável por alterações do material genético, incluindo aberração cromossómica, quebra de filamentos de DNA, diminuição da reparação, replicação e transcrição do DNA^{6,9}.

d) Glicosilação de lípidos e lipoproteínas

A glicosilação das apoproteínas é observada no decurso da diabetes mellitus e está directamente correlacionada com o equilíbrio glicémico.

Vários trabalhos realizados in vitro têm demonstrado a modificação do metabolismo das lipoproteínas secundária à glicosilação das suas apoproteínas, a qual é evidenciada por: atraso do catabolismo das VLDL e LDL, clearance acelerado das HDL e maior e mais rápida captação das LDL glicosadas pelo macrófago.

A glicosilação das apoproteínas apo B das LDL e apo AI, AII, E e C das HDL e VLDL é responsabilizada pela modificação do metabolismo das lipoproteínas. Assim, o atraso do catabolismo das VLDL é explicado pela menor degradação pela lipoproteína lipase enquanto que o da LDL se explica pela diminuição da captação e degradação das LDL glicosiladas pelas células endoteliais. A captação destas pelos macrófagos conduz à formação de células espumosas ricas em ésteres de colesterol que se acumulam na parede dos vasos. O catabolismo acelerado das HDL ainda não está claramente esclarecido^{1,10}.

Em conclusão: as modificações bioquímicas que afectam a estrutura e função das LDL parecem ser centrais na fisiopatologia da aterosclerose do diabético.

NOVAS INTERVENÇÕES TERAPÊUTICAS

A inibição farmacológica da glicosilação tem, nos últimos anos, vindo a ser proposta pela utilização de vários compostos. Vitaminas anti-oxidantes, D-lisina, AAS, ibuprofeno e diclofenac foram alguns dos fármacos inicialmente estudados.

A aminoguanidina é uma hidrazida nucleofílica proposta em 1986 como específico e potente inibidor da glicosilação avançada. O seu mecanismo de acção consiste em ligar-se à fracção carbonil dos produtos de Amdori, formando triazinas não reactivas, impedindo a ligação cruzada mediada pela glucose^{1,3}.

Vários estudos animais provaram a eficácia deste fármaco na nefropatia - diminuindo a espessura da membrana basal, diminuindo a albuminúria e a expansão mesangial. Ao nível da retina parece diminuir a

proliferação endotelial, reduzir a perda de pericitos e aumentar a perfusão sanguínea. Actua sobre o sistema vascular reduzindo a vasodilatação e a permeabilidade, aumentando a elasticidade vascular e a deformabilidade do GV. Na neuropatia possui também efeito benéfico ao aumentar o fluxo sanguíneo e a velocidade de condução. No homem, a sua utilização diminui a hemoglobina-AGE e os níveis de LDL circulante¹.

A utilização de aminoguanidina e a sua eficácia nas complicações diabéticas está a ser avaliada, parecendo, de facto, ser útil na prevenção da glicosilação avançada.

A D - penicilamina (quelante dos metais pesados) parece também inibir a glicosilação avançada ao inibir a glicação dos produtos de Amadori; no entanto mais estudos são necessários para avaliar os benefícios potenciais da sua utilização.

CONCLUSÃO

A glicosilação não enzimática avançada conduzindo à formação excessiva e acelerada de AGE, observada na diabetes mellitus parece ser o elo bioquímico entre a hiperglicémia crónica e vários processos fisiopatológicos intervenientes no desenvolvimento das complicações crónicas.

Os AGE formam-se e acumulam-se irreversivelmente sobre as moléculas de semi vida mais longa, sendo os factores determinantes da sua formação o nível e a duração da exposição à hiperglicémia. Esta lesão dos tecidos mediada pela hiperglicémia, apresenta uma susceptibilidade individual, ainda não totalmente esclarecida, mas que poderá ser modulada por factores genéticos.

Refira-se ainda, e em conclusão, que a irreversibilidade dos AGE promove a progressão das complicações da diabetes mellitus, a qual progride mesmo com a normalização posterior dos níveis de glicémia.

BIBLIOGRAFIA

1. VLASSARA H, BUCALA R: Advanced glycation and diabetes complications: an update. *Diabetes Annual*/9 Elsevier 1995;12:227-244
2. GIARDINO I, BROWNLEE M: The biochemical basis of microvascular disease. Chapter 42. John Pickup, Gareth Williams. *Textbook of Diabetes*. Oxford, Blackwell Science 1997;42.1-42.16
3. VLASSARA H: Nonenzymatic glycosylation. *Diabetes Annual*/6 Amsterdam, Elsevier Science Publishers 1991;18:371-389
4. BROWNLEE M, CERAMI A, VLASSARA H: Advanced glycosylation end products in tissue and biochemical basis of diabetic complications. *N Eng J Med* 1988;318:1315-1321
5. BROWNLEE M: Advanced products of nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. Chapter 14. Daniel Porte, Robert S. Sherwin. *Ellenberg and Rifkin's Diabetes Mellitus: theory and practice*. Stamford Appleton and Lange 1997;229-245
6. KING GL, OLIVIER FJ, INOBUCHI T, SHIBA T, BANSKOTA K: Abnormalities of the vascular endothelium in diabetes. *Diabetes Annual*/7 Amsterdam, Elsevier Science Publishers 1993;107-126
7. HAMMES HP, BROWNLEE M: Advanced glycation end products and the pathogenesis of diabetic complications. Chapter 90. Derek LeRoith, Simeon I. Taylor, Jerrold M. Olefsky. *Diabetes Mellitus. A fundamental and clinical text*. Philadelphia, Lippincott- Raven Publishers, 1996; 810-815
8. GIARDINO I, BROWNLEE M: Glycosylation inhibition. *Diabetes Forum Series* 1991;3:211-219
9. BROWNLEE M, VLASSARA H, CERAMI A: Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann Intern Med* 1984;101:527-537
10. VERGÈS B: La glication des apoprotéines. *La Lettre du Diabète*. 1992; 3:5-6