

ACTIVIDADE DA N-ACETIL- β -GLUCOSAMINIDASE (NAG) SÉRICA NA DIABETES MELLITUS

M. C. PINTO, C. MARQUES, ALDA P. SILVA, FRANCISCA FERNANDES, MARIA AZEVEDO PEDRO LISBOA, CARLOS MANSO

Centro de Metabolismo e Endocrinologia. Instituto de Química Fisiológica. Faculdade de Medicina. Lisboa.
Departamento de Diabetologia. Serviço de Medicina 4. Hospital de Santa Maria.

RESUMO

A actividade da NAG foi doseada em 101 diabéticos e 76 controlos normais. A actividade enzimática estava aumentada quando comparada com a dos controlos — média de 739,30 unidades para os diabéticos vs 626,71 para os controlos ($p < 0,05$). Não se observaram variações na concentração enzimática relativamente ao sexo e idade. Na diabetes do tipo II a actividade estava aumentada ($p < 0,05$) comparada com a do tipo I. Os diabéticos foram classificados em 3 grupos consoante o tempo de evolução da doença: grupo A (< 5 anos); grupo B (média de 15 anos de evolução) e grupo C (> 20 anos). Os resultados foram significativos para o grupo A vs C ($p < 0,05$).

SUMMARY

Serum NAG activity in diabetes mellitus

Serum activity of N-acetyl- β , D-glucosaminidase (NAG) was determined in 101 patients with diabetes mellitus and in a control group of 76 normal persons. NAG is significantly increased, when compared to the control group — a mean value of 739,30 units for the diabetics vs 626,71 for the controls. There were no variations of NAG activity related to sex or age. In diabetes type II NAG activity was increased, when compared to the activity in diabetes type I. The diabetic patients included 3 groups according to the onset of the disease: group A (< 5 years); group B ($> 5 < 15$ years) and group C (> 20 years). The activities were significantly different in groups A vs C ($p < 0,05$).

INTRODUÇÃO

Diversos autores¹⁻³ têm demonstrado o aumento da actividade das hidrolases lisosómicas no soro de doentes com diabetes mellitus. Dado que os enzimas lisosómicos, que incluem a NAG, são capazes de degradar vários compostos, estas alterações enzimáticas podem atribuir-se a uma activação desses enzimas nos tecidos, que ocorra como resposta à necessidade metabólica de degradar proteoglicanos e gluco-proteínas (caso da diabetes com microangiopatia), ou diversos constituintes celulares resultantes do aumento do catabolismo celular.

Belfiore e col,⁴ não excluem a possibilidade deste enzima estar elevado simplesmente devido a uma redução da estabilidade lisosómica. A diminuição da velocidade de destruição do enzima podia contribuir também para a sua elevação.

As hidrolases ácidas têm sido correlacionadas com as vasculopatias na diabetes,⁵ encontrando-se as alterações enzimáticas como a expressão de um ajustamento bioquímico na protecção dos vasos contra a deposição de proteoglicanos e/ou gluco-proteínas.⁶ A finalidade deste estudo foi investigar se a actividade sérica da NAG na diabetes estava relacionada com as alterações metabólicas implicadas pela hiperglicémia e/ou vasculopatias. Este último grupo inclui microangiopatias, como a retinopatia diabética (classificada por exame fundoscópico) e nefropatia (identificada pela

presença de proteinúria persistente, com ou sem elevação da azotémia e/ou hipertensão, bem como macroangiopatias, como a esclerose coronária e a insuficiência arterial periférica (diagnosticada por sinais e sintomas clínicos e registos electrocardiográficos e oscilométricos).

Não foram incluídos neste estudo doentes com outra patologia além da diabetes e das suas complicações metabólicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudaram-se 101 diabéticos da Consulta Externa do Departamento de Diabetologia do Serviço de Medicina IV do Hospital de Santa Maria, 46 indivíduos do sexo masculino e 55 do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 10 e os 76 anos, e 76 controlos normais do Posto Avançado do Serviço de Transfusões de Sangue do Hospital de Santa Maria: 42 indivíduos do sexo masculino e 34 do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 19 e os 59 anos.

Os indivíduos usados como controlos não tinham evidência clínica ou laboratorial de diabetes mellitus, aterosclerose, doença hepática ou cancerígena.

Os diabéticos incluíam um grupo de 27 diabéticos do tipo I e 75 indivíduos com diabetes do tipo II.

Relativamente ao tempo de evolução foram considerados 3 grupos: 32 indivíduos do grupo A (< 5 anos de evolução); 46 do grupo B ($> 5 < 20$ anos de evolução) e 23 do grupo C (> 20 anos).

Com a colaboração técnica de Maria do Céu Menezes

A presença e o grau de retinopatia foi estabelecido pelo exame oftalmológico; a nefropatia pelo exame analítico da urina e do doseamento da creatinina e/ou ureia no soro e a neuropatia pelo exame clínico.

QUADRO 1

Indivíduos	N.º total	♂	♀	Idade média
Normais	76	42	34	40 anos (19 - 59)
Diabéticos	101	46	55	50 anos (10 - 76)
Grupo A (diabéticos c/ < 5 anos de evolução)	32	12	20	40 anos (14 - 66)
Grupo B (diabéticos c/ > 5 anos < 20 anos)	46	20	26	55 anos (10 - 74)
Grupo C (diabéticos c/ > 20 anos)	23	13	10	58 anos (35 - 75)
Tipo I	27	14	13	34 anos (14 - 65)
Tipo II	75	32	43	61 anos (10 - 76)
C/ insulina	39	17	22	46 anos (14 - 75)
S/ insulina	63	29	34	57 anos (10 - 76)
C/ macroangiopatia	41	23	18	58 anos (10 - 75)
S/ macroangiopatia	61	23	38	49 anos (14 - 76)
C/ microangiopatia	49	25	24	59 anos (15 - 75)
S/ microangiopatia	53	20	23	47 anos (10 - 76)

As amostras de sangue foram colhidas por punção venosa cerca de 3 horas após o pequeno almoço, e, submetidas à centrifugação, dividindo-se o sobrenadante em 3 partes ali-quotas, procedendo-se imediatamente ao doseamento da NAG ou congelando-se os soros a - 20 °C para determina-ções posteriores.

Foram também colhidas urinas nas quais foi doseada a albuminúria, glicosúria e cetonúria pelo método enzimático (Boehringer-Manheim Teste).

Fizeram-se simultaneamente doseamentos de glicémia nos mesmos soros, pelo método da glucose oxidase (Kit da Sigma), com modificações.⁷

A NAG sérica foi determinada fluorimetricamente utilizando-se 50 µl de soro para cada amostra, em duplicado, pelo método de Leaback e Walker⁸ com o 4-metilumbelliferil (4MU) glucosaminido como substrato fluorogénico, sendo o 4-MU liberto pela reacção convertido para a sua forma aniónica, altamente fluorescente, pela adição de tam-pão alcalino e o produto da reacção doseado fluorimetricamente.

RESULTADOS

O grupo diabético apresenta uma actividade sérica total superior à do grupo controlo.

QUADRO 2 NAG total (Act. enzimática nmoles 4-MU/h/ml soro)

	N.º	\bar{X}	SD	T-Student
Diabéticos	101	739,30 ± 214,442		p < 0,05
Normais	76	636,71 ± 141,673		

QUADRO 3 NAG total (Act. enzimática nmoles 4 MU/h/ml soro)

	N.º	\bar{X}	SD	T-Student
1. Diabéticos ♂	46	731,19 ± 206,274	1 vs 2	p < 0,001
2. Normais ♂	42	663,5 ± 143,19	2 vs 4	p = n.s.
3. Diabéticos ♀	55	743,58 ± 225,442	1 vs 3	p = n.s.
4. Normais ♀	34	581,2 ± 141,186	3 vs 4	p < 0,001

Não há diferença entre os sexos, quer nos diabéticos, quer nos normais.

QUADRO 4 NAG total (Act. enzimática nmoles 4 MU/h/ml soro)

Tempo de evolução	N.º	\bar{X}	SD	T-Student
1. grupo A (< 5 anos)	32	692,25 ± 172,908	1 vs 2	p = n.s.
2. grupo B (> 5 < 20 anos)	46	761,98 ± 203,942	2 vs 3	p = n.s.
3. grupo C (> 20 anos)	23	803,60 ± 228,486	1 vs 3	p < 0,05

Da análise do quadro ressalta que o grupo C com mais de 20 anos de evolução tem valores séricos elevados comparados com os do grupo A (> 5 anos de evolução).

QUADRO 5 NAG total (Act. enzimática nmoles 4 MU/h/ml soro)

	N.º	\bar{X}	SD	T-Student
1. Tipo I	27	666,22 ± 119,666	1 vs 2	p < 0,01
2. Tipo II	75	768 ± 230,849	2 vs 3	p < 0,001
3. Normais	76	626,71 ± 148,073	1 vs 3	p = n.s.

Os diabéticos do tipo II apresentam valores de NAG elevados comparados com os do tipo I.

QUADRO 6 NAG total (Act. enzimática nmoles 4 MU/h/ml soro)

	N.º	\bar{X}	SD	T-Student
1. S/ insulina	62	765,95 ± 218,23	1 vs 2	p = n.s.
2. C/ insulina	38	721,78 ± 179,428	2 vs 3	p < 0,001
3. Normais	76	626,71 ± 148,073	1 vs 3	p < 0,001

Os diabéticos sob insulino-terapia não apresentam valores de NAG significativamente diferentes comparados com os diabéticos não submetidos à insulino-terapia.

QUADRO 7 NAG total (Act. enzimática nmoles 4 MU/h/ml soro)

	N.º	\bar{X}	SD	T-Student
1. C/ macroangiopatia	41	758,87 ± 223,775	1 vs 2	p = n.s.
2. S/ macroangiopatia	61	746,95 ± 194,627	1 vs 3	p < 0,001
3. Normais	76	626,71 ± 148,073	1 vs 3	p < 0,001

QUADRO 8 NAG total (Act. enzimática nmoles 4 MU/h/ml soro)

	N.º	\bar{X}	SD	T-Student
1. C/ microangiopatia	49	773,12 ± 218,04	1 vs 2	p = n.s.
2. S/ microangiopatia	51	717,01 ± 211,961	2 vs 3	p < 0,001
3. Normais	76	626 ± 148,073	1 vs 3	p < 0,001

A análise dos Quadros 5 e 6 demonstra que o grupo de diabéticos com complicações vasculares não evidencia valores de NAG mais elevados que os dos diabéticos sem macro ou microangiopatia.

DISCUSSÃO

Os enzimas com actividade glucosídica estão implicados na degradação de glucosaminoglicanos, glucolípidos e glucoproteínas.

Existe alguma controvérsia relativamente aos níveis séricos de NAG, grau de hiperglicémia e gravidade da microangiopatia.

Belfiore e col.⁹ observaram uma elevação da actividade acompanhando a gravidade da diabetes que, todavia, não foi confirmada por Whitting e col.¹⁰ e Miller e col.¹¹ que não encontraram correlação entre o nível da hiperglicémia e os níveis da NAG sérica.

Ainda há quem admita que a incidência da microangiopatia em doentes com diabetes secundária não é tão grande como na diabetes idiopática e as alterações microvasculares podem ser o resultado de uma deficiência da insulina.

No grupo estudado, os diabéticos com microangiopatia não evidenciaram alterações significativas da NAG sérica, sendo admissível que a actividade enzimática elevada na diabetes idiopática possa reduzir-se com o tratamento com insulina ou o melhor equilíbrio da diabetes. Fushimi e Col.¹² demonstraram este efeito em ratos diabéticos (diabetes induzida pela estreptozotocina), após administração da insulina.

O facto de não se ter encontrado diferença no nível da actividade sérica em doentes com e sem retinopatia sugere que o aumento da actividade enzimática pode estar associado a alterações metabólicas intrínsecas da diabetes mellitus devidas à deficiência absoluta ou relativa da insulina.

O papel fisiológico da elevação da actividade enzimática é ainda desconhecido. Alhadeh e col.¹³ sugeriram que a actividade das glucosidases poderia estar implicada na patologia secundária associada à diabetes crónica.

A relação da actividade glucosidase no soro com o estado diabético e o controlo da glicémia não está ainda bem definida no ser humano.¹⁴

Neste estudo, o grau de hiperglicémia não tem correlação com o nível da actividade sérica de NAG, o que pode sugerir que a actividade sérica da NAG no diabético reflecte maior utilização de uma via que não é sensível à insulina.

Esta hipótese foi citada por autores, como Winegraad e De Pratti¹⁵ que demonstraram que o ciclo do ácido glucurónico não é sensível à insulina e estaria exacerbado no metabolismo da glucose no diabético, ao contrário do que se passa nos controlos normais.

A via do ácido glucurónico está parcialmente representada na Figura 1, tornando-se evidente que o aumento da utilização desta via conduziria a uma maior síntese de uridina difosfato e consequente síntese de proteoglicanos e glucoproteínas.

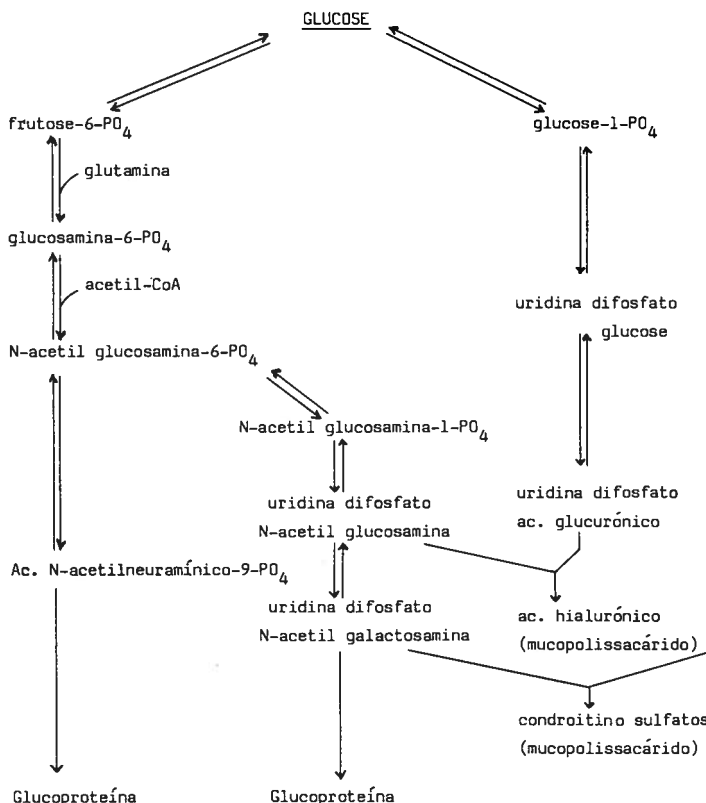


Figura 1: Representação esquemática da via do ácido glucurónico.

Já Spiro¹⁶ sugerira que o Shunt da glucose para esta via seria responsável pelo aumento da síntese e deposição de glúcidos complexos no sistema vascular dos diabéticos.

É geralmente admitido que uma alteração bioquímica fundamental na diabetes mellitus é o aparecimento de um excesso de polissacáridos ligados às proteínas (glucoproteínas) nas membranas basais dos capilares sanguíneos.¹⁷

Neeley e col.¹⁸ referem que os lisosomas são maiores e mais frágeis em fígados perfundidos na ausência da insulina. Uma alteração semelhante seria admissível na diabetes mellitus e poderia estar em relação com a saída da célula das glucosidases lisosómicas.

Por outro lado, a depuração das glucosidases sanguíneas é levada a cabo por receptores glucoproteicos específicos das membranas plasmáticas das células hepáticas. Chandra-mouli e col.¹⁹ referiram que ocorre uma redução aparente no conteúdo glucídico das glucoproteínas da membrana e que tal modificação pode alterar várias propriedades celulares como a permeabilidade, receptores hormonais lipoproteicos, propriedades ligantes do mitogénio, bem como o reconhecimento das glucosidases, do que resultaria uma redução da depuração destes enzimas e um aumento da sua concentração no sangue.

Certos tecidos, como o rim, não necessitam da insulina para o transporte da glucose intracelular, sendo livremente permeáveis a esta. Na presença da deficiência da insulina e hiperglicémia pode ocorrer o shunt da glucose da via metabólica insulino-dependente para vias insulino-independentes como as do sorbitol, hexosamina e das glucoproteínas (Figura 1).

Assim, a elevação das glucosidases seria um efeito secundário respeitante à superprodução da hexosamina e glucoproteínas, actuando como um mecanismo compensador.

Estes considerandos explicaram os resultados esquematizados no Quadro 2 relativamente ao tempo de evolução da diabetes e a respectiva elevação da NAG sérica.

Quanto a uma melhor definição dos resultados explícitos no Quadro 5 evidenciando valores da NAG na diabetes do tipo II significativamente diferentes dos do tipo I, impõem-se estudos posteriores, abrangendo grupos mais latos, e, com o mesmo tempo de evolução, para avaliar da alteração da actividade deste enzima lisosómico consoante o esquema terapêutico instituído, visando um melhor equilíbrio da diabetes. No que diz respeito ao recurso aos antidiabéticos orais mais vulgarmente utilizados, ou seja, as sulfonilureias

e as biguanidas, seria interessante determinar a sua influência na actividade dos enzimas lisosómicos, comparando as diferentes alterações metabólicas produzidas por estes dois tipos de agentes terapêuticos.

AGRADECIMENTO

O nosso agradecimento à Dr.^a Josefina Cruz e ao Dr. J. Coucello pela sua colaboração na análise computadorizada dos dados estatísticos.

BIBLIOGRAFIA

1. WOOLEN, J. W.; TURNER, P.: *Clin. Chim. Acta* 1965; 12: 671-683.
2. POON, P. Y. W.; DORMAN, T. L.; ELLIS, R. B.; TURNER, R. C.: *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 1979; 11: 625-630.
3. PITKAMEN, R.; KYLLASTINEN, M.; KIOVULA, T.; HORMILA, P.: *Diabetologia*. 1980; 18: 275-278.
4. BELFIORI, FRANCESCO; NAPOLI, ELENA; LO VECCHIO, LUIGI: *Diabetes* 21. 1972; 12: 1168-1172.
5. SERRANO, M. A.; REGLERO, A.; CABEZAS, J. A.; GARCIA DIEZ, L. C.; CORRALES, J. J.; CASTRO, S.; MIRROLLES, J. M.: *Clin. Chim. Acta* 1983; 132: 23-27.
6. MILLER, BENJAMIM F.; KEEYS, FRANCES P.; WILLIAM CURRERI, P.: *J.A.M.A.* 1966; 195, 3: 127-130.
7. AZEVEDO, M. S.: *Tese de Doutoramento*. Lisboa, 1981.
8. LABACK, D. H.; WALKER, P. C.: *Biochem. Journal*, 1961; 78: 151-156.
9. BELFIORI, F.; NAPOLI, E.; LO VECCHIO, L.: *Clin. Chem.* 1972; 18: 1403-1406.
10. WHITTING, P. H.; ROSS, I. S.; BORTHWICK, L.: *Clin. Chim. Acta*, 1979; 92: 459-463.
11. MILLER, B. F.; KEYES, F. P.; CURRERI, P. W.: *J. Am. Med. Assoc.* 1966; 195: 127.

Pedido de separatas: Carlos Manso
Centro de Metabolismo e Endocrinologia
Instituto de Química Fisiológica
Faculdade de Medicina
1600 Lisboa. Portugal