

# PRODUTOS FLUORESCENTES NO CRISTALINO DE DIABÉTICOS TIPO II

J. SILVA, J.P. FREITAS, P. FILIPE, E. VENDRELL, F. GUERRA RODRIGO

Serviço de Oftalmologia do Hospital de Santo António dos Capuchos. Clínica Dermatológica Universitária de Lisboa. Lisboa

## RESUMO

Há evidência de participação da glicação de proteínas e de produtos fluorescentes dela resultantes, na fisiopatologia das complicações tardias da Diabetes Mellitus. Este trabalho teve como objectivo estudar a fluorescência das proteínas hidrossolúveis de cristalinolitos de indivíduos diabéticos. Foram obtidas proteínas hidrossolúveis dos cristalinolitos com catarata de 20 indivíduos com diabetes tipo II e de 21 indivíduos não diabéticos com idades equivalentes. Avaliou-se a fluorescência da fracção hidrossolúvel (EX-360 nm; EM-454 nm) como indicador de formação de produtos tardios de glicação. A glicação de proteínas plasmáticas foi quantificada pelos níveis de fructosamina. A média das fluorescências no grupo dos diabéticos foi cerca de 2 vezes superior à dos não diabéticos ( $p < 0,01$ ). A fluorescência nos diabéticos com retinopatia foi superior à dos diabéticos sem retinopatia ( $p < 0,01$ ). Os níveis de fructosamina foram de  $3,1 \pm 1,1$  mM nos diabéticos e de  $1,9 \pm 0,8$  mM nos não diabéticos ( $p < 0,001$ ). Os resultados sugerem a participação de produtos fluorescentes, resultantes da glicação de proteínas, na opacificação do cristalino dos diabéticos.

## SUMMARY

### Fluorescent Products in Lens from Diabetic Patients

A body of evidence suggests that glycation of proteins and the resulting fluorescent products take part in the late complications of diabetes. The purpose of this study was to analyse the fluorescence of lens soluble proteins from diabetic patients. Soluble proteins were obtained from lens with cataract from 20 type II diabetic patients and from 21 non diabetic controls with similar age. The fluorescence of the soluble fraction (EX-360 nm, EM -454 nm) was quantified as a parameter for glycation end products. The glycation of plasma proteins was quantified by fructosamine levels. The fluorescence mean in the group of diabetics was about twice the non diabetic value ( $p < 0.01$ ). The fluorescence in the diabetics with retinopathy was higher than that of diabetic without retinopathy ( $p < 0.01$ ). Fructosamine levels were: diabetics  $3.1 \pm 1.1$  mM, non diabetics  $1.9 \pm 0.8$  mM ( $p < 0.001$ ). The results suggest the involvement of fluorescent products, resulting from glycation of proteins, in lens opacification in diabetic patients.

## INTRODUÇÃO

A glicação de macromoléculas com grupos amina livres, como as proteínas, constitui processo bioquímico natural. Maillard, em 1912<sup>1,2</sup>, observou a formação de pigmentos amarelados quando a glicose era aquecida ou conservada na presença de aminoácidos ou proteínas<sup>3</sup>. A reacção não enzimática da glicose, com um grupo amina livre de uma proteína origina uma base de Schiff a qual através de um

rearranjo denominado de Amadori, forma uma cetoamina relativamente estável. Na progressão da reacção de Maillard formam-se polímeros pigmentados e fluorescentes<sup>4</sup>. Nos últimos anos, tem-se dado importância crescente a esta reacção dada a hipótese de constituir um dos mecanismos envolvidos no processo do envelhecimento e na patogenia das complicações da Diabetes Mellitus<sup>3</sup>.

No envelhecimento do cristalino humano verifica-se: aumento de proteínas insolúveis, coloração amarelada ou

acastanhada e fluorescência<sup>5</sup>. A fluorescência do cristalino poderá ter origem na reacção de Maillard<sup>5</sup>; constatou-se opacificação e formação de agregados de proteínas em cristalininos bovinos incubados durante meses com glicose ou glicose-6-fosfato<sup>2</sup>. Por outro lado, na catarata de diabéticos, a glicação de proteínas do cristalino foi apontada como mecanismo patogénico provável. Estas proteínas têm uma vida muito longa e os produtos de Maillard nelas encontrados poderiam reflectir o somatório de um acumular de glicação<sup>6</sup>. Recentemente foi isolado um produto fluorescente, resultante da glicação e identificado como pentosidina, em cristalininos com catarata senil e em cristalininos com catarata diabética<sup>5</sup>.

Estudámos a fluorescência de proteínas de cristalininos humanos com catarata provenientes de indivíduos diabéticos e não diabéticos. A fluorescência foi avaliada a comprimentos de onda característicos de produtos de Maillard (EX-360 nm; EM-454 nm)<sup>4</sup>. Relacionou-se este parâmetro com presença ou ausência de microangiopatia (retinopatia), com a duração da diabetes e com a glicação de proteínas plasmáticas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 20 doentes com diabetes tipo II e catarata (8 do sexo masculino e 12 do sexo feminino com uma idade média de  $67,5 \pm 10,8$  anos) e 21 doentes não diabéticos com catarata senil (9 do sexo masculino e 12 do sexo feminino com uma idade média de  $72,7 \pm 9,6$  anos).

Nos indivíduos diabéticos a retinopatia foi avaliada por fundoscopia e angiografia. Dos 20 doentes, 10 não tinham retinopatia, 1 tinha retinopatia não proliferativa, 2 tinham retinopatia pré-proliferativa e 6 apresentavam retinopatia proliferativa; em 1 doente não foi possível caracterizar a retinopatia. A duração da diabetes foi  $12,7 \pm 9,6$  anos. Treze doentes estavam medicados com anti-diabéticos orais, 4 com insulina e 3 apenas com dieta.

Os cristalininos obtidos por cirurgia, foram classificados de acordo com a cor do núcleo em 4 graus, desde o amarelo pálido até ao castanho<sup>7</sup>. As colorações amarelo pálido, amarelo, amarelo acastanhado e castanho (inclui o castanho avermelhado e o castanho escuro) correspondem respectivamente aos graus I, II, III e IV. Os cristalininos foram conservados a  $-80$  °C até à sua utilização. Cada cristalino foi pesado e homogeneizado em 10 vezes o volume do peso respectivo de PBS e centrifugado a  $10.000 \times g$  durante 30 minutos a  $4$  °C. Separou-se o sobrenadante, referido como fracção hidrossolúvel, que foi utilizado para os ensaios<sup>8</sup>.

A fluorescência foi detectada com a excitação a 360 nm e a emissão a 454 nm<sup>9</sup>. Foi determinada a densidade óptica a 280 nm. A concentração de proteínas foi medida pelo método de Bradford.

Previamente à cirurgia, foi obtida uma amostra de sangue venoso de cada indivíduo, em jejum, sendo o soro conservado a  $-80$  °C. A frutossamina sérica, parâmetro de glicação de proteínas e de controlo da glicemia, foi determinada por espectrofotometria tendo em conta o facto da glicose, ligada a uma proteína por uma ligação cetoamina, reduzir um corante de tetrazolium em meio alcalino<sup>10</sup>.

A análise estatística foi efectuada pelo método t de Student para dados não emparelhados. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

## RESULTADOS

O peso dos cristalininos foi de  $127,0 \pm 28,0$  mg para os diabéticos e  $134,2 \pm 40,6$  mg para os não diabéticos. O número de cristalininos em cada grau de coloração foi o seguinte: diabético, Grau I-0, grau II-7, Grau III-7, Grau IV-6; não diabéticos, Grau I-2, Grau II-5, Grau III-5, Grau IV-9.

A fluorescência da fracção hidrossolúvel dos cristalininos com catarata é expressa como valor relativo do quociente fluorescência (EX-360 nm, EM-454 nm) / absorvência (280 nm). Foi de  $107 \pm 57$  para os cristalininos de diabéticos e de  $59 \pm 27$  para os cristalininos de não diabéticos ( $p < 0,01$ ) (fig. 1). Nos diabéticos com retinopatia foi de  $136 \pm 55$  e nos diabéticos sem retinopatia  $73 \pm 35$  ( $p < 0,01$ ). A concentração de proteínas na fracção solúvel dos homogeneizados foi de  $0,8 \pm 0,1$  mg/ml tanto nos cristalininos de diabéticos como nos de não diabéticos.

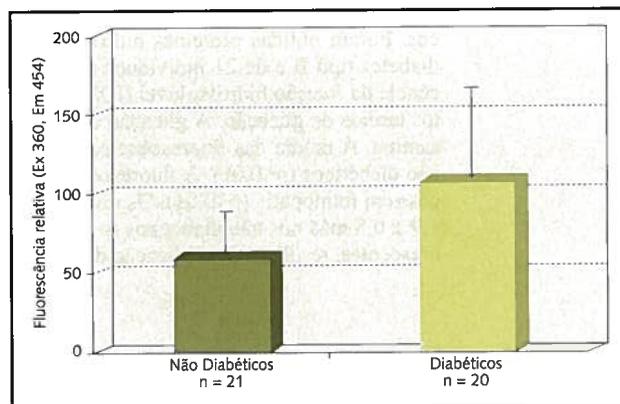


Fig. 1 – Fluorescência de proteínas solúveis do cristalino. Comparação entre diabéticos e não diabéticos ( $p < 0,01$ ).

Os níveis de frutossamina foram de  $3,1 \pm 1,1$  mM nos diabéticos e de  $1,9 \pm 0,8$  mM nos não diabéticos ( $p < 0,001$ ).

Constatou-se no grupo dos diabéticos uma correlação positiva significativa ( $p < 0,01$ ) entre a fluorescência da fracção hidrossolúvel do cristalino e a duração da diabetes (fig. 2). Não se verificou qualquer correlação entre a fluorescência das proteínas do cristalino e os níveis de frutossamina sérica.

## DISCUSSÃO

A patogenia da catarata diabética é multifactorial, no entanto os resultados obtidos sugerem a possibilidade de um papel relevante dos produtos de Maillard na mesma. A sua acumulação leva a modificações estruturais e funcionais das proteínas tecidulares<sup>2</sup>. Nos indivíduos não diabéticos existiria uma acumulação mais lenta como se pode concluir dos valores encontrados. Os resultados obtidos corroboram as teorias que preconizam um papel importan-

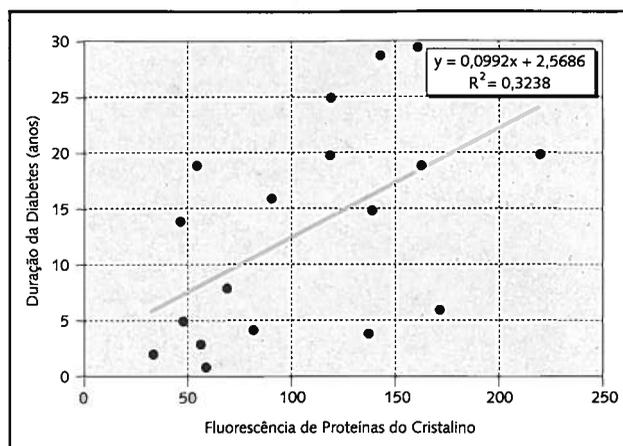


Fig.2 – Correlação entre a fluorescência de proteínas solúveis do cristalino e a duração da diabetes ( $p < 0,01$ ).

te para os produtos de Maillard, tanto no envelhecimento como nas complicações tardias na diabetes<sup>1,2,5,8,11</sup>.

A incubação de proteínas do cristalino com glicose induz alterações estruturais com facilitação da oxidação de grupos tiólicos<sup>1,5</sup>. Na presença de metais de transição, podem gerar-se radicais livres e formas activadas de oxigénio, na sequência de reacções de glicosidação e autooxidação que contribuiriam para a fragmentação e modificação proteicas<sup>1,9</sup>.

A ocorrência de fluorescência nos comprimentos de onda, de excitação e de emissão, utilizados foi previamente descrita em proteínas plasmáticas de diabéticos e em proteínas incubadas, com glicose, *in vitro*, por períodos longos<sup>4</sup>. A fluorescência (EX-360 nm, EM- 454 nm) parece ser uma propriedade de proteínas glicadas, resultante de reactividade química das cetoaminas<sup>4</sup>. As diferenças significativas encontradas entre diabéticos com e sem retinopatia, sugerem que o grau de envolvimento microvascular possa influenciar a acumulação destes produtos fluorescentes<sup>13</sup>.

Constatou-se uma correlação positiva significativa entre a concentração de produtos fluorescentes e a duração da diabetes. Esta correlação sugere que a glicação, avaliada pelos produtos de Maillard nas proteínas do cristalino, desempenha um papel importante na patogénese da catarata. Foi referido, recentemente, que a avaliação *in vivo* da fluorescência natural da córnea e do cristalino poderia ser um indicador clínico importante da evolução da diabetes e do aparecimento das complicações tardias da doença<sup>14</sup>, tendo sido

observadas autofluorescências do cristalino nos indivíduos diabéticos de cerca do dobro das dos não diabéticos<sup>15</sup>.

Em conclusão, os estádios avançados da reacção de Maillard poderão ser um factor importante no envelhecimento, principalmente nos tecidos dependentes da acção da insulina como o cristalino, a membrana basal dos vasos e a pele<sup>8</sup>. A exposição destes tecidos a uma concentração elevada de glicose pode acelerar a formação de produtos fluorescentes e contribuir para a iniciação mais precoce de cataratas e de outras complicações da diabetes.

## BIBLIOGRAFIA

1. AZEVEDO MS, MANSO C: Radicais livres de oxigénio e complicações da diabetes. *Acta Med Port.* 1992; 5:201-207
2. DOMINICZAK MH: The significance of the products of the Maillard (browning) reaction in diabetes. *Diabetic Med.* 1991; 8:505-516
3. SENSI M, PRICCI F, ANDREANI D, DI MARIO U: Advanced non-enzimatic glycation endproducts (AGE): Their relevance to aging and the pathogenesis of late diabetic complications. *Diabetes Res.* 1991; 16:1-9
4. JONES AF, JENNINGS PE, WAKEFIELD A, WINKLES JW, LUNEC J, BARNETT AH: The fluorescence of serum proteins in diabetic patients with and without retinopathy. *Diabetic Med* 1988; 5:547-551
5. NAGARAJ RH, MONNIER VM: Isolation and characterization of a blue fluorophore from human eye lens crystallins: In vitro formation from Maillard reaction with ascorbate and ribose. *Bioch Biophys Acta* 1992; 1116:34-42
6. OIMOMI M, SAKAI M, OHARA T, IGAKI N, MAKAMICHI T, MAEDA Y, HATA F, MASUTA S, BABA S, IGA T, et al: Relationship between diabetic complications and advanced-stage products of Maillard Reactions. *Kobe J Med Sc* 1988; 34:171-177
7. SASAKI K, HIBATA T, OBAYAZAWA H, FUJIWARA T, KOGURE F, OBARA Y, ITOI M, KATOU K, AKIYAMA K, OKUYAMA S: Classification system for cataracts. *Ophthalmic Res* 1990; 22:46-50
8. ARAKI N, UENO N, CHAKRABARTI B, MORINO Y, HORIUCHI S: Immunochemical evidence for the presence of advanced glycation end products in human lens proteins and its positive correlation with aging. *J Biol Chem* 1992; 267:211-214
9. LE GUEN CA, BAIN S, BARNETT AH, LUNEC J: Captopril inhibits the fluorescence development associated with glycation of proteins. *Agents Actions* 1992; 36:264-270
10. JOHNSON RN, METCALF PA, BAKER JR: Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycoylprotein. An index of diabetic control. *Clin Chim Acta.* 1982; 127:87-95
11. FREITAS JP, MARTINS JM, PROENÇA C, NUNES J, MOREIRA C, JORGE JP, RAMALHO PS, SILVA JM: Aspectos hemorreológicos na diabetes mellitus. *Boletim do Hospital Egas Moniz* 1984; 1:21-36
12. KENNEDY L, BAYNER JW: Non-enzimatic glycosylation and the chronic complications of diabetes: an overview. *Diabetologia* 1984; 26:93-98
13. DE ABREU Jr, SILVA R, CUNHA-VAZ JG: Te blood-retinal barrier in diabetes during puberty. *Arch Ophthalmol* 1994; 112: 1334-1338
14. CUNHA-VAZ JG: Ocular fluorometry: standardization and instrumentation development. A concerted action in the european community (EUROEYE). *Int Ophthalmol* 1993; 17: 147-153
15. LEITE EB, CUNHA-VAZ JG: Futuros desenvolvimentos na instrumentação em fluorofotometria ocular. *Acta Med Port* 1992; 5:20-22