

A ACTIVIDADE DA N-ACETIL- β -D-GLUCOSAMINIDASE EM RELAÇÃO COM A GLICÉMIA, A FRUTOSAMINA SÉRICA E A NEFROPATIA NA DIABETES TIPO I

CRISTINA PINTO, FRANCISCA FERNANDES, CARLOS MARQUES, ALDA SILVA MARIA AZEVEDO, PEDRO LISBOA, CARLOS MANSO.

Centro de Metabolismo e Endocrinologia - INIC. Instituto de Química Fisiológica. Faculdade de Medicina. Departamento de Diabetologia do Serviço de Medicina IV. Hospital de Santa Maria. Lisboa. Portugal.

RESUMO

A actividade da N-acetil- β -D-glucosaminidase sérica foi determinada no soro de 45 diabéticos tipo I controlados e de 63 indivíduos normais, não se encontrando diferenças significativas entre estes dois grupos. Não se observaram elevações enzimáticas específicas, evidenciando tanto o isoenzima termolábil A como o enzima termoestável B actividades sobreponíveis às dos controles. A NAG urinária encontrava-se significativamente alterada em doentes com e sem nefropatia, quando comparada com a do grupo controle, sendo a elevação mais significativa em doentes com nefropatia. Encontrou-se uma correlação positiva altamente significativa entre a NAG sérica, a glicémia e a frutossamina, respectivamente.

SUMMARY

N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity in relation with glycemia, serum fructosamine and type I diabetic nephropathy

Serum activity of N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) was determined in 45 patients with diabetes mellitus type I compensated and in a control group of 63 normal persons. NAG activity was not significantly increased when compared to the control group. No significant variations were observed in the activities of isoenzyme heat-labile A and isoenzyme heat-stable B when comparing controls and patients. Urinary NAG was significantly increased in diabetics with and without nephropathy when compared to the control group. The variation was more significant in diabetics with nephropathy. There is a highly positive correlation between serum NAG and both blood glucose and plasma fructosamine.

INTRODUÇÃO

A N-acetil- β -D-glucosaminidase (EC.3.2.1.30) - (NAG) é um enzima lisosómico relacionado com a hidrólise de diversos glicoconjugados, incluindo oligossacáridos, mucopolissacáridos, glicolípidos, glicoproteínas e proteoglicanos.¹ É, pois, uma glucosidase.

O aumento da actividade sérica da NAG na diabetes mellitus,^{2, 3} bem como o de outros enzimas lisosómicos como a beta-glucuronidase tem sido encarado como um mecanismo de defesa contra a acumulação dos compostos já referidos nas membranas basais dos capilares sanguíneos.

Os lisosomas são ricos em enzimas hidrolíticas capazes de degradar uma variedade de compostos.⁵⁻⁷ Aparentemente, eles contêm glucosidases para qualquer tipo de ligação glucosídica das glicoproteínas. Tem sido posta a hipótese⁸⁻¹⁰ de que o aumento sérico da NAG exprimiria uma maior activação dos lisosomas dos tecidos. Este fenómeno ocorreria, provavelmente, em resposta à necessidade metabólica de degradar qualquer um dos compostos acumulados nos tecidos, como mucopolissacáridos e glicoproteínas nos diabéticos com patologia vascular, ou diversos outros constituintes celulares resultantes de um aumento do catabolismo dos tecidos a uma velocidade proporcional ao grau de descompensação metabólica. Esta hipótese é sustentada pela observação de que após activação experimental dos lisosomas existe um aumento da actividade dos enzimas hidrolíticos no soro, conseqüente à sua libertação.¹¹

As alterações de actividade das hidrolases lisosómicas parecem desempenhar um papel na fisiopatologia da microangiopatia diabética. Está descrita uma elevação dos níveis enzimáticos do soro, ao mesmo tempo que se verifica uma redução da sua actividade no rim e retina dos ratos diabéticos.¹²

Pitkanen e col¹³ observaram que em diabéticos insulino-dependentes, a gravidade da retinopatia diabética não acompanhava o grau de elevação da actividade lisosómica demonstrada pelo seu doseamento sérico. Esta observação sugere que a síntese, secreção, e/ou *turnover* no plasma dos enzimas lisosómicos não parece ser afectada pela microangiopatia diabética, não se encontrando ainda clarificada a sua relação com estes dados. Bomback e col¹⁴ observaram uma maior excreção urinária da NAG nos diabéticos.

Tem sido dispendido um grande esforço no estudo da composição química e biossíntese de macromoléculas em animais^{15, 16} como no ser humano,¹⁷⁻²⁰ mas o seu metabolismo continua mal esclarecido.

Estudos sobre glicosil transferases implicadas na síntese da membrana basal dos glomérulos²¹ indicaram que na diabetes induzida no rato pela aloxana, ocorre um aumento da actividade da glicosiltransferase implicada na síntese de unidades dissacarídeas com ligações hidroxilisina, enquanto que a actividade da galactosil transferase participando no conjunto das unidades heteropolissacarídeas não está modificada. A actividade destes enzimas parece reflectir a alteração do estado da membrana basal no diabético, que possui

maior número de dissacarídeos e manutenção de um nível normal de heteropolissacarídeos. O tratamento precoce dos animais diabéticos com insulina restabelece a actividade normal da glicosiltransferase e leva a um retardamento da síntese das membranas basais.

Enquanto que a sequência dos acontecimentos desde a deficiência de insulina até à síntese alterada da membrana basal permanece obscura, existe a possibilidade de que uma substância, cujo nível plasmático fosse controlado pela acção da insulina, como a glucose ou alguns dos seus metabólitos, desempenhe um papel na regulação dos diversos estádios pos-ribossómicos (tais como a hidroxilação e a ligação dos glúcidos), implicados na associação e exportação das subunidades da membrana basal do glomérulo.²² Um outro aspecto é o facto da glucose se ligar às proteínas por um mecanismo não enzimático em que a acção de massa é o factor regulador da glicosilação. Por isso é que os indivíduos diabéticos evidenciam níveis elevados de proteínas glicosiladas,²³ revestindo-se de interesse a eventual relação entre a actividade enzimática no metabolismo das glicoproteínas e os níveis de glicosilação não enzimática.

Sabe-se²⁴ que o doseamento da hemoglobina glicosilada (Hb A_{1c}) é válido para a avaliação retrospectiva do controle metabólico do diabético, embora não constitua um parâmetro útil na monitorização das alterações que ocorrem no desequilíbrio metabólico da diabetes.²⁵

Baker e col^{26, 27} propuseram o doseamento da fructosamina como um método rápido e simples para a medição da concentração sérica das proteínas glicosiladas não enzimaticamente. Sendo a semi-vida média dessas proteínas muito inferior aos 60 dias do eritrócito, este doseamento dar-nos-ia uma informação retrospectiva correspondente a um período mais próximo do momento de avaliação.

QUADRO 1

Indivíduos	N.º total	O	O	Idade média
Normais	63	32	31	40 anos (19-48)
Diabéticos tipo I	45	23	22	23 anos (9-43)
Grupo A (diabéticos c/ 5 anos de evolução)	24	14	12	19 anos (9-38)
Grupo B (diabéticos c/ 5-10 anos)	12	7	5	25 anos (14-41)
Grupo C (diabéticos c/ >10 anos)	9	4	5	28 anos (12-42)
Com retinopatia	4	3	1	31 anos (18-41)
Sem retinopatia	41	20	21	22 anos (9-43)
Com neuropatia	8	4	4	24 anos (17-39)
Sem neuropatia	37	21	16	21 anos (9-43)
Com nefropatia	38	20	13	26 anos (9-43)
Sem nefropatia	7	3	4	24 anos (11-42)

As amostras de sangue foram colhidas por punção venosa cerca de 3 horas após o pequeno almoço, e, depois da coagulação o sangue era centrifugado, congelando-se os soros a -20 °C até à sua utilização.

As amostras de urina foram colhidas entre as 10-12 horas e armazenadas a -20 °C sem preservativo. O doseamento da NAG era executado no prazo mínimo de 5 dias. Numa alíquota destas amostras analisavam-se imediatamente após a colheita a glicosúria, proteinúria e cetonúria pelo método enzimático (Boehringer-Manheim Teste).

A glicémia foi determinada pelo método de glucose oxidase (Kit da Sigma) com modificações.²⁸

A determinação da fructosamina foi feita segundo o método referido por Johnson e col.²⁶

A finalidade deste estudo foi o de verificar o comportamento da actividade da NAG sérica em diabéticos do tipo I, correlacionando-a com os níveis sanguíneos da fructosamina e com a glicémia.

Determinou-se a actividade dos seus principais isoenzimas A e B, a fim de se admitir de uma elevação enzimática específica na diabetes do tipo I.

Recorreu-se ainda à actividade da NAG urinária numa tentativa de melhor compreensão das complicações da diabetes, concretamente a nefropatia.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudaram-se 45 diabéticos do tipo I da Consulta Externa do Departamento de Diabetologia do Serviço de Medicina IV do Hospital de Santa Maria (23 homens e 22 mulheres com idades compreendidas entre os 9 e os 43 anos, idade média - 23 anos). O grupo controle incluiu 63 indivíduos saudáveis, dadores do Posto Avançado do Serviço de Transfusões de Sangue do Hospital de Santa Maria (32 homens e 31 mulheres com idades entre os 19 e os 48 anos, idade média de 40 anos). Os indivíduos utilizados como controles eram saudáveis.

Relativamente ao tempo de evolução foram considerados 3 grupos: 24 indivíduos do grupo A (<5 anos de evolução); 12 indivíduos do grupo B (5 a 10 anos de evolução) e 9 indivíduos do grupo C (>10 anos de evolução).

Também se discriminaram estes diabéticos consoante a presença ou ausência de retinopatia, nefropatia e neuropatia. A presença e o grau de retinopatia foi estabelecida pelo exame oftalmológico; a nefropatia pela persistência da albuminúria e doseamento de creatinina e/ou ureia no soro e a neuropatia pelo exame clínico.

A actividade sérica da NAG foi doseada recorrendo-se ao glicósido 4-metilumbeliferil (4-MU), da Sigma, como substrato fluorogénico.²⁹

A inactivação selectiva do isoenzima Termolábil A foi baseada no método de Oberkotter e col.³⁰ A actividade da NAG urinária foi determinada pelo método de Dance e col,³¹ recorrendo-se ao mesmo substrato fluorogénico. O grupo controle era constituído por 20 indivíduos saudáveis (10 do sexo masculino e 10 do sexo feminino com a idade média de 30 anos). Todos os ensaios foram efectuados em duplicado. As actividades séricas da NAG são expressas em unidades por ml de soro e as urinárias em unidades por mg de creatinina urinária, sendo a creatinina doseada pelo método de Jaffe.³²

A fructosamina é expressa em nmoles por litro.

RESULTADOS E CONCLUSÃO

QUADRO 2 NAG sérica total e actividade do isoenzima A e B (n moles 4-MU/ml/h)

	NAG total			Isoenzima "A"		Isoenzima "B"	
	N.º	\bar{X}	DP	\bar{X}	DP	\bar{X}	DP
Diabéticos	45	605 511	120 451	361 556	73 946	246 178	73 951
Normais	63	586 159	92 289	349 2170	57 682	237 254	56 842
		t = 0,650 p = n.s.		t = 0,960 p = n.s.		t = 0,702 p = n.s.	

\bar{X} - média; DP - Desvio padrão; t - test de Student; p - probabilidade.

Os valores de NAG sérica total, isoenzima A e isoenzima B, ainda que ligeiramente superiores nos diabéticos tipo I não são significativos relativamente ao grupo controlo.

Não se verificaram diferenças entre os sexos, quer nos normais, quer nos diabéticos, tanto para actividade total como específica (Quadro não apresentado).

QUADRO 3 Actividade da NAG sérica total, isoenzima A e isoenzima B (n moles 4-MU/h/ml)

Tempo de evolução	NAG total			Isoenzima "A"		Isoenzima "B"	
	N.º	\bar{X}	DP	\bar{X}	DP	\bar{X}	DP
1. Grupo A (5 anos)	24	609 320	115 994	375 385	78 701	230 68	67 086
2. Grupo B (5-10 anos)	12	589 583	111 132	333 333	66 378	256 417	55 502
3. Grupo C (10 anos)	9	541 556	92 238	332 222	40 552	209 333	53 712
Teste de Student	t.	p.	t.	p.	t.	p.	
1 vs 2	0,481	n. s.	1,563	n. s.	1,128	n. s.	
2 vs 3	1,001	n. s.	0,442	n. s.	1,855	n. s.	
1 vs 3	1,541	n. s.	1,530	n. s.	0,839	n. s.	

Não há diferenças significativas entre os diversos grupos, considerando o tempo de evolução da diabetes. Atribuímos

o facto dos valores não serem significativos para os grupos B e C vs. A pelo número restrito de indivíduos nestes grupos.

QUADRO 4 NAG sérica total e actividade dos isoenzimas A e B (n moles/4-MU/ml/h)

Tempo de evolução	NAG total			Isoenzima "A"		Isoenzima "B"	
	N.º	\bar{X}	DP	\bar{X}	DP	\bar{X}	DP
1. S/ retinopatia	41	563 966	133 523	348 220	78 941	217 508	73 115
2. C/ retinopatia	4	593 667	92 716	351 667	34 308	242 000	77 920
3. Normais	63	586 159	92 289	349 270	57 682	237 254	56 892
Teste de Student	t.	p.	t.	p.	t.	p.	
1 vs 2	0,524	n. s.	0,377	n. s.	0,755	n. s.	
2 vs 3	1,065	n. s.	0,781	n. s.	0,765	n. s.	
1 vs 3	0,788	n. s.	0,564	n. s.	1,518	n. s.	

QUADRO 5 NAG sérica total e actividade dos isoenzimas A e B (n moles 4-MU/ml/h)

Tempo de evolução	NAG total			Isoenzima "A"		Isoenzima "B"	
	N.º	\bar{X}	DP	\bar{X}	DP	\bar{X}	DP
1. S/ nefropatia	38	563 816	150 757	350 510	80 792	222 857	73 597
2. C/ nefropatia	7	582 000	109 753	332 500	80 490	249 500	81 548
3. Normais	63	586 159	92 289	349 270	57 682	237 254	56 892
Teste de Student	t.	p.	t.	p.	t.	p.	
1 vs 2	0,321	n. s.	0,575	n. s.	0,506	n. s.	
2 vs 3	0,716	n. s.	0,687	n. s.	0,918	n. s.	
1 vs 3	0,958	n. s.	0,558	n. s.	1,050	n. s.	

A análise dos Quadros⁴ 4 e 5 demonstra que o grupo de diabéticos tipo I com retinopatia e nefropatia não evidenciam valores de NAG sérica total ou específica mais elevados

que os diabéticos sem complicações vasculares. De notar o reduzido número de indivíduos com complicações vasculares.

QUADRO 6 Actividade da NAG urinária expressa em n moles de 4 MU/mg de creatinina urinária.

	N.º	\bar{x}	DP	Teste de Student		
1. S/ nefropatia	38	67,79	106,491	1 vs 2	t = 1,118	p = n.s.
2. C/ nefropatia	7	125,429	97,600	2 vs 3	t = 4,847	p 0,001
3. Normais	20	14,9	7,42	1 vs 3	t = 2,879	p 0,01

Verifica-se que ambos os grupos, diabéticos com e sem nefropatia, têm uma elevação significativa da NAG urinária comparados com o grupo dos controlos, sendo a elevação mais significativa para o grupo com nefropatia.

No Quadro seguinte estabelecemos correlação entre a actividade da NAG sérica, a glicémia e frutossamina, traçando as respectivas rectas de regressão (Fig. 1 e 2).

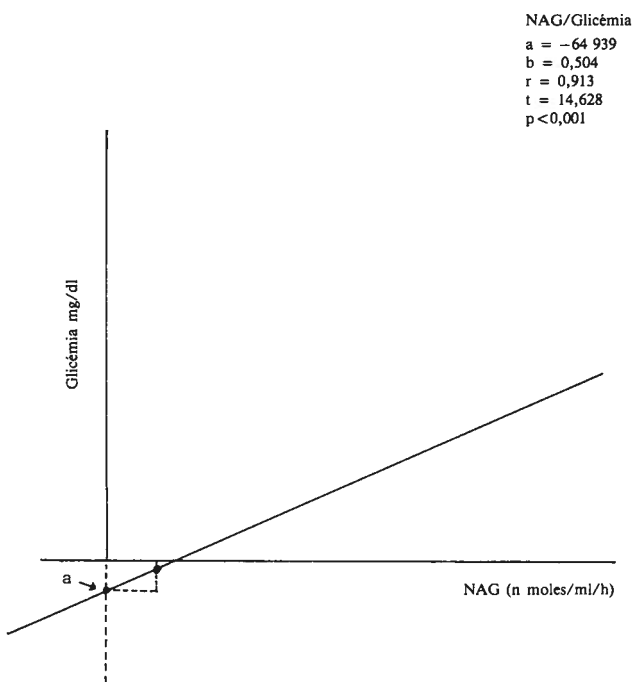


Figura 1: Correlação entre a actividade da NAG sérica e a glicémia.

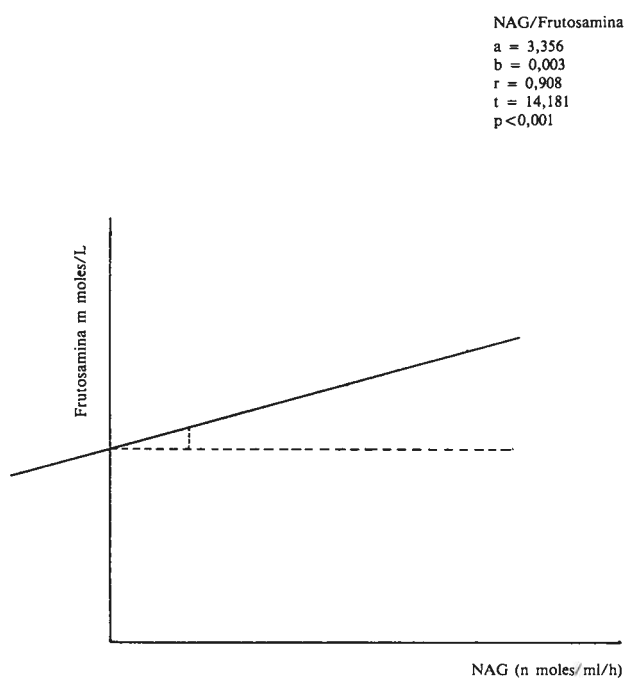


Figura 2: Correlação entre a actividade da NAG sérica e a frutossamina.

DISCUSSÃO

O aumento sérico da NAG na diabetes foi postulado como um mecanismo compensador para a elevada deposição de mucopolissacáridos nos capilares dos diabéticos, tendo sido sugerido por Fushimi e col¹² como um bom indicador do aparecimento da microangiopatia.

QUADRO 7

N.º de Diabéticos = 45	\bar{x}	DP
Glicémia (mg/dl)	275,188	107,546
Frutossamina (n moles/L)	4,932	1,269
NAG (n moles/ml/h)	605,511	120,451

Whiting e col³³ verificaram que os níveis séricos da NAG inicialmente elevados na diabetes idiopática reduzem-se com a insulino-terapia ou restrição dietética.

Estes mesmos Autores observaram que um grupo de diabéticos insulino dependentes estável tinha valores séricos de NAG intermediários entre controlos não diabéticos e diabéticos diagnosticados recentemente.

Bomback e col¹⁴ referiram uma alteração quantitativa dos principais isoenzimas da NAG no soro de diabéticos com um aumento constante da forma B ou isoenzima termo-estável e um aumento variável do isoenzima termo-lábil A.

Estas conclusões não foram perfilhadas por Poon e col que observaram que as proporções relativas do isoenzima B e do isoenzima A eram idênticas nos diabéticos e normais. Estes Autores também não encontraram diferenças significativas entre as actividades séricas dos diabéticos com e sem retinopatia.

O aumento da actividade das hidrolases ácidas em doentes diabéticos pode reflectir uma variedade de alterações patológicas incluindo um *turnover* celular acelerado ou lesão celular inerente à instabilidade lisosómica. Contudo a demonstração de uma alteração selectiva da actividade da NAG descrita pelos referidos autores sugere que a base para estas alterações é mais específica e pode estar relacionada de uma forma directa com as alterações fisiopatológicas observadas na diabetes.

Os níveis de actividade enzimática não significativamente elevados por nós observados, podem constituir o reflexo metabólico do número relativamente pequeno de diabéticos apresentando complicações secundárias.

Em estudos efectuados anteriormente³⁵ encontrámos actividades significativamente elevadas da NAG no soro dos diabéticos quando comparados com as do grupo controle. Isto deve-se, talvez, a um número mais elevado de diabéticos com vasculopatias nesse grupo, (tanto micro como macroangiopatia), o que não sucede no grupo presentemente estudado. Por outro lado, não encontramos correlação entre a actividade sérica da NAG e a glicémia.

Parecia assim confirmar-se que a presença de complicações vasculares constituía um factor de interferência que afecta a actividade deste enzima lisosómico, independentemente da glicémia do instante.

Neste trabalho, tínhamos igualmente, posto a hipótese de que a elevação sérica da NAG poderia resultar de uma redução da estabilidade lisosómica.

Nos diabéticos tipo I esta instabilidade parece corrigida pela insulino-terapia.

A microangiopatia associada à diabetes mellitus é caracterizada por um espessamento da membrana basal, estruturalmente diferente na diabetes.³⁶

Não está estabelecido se o excesso verificado de deposição dos glicosaminoglicanos é somente o resultado da deposição ou uma combinação desta com um desequilíbrio na remoção. Sabe-se que as hidrolases ácidas degradam glicosaminoglicanos e que os níveis destes enzimas no soro, urina e tecido renal estão alterados na diabetes experimental.³⁷

Os principais factores que determinam a permeabilidade da membrana basal do glomérulo parecem ser as dimensões dos poros bem como a carga electrostática fixa.³⁸ Enquanto que os poros podem resultar da condensação das cadeias polipeptídicas do colagénio, estudos recentes sugerem que a carga electrostática é atribuída a um glicosaminoglicano, sulfato de heparano,³⁹ que foi isolado, caracterizado e evidenciado como constituinte integral da membrana basal.^{40, 41}

Braohard e col⁴² descreveram recentemente uma correlação positiva significativa da NAG urinária com microalbuminúria, preconizando o recurso à determinação da actividade urinária deste enzima como um marcador não só para a nefropatia diabética mas também no que diz respeito ao controle metabólico do doente.

Os mesmos resultados parecem indicar uma elevação precoce da NAG urinária, antes do estabelecimento da proteinúria e o seu conseqüente valor como parâmetro no prognóstico da nefropatia ou mesmo na detecção de nefropatia incipiente, ainda não identificada pelos métodos classicamente utilizados.

A confirmação da importância dos doseamentos urinários da NAG só pode ser definida seguindo grupos de diabéticos durante um período de tempo considerável até que surjam albuminúrias persistentes. Além disso, estes doseamentos poderiam constituir um índice do controle diabético, independentemente dos níveis de glicémia.

O doseamento da hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) aumentou enormemente a capacidade de monitorizar os efeitos dos ajustamentos terapêuticos no controle a longo prazo da glicémia, dado que os níveis da hemoglobina glicosilada reflectem os níveis médios da glicémia ao longo das seis semanas precedentes.^{43, 44}

Os níveis da hemoglobina glicosilada levam 4-6 semanas para normalizarem após a euglicémia se ter estabelecido, devido ao facto dos eritrócitos terem uma vida média de 120 dias. Por esta razão, os indicadores a curto prazo da manutenção de concentrações elevadas de glicémia, revestem-se de uma diferente utilidade clínica, dado que evidenciam um intervalo mais breve na resposta temporal.

Estudos efectuados por Brownlee e col⁴⁵ demonstraram que os níveis dos péptidos glicosilados urinários considerados os produtos de degradação das várias proteínas glicosiladas se encontravam significativamente elevados na diabetes ao contrário do que se passava nos controles. No entanto, o método utilizado é moroso e recorre a substâncias radioactivas.

No presente estudo, a correlação altamente significativa entre a NAG e a frutamina sugere que os doseamentos destes compostos pode constituir um método clínico laboratorial útil na monitorização dos doentes diabéticos.

Outra hipótese explicativa da elevada correlação entre a NAG e a frutamina é que as hidrolases ácidas são extraídas do plasma por sistemas de reconhecimento dos glúcidos⁴⁶ nos hepatócitos e células retículo endoteliais.

Assim, a glicosilação das proteínas séricas pode converter estas em inibidores da depuração das glicosidasas, prolongando o tempo de circulação e, conseqüentemente elevando o seu nível plasmático.

BIBLIOGRAFIA

- GADJOS, A.; em: Gadjos A. ed. *Enzymopathies*, vol. 4 Paris: Masson et Cie, 1972; 107-212.
- BELFIORE, F.; VECCHIO, L. L.; NAPOLI, E.: Serum enzymes in diabetes mellitus. *Clin. Chem.*, 1973; 19: 447.
- REGLERO, A.; CARRETERO, M. I.; CABEZAS, J. A.: Increased serum α - L - Glucosidase and β - N - acetyl glucosaminidase activities in diabetic, cirrhotic and gastric cancer. *Clin. Chim. Acta.*, 1980; 103: 155.
- MILLER, B. F.; KEYS, F. P.; CURRERI, P. W.: Increase of serum beta glucosaminidase activity in human diabetes mellitus. *J. Amer. Med. Ass.*, 1966; 195: 189.
- ARONSON, N. N. Jr.; DE DUVE.: Digestive activity of lysosomes. The degradation of macromolecular carbohydrates by extracts of rat liver lysosomes. *J. Biol. Chem.*, 1968; 243: 4564.
- MAHADVAN, S.; DILLARD, C. J.; TAPPEL, A. C.: Degradation of polysaccharides, mucopolysaccharides, and glycoproteins by lysosomal glycosidasas. *Acta Biochem. Biophys.*, 1969; 129: 525.
- DEAN, R.: Direct evidence of the importance of lysosomes in degradation of intracellular proteins. *Nature.*, 1975; 257: 414.
- BELFIORI, F.; LO VECCHIO, L.; NAPOLI, E.: Serum beta-glucosaminidase activity in diabetic patients, as related to vascular complications and degree of glucose metabolic disorder. *Amer. J. Med. Sci.*, 1972; 264: 457.
- NAPOLI, E.; LO VECCHIO, L.: Serum N - acetyl-beta-glucosaminidase activity in diabetic patients. *Diabetes.*, 1972; 21: 1168
- BELFIORI, R.; NAPOLI, E.; LO VECCHIO.: Increased activity of some enzymes in serum in cases of severely decompensated diabetes with and without ketoacidosis. *Clin. Chem.*, 1972; 18: 1403.

11. WEISSMANN, G.; UHR, J. W.; THOMAS, L.: Acute hypervitaminosis A in guinea pigs. I — Effects on acid hydrolases. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1963; 112: 284.
12. FUSHINI, H.; TARERI, S.: Retina, tear and serum B-N-acetylglucosaminidase activities in diabetic patients. *Clin. Chim. Acta.*, 1976; 71: 1.
13. PITKAMEN, E.; KYLLASTINEN, M.; RIOVULA, T.; HORMILA, P.: B-N-acetylglucosaminidase and B-glucuronidase activities in insulin treated diabetic subjects with retinopathy. *Diabetologia.*, 1980; 18: 275.
14. BOMBACK, F. M.; NAKAGAWA, S.; KUMIN, S.; NITOWSKY, H. M.: Altered lysosomal glycohydrolase activities in juvenile Diabetes Mellitus. *Diabetes.*, vol. 25, 1976; 5: 420.
15. SCHILLER, S.; DORFMAN, A.: The metabolism of mucopolysaccharides in animal. The influence of insulin. *J. Biol. Chem.* 1957; 227: 625.
16. BERRUSON, G. S.; RADHAKRISHNAMUTHY, B.; DALFENS, E. R. Jr.; RUIZ, H.; SRINIVASAN, S. R.; PLANIDOL, F.; BRECHMAN, F.: Connective tissue macromolecular changes in rats with experimentally induced diabetes and hyperinsulinism. *Diabetes.*, 1972; 21: 733.
17. BRENSSEN, G. S.; RUIZ, H.; DARFERES, E. R. Jr.; DUGAN, F. A.; RADHAKRISHNAMUTHY, B.: Acid mucopolysaccharide changes in diabetic kidneys. *Diabetes.*, 1970; 19: 161.
18. Mc. MILLAN, D. E.: Changes in serum proteins and protein bound carbohydrates in diabetes mellitus. *Diabetologia.*, 1970; 6: 597.
19. SRINIVASAN, S. R.; BERENSON, G. S.; RADHAKRISHNAMURTHY, B.: glycoprotein changes in diabetic kidneys. *Diabetes.*, 1970; 19: 171.
20. SPIRO, R. G.; SPIRO, M. J.: Effect of diabetes on the biosynthesis of the renal glomerular basement membrane. Studies on the glycosyltransferase. *Diabetes.*, 1971; 20: 641.
21. BEISSWENGER, P. J.; SPIRO, R. G.: Studies on the human glomerular basement membrane. Composition nature of the carbohydrate units and chemical changes in Diabetes Mellitus. *Diabetes.*, 1973; 22: 3-180.
22. SPIRO, R. G.: Glycoproteins: their biochemistry biology and role in human disease. *N. Engl. J. Med.*, 1969; 251: 991.
23. BUNN, H. F.: Non enzymatic glycosylation of protein relevance to diabetes. *Am. Med.*, 1981; 70: 325.
24. GRAG, R. J.; HALTER, J. B.; POSTE, D.: Glycosylated hemoglobin in normal subjects with maturity onset diabetes. Evidence for a saturable system in man. *Diabetes.*, 1978; 27: 834.
25. BODEN, G.; MASTER, R. W.; GORDON, S. S.; SCHUMEN, C. R.; OWEN, O. E.: Monitoring metabolic control in diabetic out patients with glycosylated hemoglobin. *Ann. Intern. Med.*, 1980; 92: 357.
26. JOHNSON, R. N.; METCALF, P. A.; BAKER, J. R.: Fructosamine, a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. *Clin. Chim. Acta.*, 1983; 127: 97.
27. BAKER, J. R.; O'CONNOR, J. P.; METCALF, P. A.; SAROSON, M. R.; JOHNSON, R. N.: Clinical usefulness of serum fructosamine concentration as a screening test for diabetes mellitus. *Br. Med. J.* 1983; 287: 863.
28. AZEVEDO, M.: Tese de Doutoramento. Lisboa, 1981.
29. SEABACK, D. H.; WALKER, P. C.: Studies on glucosaminidase. The fluorimetric assay of N-acetyl-B-glucosaminidase. *Biochem. J.* 1961; 78: 151.
30. OBERKOTTER, L.; TENORE, A.; PALMIERI, M.; KOLDOSKY, O.: Relationship of thyroid status and serum n-acetyl-B-glucosaminidase isoenzyme activities in humans. *Clin. Chim. Acta.*, 1979; 94: 281.
31. DANCE, N.; PRICE, R.; ROBINSON, D.; STERLING, L.: B-galactosidase and N-acetyl-B-glucosaminidase in human kidney. *Clin. Chim. Acta.*, 1969; 24: 189.
32. Fundamentals of Clinical Chemistry. Ed. Norbert W. Tietz, pg. 723, 1970.
33. WHITTING, P. H.; ROSE, I. S.; BOTHWICK, L.: Serum and urine N-acetyl-B-D-glucosaminidase in diabetes on diagnosis and subsequent treatment and in stable insulin dependent diabetics. *Clin. Chim. Acta.*, 1979; 92: 459.
34. POON, P. Y. W.; DORMAN, T. L.; ELLIS, R. B.; TURNER, R. C.: Increased plasma activities of N-acetyl-B-D-glucosaminidase isoenzymes in human Diabetes Mellitus. *Clinical Endocrinology*, 1979; 11: 625.
35. PINTO, C.; MARQUES, C.; SILVA, A.; FERNANDES, F.; AZEVEDO, M.; LISBOA, P.; MANSO, C.: Actividade da N-acetil-B-glucosaminidase (NAG) sérica na diabetes mellitus. *Acta Médica Portuguesa.*, 1984; 5: 175.
36. BROWN, D. M.; KLEIN, D. J.; MICHAEL, A. F.; OEGEMA, R. R.: ³⁵S-glycosaminoglycan and ³⁵S-glycopeptide metabolism by diabetic glomeruli and aorta. *Diabetes.*, 1982; 31: 418.
37. CHANG, A. Y.: Acid glycohydrolase in chinese hamster with spontaneous diabetes. Depressed levels of renal α -galactosidase and B-galactosidase. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1978; 522: 491.
38. BRENNER, B. M.; HOSTETTER, T. H.; HUMES, H. D.: Molecular basis of proteinuria of glomerular origin. *N. Engl. J. Med.* 1978; 298: 826.
39. KARWAY, Y. S.; FARQUHAE, M. C.: Presence of heparan sulfate in glomerular basement membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1979; 76: 1303.
40. KARWAY, Y. S.; FARQUHAE, M. C.: Isolation of glycosaminoglycans (heparan sulfate) from glomerular basement membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1979; 76: 4493.
41. PARTHASARATHY, N.; SPIRO, R. G.: Characterization of the glycosaminoglycan component of the renal glomerular basement membrane and its relationship to the peptide position. *J. Biol. Chem.*, 1981; 256: 507.
42. BROUHARD, B. H.; SAGRON, L.; TANIS, L. B.: Urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase to response of acute changes in blood glucose. 44th Annual Meeting of ADA. Diabetes 33 Supl. 1 (1A-202 A), 1984.
43. KOENIG, R. J.; PETERSON, C. M.; JONES, R. L.; SANDEK, C.; SEHRMAN, M.; CERAMI, A.: Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1C in diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 1976; 295: 417.
44. KOENIG, R. J.; CERAMI, A.: Hemoglobin A1C and diabetes mellitus. *Am. Rev. Med.*, 1980; 31: 29.
45. BROWNLEE, M.; VLASSARA, H.; CERAMI, A.: Measurement of glycosylated amino acids and peptides from urine of diabetic patients using affinity chromatography. *Diabetes.*, 1980; 29: 1044.
46. SUMMERFIELD, J.; VERGALIA, J.; JONES, E.: Modulation of glycoprotein recognition system on rat hepatic endothelial cells by glucose in diabetes mellitus. *J. of Clin. Investig.*, 1982; 69: 1337.

Pedido de separatas: Carlos Manso
 Instituto de Química Fisiológica
 Faculdade de Medicina de Lisboa
 Hospital de Santa Maria
 Av. Prof. Egas Moniz
 1600 Lisboa. Portugal.