

GLICOSILAÇÃO NÃO-ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS. IMPLICAÇÕES PATOGENICAS E NO CONTROLO METABÓLICO DA DIABETES MELLITUS.

J. MARTINS E SILVA

Departamento de Bioquímica. Faculdade de Medicina de Lisboa. Lisboa. Portugal.

RESUMO

Nesta revisão pretende-se relacionar a glicosilação não-enzimática de diferentes tipos de proteínas corporais com a patogénese e complicações da diabetes mellitus. O mecanismo de glicosilação não-enzimática das proteínas é particularmente desenvolvido a propósito da hemoglobina e proteínas séricas ou plasmáticas, com destaque para a formação das fracções lábil e estável. Relaciona-se a concentração da hemoglobina glicosilada com o controlo metabólico existente nas 4 a 8 semanas anteriores à observação; por sua vez, a glicosilação das proteínas séricas ou plasmáticas reflectiria a regulação da glicémia num período mais limitado (1 a 2 semanas antecedentes). Finalmente, o desenvolvimento das complicações macro- e micro-vasculares da diabetes é discutido em relação com a glicosilação não-enzimática de diversas outras proteínas, tais como as da membrana basal, colagénio, cristalinas, lipoproteínas, imunoglobulinas, insulina e proteínas neurais.

SUMMARY

Non-enzymatic glycosylation of proteins. Relationship to the pathogenesis and metabolic control of diabetes mellitus.

The non-enzymatic glycosylation of different proteins and the relationship of such glycosylation to diabetes mellitus is the subject of this review. The general mechanism of glycosylation is presented, clarifying the labile and irreversible modifications induced on hemoglobin and serum or plasma proteins. Glycosylated hemoglobin concentration is related to metabolic control during the previous four to eight weeks. Likewise, plasma or serum glycoproteins are associated to a short-term glycaemia regulation, one to two-weeks before. Protein glycosylation may also contribute to the complications of diabetes mellitus. In this regard, the glycosylation of a variety of other proteins (such as basement membrane, collagen, cell membranes, insulin, lens crystallins, lipoproteins, immunoglobulins and neural proteins) and the development of macro-or microvascular complications of diabetes is discussed.

INTRODUÇÃO

A diabetes mellitus é uma anomalia metabólica complexa cuja principal característica patológica consiste numa degenerescência sistémica dos microvasos.¹ A microangiopatia diabética representa uma das causas mais importantes das alterações progressivas que afectam alguns órgãos (sistema nervoso central, retina, coração, rins), favorecem as infecções, limitam a cicatrização das feridas ou conduzem a amputações das extremidades gangrenadas.

As alterações patológicas da diabetes podem ser analisadas como o resultado imediato da ausência de insulina ou na base das suas repercussões teciduais. Embora os fundamentos bioquímicos daquela anomalia metabólica estejam já bem elucidados, continua por esclarecer o mecanismo que relaciona o défice de insulina com as alterações teciduais emergentes.

GLICOSILAÇÃO PROTEICA E HIPERGLICÉMIA

Observações clínicas e em modelos experimentais de diabetes tornam admissível que a hiperglicémia mantida seja o principal factor determinante das complicações associadas à diabetes. Presentemente, assume particular relevo a hipótese de que o aumento da glicosilação não-enzimática das proteínas teciduais, induzida pela hiperglicémia, conduza a alterações estruturais e, conseqüentemente, funcionais dessas proteínas, favorecendo o desenvolvimento das complicações crónicas e progressivas da diabetes.² Acessoriamente, mas não menos importante, a avaliação da glicosilação não-enzimática das proteínas parece assumir-se como um índice de controlo metabólico,^{3,4} em alternativa à determinação pontual da glicémia e glicosúria.

A confirmarem-se ambos os pressupostos, a glicosilação não-enzimática das proteínas contribuiria para o esclareci-

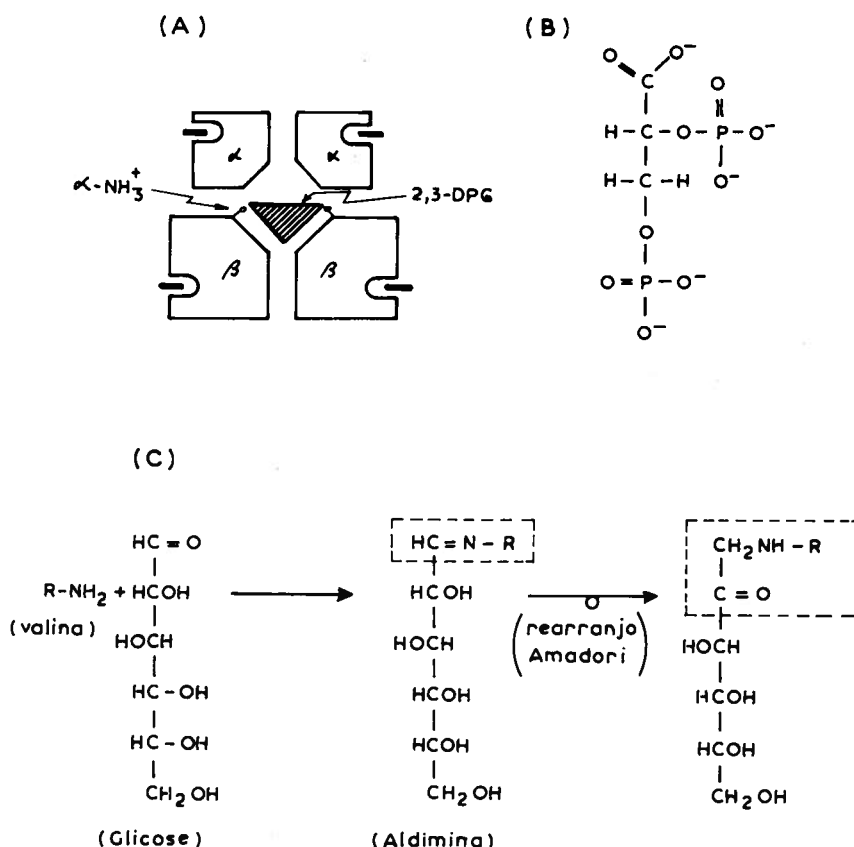


Figura 1: O 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) estabiliza a hemoglobina na conformação desoxigenada (A), ao fixar-se na cavidade central onde as 4 subunidades da hemoglobina contactam entre si. O 2,3-DPG (B), contendo cerca de 4 grupos com carga negativa fixa-se a ambas as cadeias β , ao nível dos três resíduos de carga positiva (em cada cadeia): grupo α -amino terminal (α -NH₃⁺), lisina 82 e histidina 143. A glicose, ao fixar-se no aminoácido terminal (valina) de cada cadeia β (representado por α -NH₃⁺), impede a ligação do 2,3-DPG à hemoglobina. A união da glicose às valinas terminais (C) envolve a forma aldimina (ou base de Schiff) que, por rearranjo Amadori, conduz à forma estável, cetoamina.

mento de duas questões ainda insolúveis na diabetes: a patogénese das suas complicações e a apreciação do controlo metabólico.⁵

Presentemente estão já identificadas diversas proteínas cuja glicosilação é acentuada na diabetes mellitus. É o caso da hemoglobina, proteínas do cristalino, mielina, colagénio, séricas ou plasmáticas, das membranas eritrocitárias e basal dos glomérulos, tubulinas cerebrais e, até a insulina.

HEMOGLOBINAS GLICOSILADAS

O primeiro exemplo de glicosilação não-enzimática sob condições fisiológicas foi demonstrado para a hemoglobina, há cerca de 25 anos.⁶ A fracção glicosilada, posteriormente identificada como a hemoglobina A_{1c} (HbA_{1c}), tem vindo a ser objecto de renovado interesse clínico, ao verificar-se que os seus níveis aumentavam dos 5 a 6% que constituem o normal para valores que podem atingir 18 a 20% nos diabéticos descompensados, em proporção com a hiperglicémia incidente.³⁻⁵ *In vivo*, a hemoglobina glicosilada aumenta lenta e irreversivelmente com a idade eritrocitária,⁷ sendo também, *in vitro*, dependente da concentração de glicose, tempo e temperatura de incubação.⁸ A HbA_{1c} resulta de uma modificação pós-tradução das moléculas de hemoglobina A por glicosilação não-enzimática da extremidade-N das ca-

deias β por um resíduo de glicose.⁹⁻¹¹ Esta alteração química, que acaba por ser irreversível logo que se forme uma ligação cetoamina (Fig. 1), bloqueia os centros de fixação do 2,3-difosfoglicerato à hemoglobina.^{12, 13} Em consequência, o equilíbrio alostérico do tetramero de hemoglobina desvia-se ligeiramente para a esquerda, ao que corresponde um aumento da afinidade da hemoglobina para o oxigénio. (Fig. 2). Em doentes com sistema vascular relativamente normal, aquele desvio da curva de dissociação da oxiemoglobina pouco ou nada afectará a oxigenação dos tecidos envolventes.^{4, 12} Em contrapartida, nos doentes com degenerescência vascular e limitações relevantes da microcirculação, é de prever que o aumento, mesmo ligeiro, da afinidade da hemoglobina para o oxigénio, subjacente à elevação de HbA_{1c}, induza o fornecimento de oxigénio aos tecidos periféricos abaixo dos níveis críticos.

A HbA_{1c} é a fracção mais importante dos componentes glicosilados da hemoglobina. Entre as fracções menores isolam-se a HbA_{1a1} e HbA_{1a2} (por condensação das extremidades-N das cadeias β da hemoglobina A com açúcares fosforilados), além da HbA_{1b} que contém um açúcar ainda por identificar, também fixado na extremidade-N das cadeias β .^{11, 13} Todas estas fracções, designadas em conjunto por HbA₁, aumentam na diabetes descompensada, particularmente à custa da HbA_{1c}.^{4, 14-18} Em consequência, a taxa de HbA₁, que exhibe elevada correlação com a da subfracção A_{1c}¹⁸ é tida como um índice geral da hemoglobina glicosilada e, como tal, utilizada para fins clínicos.¹⁶

Mais recentemente, foi verificado que a glicose forma ligações cetoamina não só ao nível das extremidades-N das cadeias β mas também nas extremidades-N das cadeias α e grupos ϵ -amina de resíduos de lisina dispersos por ambas as cadeias da hemoglobina.¹³ Assim, a glicosilação da hemoglobina parece ser muito menos específica do que se previa, apesar de aumentar proporcionalmente à HbA_{1c} nos eritrócitos de diabéticos.^{4, 16}

OUTRAS GLICOPROTEÍNAS DE SÍNTESE NÃO-ENZIMÁTICA

A relativa inespecificidade da fixação do grupo glicídico à hemoglobina intensificou as pesquisas sobre a glicosilação de outras proteínas, sobretudo daquelas que, pela sua longevidade, seriam mais susceptíveis aos efeitos da hiperglicémia mantida. Na sequência, foi confirmada a glicosilação não-enzimática dos resíduos de lisina, inicialmente no colágeno, depois nas membranas eritrocitárias e, por fim em outras proteínas, com as cristalinas, albumina e insulina. Grande parte dessas glicosilações revela-se aumentada na diabetes mellitus ou experimental.^{2, 5}

Glicosilação do colágeno

O colágeno intersticial, pelo seu elevado período de renovação, tem a capacidade de fixar gradualmente resíduos de hexoses.¹⁹ A estabilidade dos complexos de glicose- ϵ -NH₂ lisina resultantes parece basear-se num rearranjo Amadori, conducente à formação de uma ligação cetoamida. A N-glicosilação do colágeno ocorre com a glicose e galactose mas não com a manose, sendo significativa apenas para a condensação da glicose com a hidroxilisina.²

Estudos em diabéticos revelaram alterações do colágeno (como diminuição da solubilidade, superior resistência a enzimas e aumento das interligações) que seriam consistentes com um envelhecimento acelerado.²⁰ No envelhecimento normal diminuem as interligações da lisina e aumentam os grupos hexosil-lisina.^{19, 21}

Os grupos hexosil-lisina observados no colágeno da aorta de diabéticos eram estabilizados por rearranjo Amadori;²² *in vitro*, o colágeno é estabilizado por incubações com glicose.² Destes estudos poderá concluir-se que a glicose favorece, independentemente do envelhecimento normal, a estabilização do colágeno.²

A glicosilação do colágeno, que aumenta com a idade, é acentuada pela diabetes, sobretudo na sua forma juvenil.^{20, 22} A partir de determinada idade, não se observam diferenças na quantidade do colágeno glicosilado de diabéticos e normais do mesmo grupo etário.²⁰ Aparentemente, existe um limite de centros disponíveis no colágeno para a fixação da glicose, que seriam ocupados precocemente no decurso da hiperglicémia. Desta forma, o aumento da glicosilação em tecidos como o colágeno contribuiria para o desenvolvimento das complicações da diabetes, semelhantes a alterações por envelhecimento.^{2, 20}

Outra implicação do aumento de N-glicosilação no colágeno intersticial fibroso, com a idade e maturação, resulta da sua interacção com as plaquetas: o colágeno intensamente glicosilado, *in vivo* ou *in vitro*, desfavorece a agregação plaquetária, o que poderá revelar-se de grande importância na diabetes e tecidos envelhecidos.²

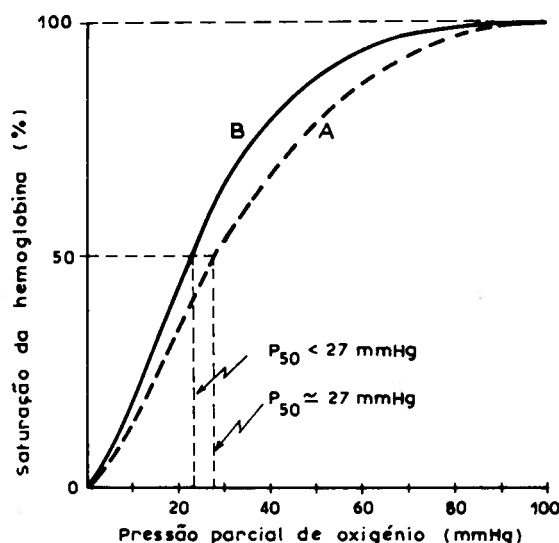


Figura 2: Comparação de duas curvas de dissociação da oxiemoglobina, em indivíduos normais (A) e doentes com diabetes mellitus (B). Nos diabéticos, a afinidade de hemoglobina para o oxigênio (calculada de valores da pressão parcial de oxigênio que satura 50% da hemoglobina) é, teoricamente, superior ao normal (expressando-se por um valor de P₅₀ inferior a 27 mmHg).

As consequências funcionais (aumento de permeabilidade) e patológicas (espessamento) das alterações da membrana basal dos glomérulos e pericapilares são por demais conhecidos na diabetes, de que constituem uma das complicações mais significativas.¹ No rato, a indução experimental da diabetes pela estreptozotocina acompanha-se de espessamento significativo da membrana basal glomerular.²³ Esta alteração correlacionava-se positivamente com a hiperglicémia que, por si, constituiria o principal factor determinante do espessamento da membrana basal dos glomérulos.

Embora permaneça desconhecida, a etiologia do espessamento da membrana basal vem sendo associada ao aumento de glicosilação não-enzimática do colágeno constituinte.^{24, 25} Tal como o colágeno intersticial, o da membrana basal parece renovar-se muito lentamente, o que facilitaria a síntese de grupos hexosil-lisina²⁶ em proporções particularmente significativas na diabetes.²⁷ De facto, o colágeno purificado da membrana basal glomerular de ratos diabéticos por estreptozotocina evidenciava um aumento significativo da glicosilação não-enzimática;²⁵ essa alteração resultaria da interacção não-enzimática da glicose com a membrana basal, sendo a glicosilação *in vitro* proporcional ao tempo de exposição, temperatura de incubação e concentração do meio em glicose.²⁷ Os resíduos da lisina e hidroxilisina, componentes do colágeno da membrana basal, constituiriam os locais preferenciais para a fixação da glicose.²⁷

Com base nestes resultados poderia supor-se que a hiperglicémia, através da glicosilação não-enzimática, interfere nas propriedades químicas de proteínas especificamente envolvidas na glomerulosclerose diabética, alterando a integridade das barreiras capilares e favorecendo a permeabilidade microvascular. Por sua vez, a progressiva glicosilação (durante semanas?) da membrana basal normal, ao limitar hipoteticamente a eficiência do sistema degradativo, justificaria o aumento da sua vida biológica e, portanto, a acumulação verificada na diabetes.²⁵

São de salientar os surpreendentes resultados obtidos em murganhos não-diabéticos que, injectados repetidamente

com proteínas plasmáticas glicosiladas, desenvolveram espessamento da membrana basal glomerular, com aspecto ultramicroscópico semelhante ao observado na diabetes humana e experimental.²⁸ Qualquer que seja a etiologia do referido espessamento da membrana basal, há que admitir uma estreita interrelação entre a glicosilação proteica e a nefropatia diabética. De acordo com o conceito clínico que considera as complicações da diabetes relacionadas com a gravidade e duração da doença,²⁹ é de prever que oscilações no controlo da hiperglicémia, ao reflectirem-se no aumento da glicosilação das proteínas que atravessam os glomérulos renais ou se formam no local, induzam modificações funcionais progressivas com posterior tradução morfológica.

Cristalinas

As cristalinas das lentes oculares são outras proteínas de grande longevidade, senão a maior entre todas as proteínas teciduais. Uma vez formadas, as cristalinas permanecem intactas nas células fibrosas do cristalino durante toda a vida do portador; isto não exclui, contudo, a sua glicosilação não-enzimática, demonstrada em animais e humanos.³⁰⁻³³

Nas lentes de bovinos normais, a glicosilação aumenta com a idade, todavia muito mais lentamente do que sucede com a hemoglobina.³³

Em parte, a glicosilação poderá ser facilitada pela independência que o cristalino, tal como os eritrocitos, exhibe face à insulina, justificando que a concentração de glicose intracelular se equivalha à do meio exterior.³⁴ De facto, a hiperglicémia experimental em ratos pelo aloxano ou níveis elevados de glicose (ou glicose 6-fosfato) em soluções de cristalinas purificadas (de ratos ou bovinos) induz a glicosilação lenta dos grupos ϵ -amino da lisina.³⁰ *In vitro*, a glicosilação favorece a oxidação dos grupos SH, que, pelas interligações dissulfito, parecem estar na origem de agregações de elevado peso molecular e da opalescência das soluções de cristalinas.

Estudos prévios em cataratas humanas já haviam demonstrado o envolvimento da oxidação dos grupos sulfidrílicos na formação de ligações dissulfito e consequente reforço da polimerização proteica, a par da intensa formação de agregados proteicos de elevado peso molecular. A maturação das cataratas, p. ex., estaria correlacionada com o decréscimo de grupos sulfidrílicos e aumento de proteínas insolúveis, em ambos os casos atribuíveis à formação de ligações S-S.

A semelhança química subjacente a esta evolução e à opacificação das cristalinas *in vitro*, ou as cataratas desenvolvidas em ratos diabéticos,³⁰ sugere um novo mecanismo de cataractogénese da diabetes, com base na glicosilação não-enzimática das cristalinas. Neste caso, a hiperagregação das proteínas da lente através das ligações dissulfito seria acelerada pela exagerada glicosilação não-enzimática das proteínas, em condições de hiperglicémia.^{30, 32} Por via das transformações químicas subsequentes, a coloração amarela ou castanha observada sob fluorescência nas cataratas humanas poderia reflectir estados finais da glicosilação não-enzimática das cristalinas.

Estados de hipergalactosémia experimental conduzem, tal como na hiperglicémia, ao aumento da glicosilação não-enzimática (nos resíduos de lisina), oxidação sulfidrílica e

agregação das proteínas do cristalino.³² Assim, a glicosilação não-enzimática assume-se como um dos possíveis factores envolvidos na formação das cataratas, na diabetes e galactosémia.

Membranas eritrocitárias

Condensações de glicosil-lisina têm sido demonstradas em todas as principais fracções proteicas das membranas eritrocitárias de indivíduos normais^{35, 36} ou em quantidades cerca de duas vezes superiores em diabéticos.^{36, 37} *In vitro*, bastam 3 dias de incubação a 37 °C com 500 mg/dl de glicose para aumentar mais de duas vezes as quantidades do complexo glicosil-lisina nos eritrocitos de indivíduos normais.³⁷ Inicialmente, havia sido referida a existência de complexos da glicosil- e manosil-lisina nas proteínas eritrocitárias, estabilizadas por rearranjo Amadori da ligação aldimina.

A glicosilação, prevalecte nos grupos ϵ -NH da lisina, revelou-se particularmente superior à da hemoglobina, talvez em resultado da permanente exposição à glicose de ambas as faces da membrana. A correlação observada entre o aumento da glicosilação não-enzimática das proteínas da membrana eritrocitária e a HbA_{1c} em diabéticos^{36, 37} sugere que a glicosilação depende, em ambos os casos, da glicémia e idade globular.

Tal como a hemoglobina, as proteínas da membrana eritrocitária são formadas durante a eritropoiese e permanecem virtualmente inalteradas até à senescência globular. A extensão das modificações emergentes da ligação cetoamina serão, assim, um reflexo da acção constante da glicose e, particularmente, do controlo glicídico nas hemácias jovens postas em circulação.

A moderada diminuição da sobrevivência eritrocitária em diabéticos, corrigida pelo controlo metabólico instituído³⁸ poderá ser uma consequência funcional do aumento da glicosilação não-enzimática das proteínas da membrana ou, em alternativa, de alterações na composição lipídica da dupla camada. A reduzida deformabilidade eritrocitária observada em diabéticos^{39, 40} talvez constitua uma consequência adicional da hiperagregação não-enzimática da respectiva membrana.

Proteínas plasmáticas e séricas

A seguir à hemoglobina, as proteínas plasmáticas e séricas constituem a área em que mais intensivamente tem sido estudada a glicosilação não-enzimática, sobretudo em associação com a diabetes humana ou experimental. Embora a generalidade destes estudos seja muito recente, é de notar que já em 1921 havia sido detectado um aumento da fixação de compostos glicídicos nas proteínas séricas em doentes com diabetes mellitus.⁴¹ A natureza química daquela anomalia permaneceu desconhecida até se verificar que diferia das composições e concentrações habituais das glicoproteínas por síntese enzimática. Em alternativa, aquela glicosilação assumia-se como uma transformação não-enzimática das proteínas já existentes em circulação.

In vitro a extensão e velocidade de glicosilação não-enzimática das proteínas evidencia-se proporcional à concentração da glicose, temperatura, tempo de incubação e pH. Este

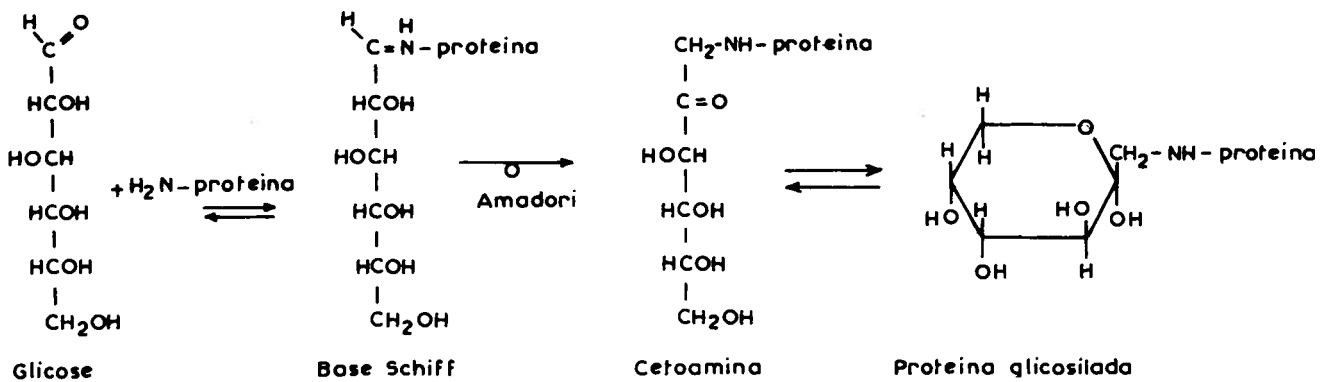


Figura 3: A glicosilação não-enzimática das proteínas assemelha-se à da hemoglobina. No esquema é explicitada a disposição final da glicoproteína, na forma de hemiacetal.

fenômeno tem sido particularmente evidenciado para a albumina, em parte devido à sua abundância e rápida renovação.⁴²⁻⁴⁴ De facto, cerca de 90 % das glicoproteínas séricas é representada pela albumina, cuja semi-vida é calculada em 17 a 20 dias no homem.⁴⁵ Na incubação de soro humano com D-(6-³H)-glicose regista-se uma acumulação gradual da radioactividade em todas as principais classes de proteínas séricas, com destaque para a albumina.^{42, 44} Cerca de 8 % da albumina sérica total em indivíduos normais é constituída pela fracção glicosilada.⁴²

A concentração de hexose fixada às proteínas séricas revelava-se significativamente mais elevada em diabéticos que pareciam encontrar-se sobre razoável controlo metabólico.^{46, 47} Acessoriamente, os níveis de proteínas séricas glicosiladas equivaliam-se em doentes com e sem retinopatia.⁴⁷ Assim, o desenvolvimento da microangiopatia não seria influenciada, senão de forma irrelevante, pela glicosilação das proteínas séricas glicosiladas, o que estaria de acordo com os níveis elevados observados em estados precoces da diabetes, sem sinais de vasculopatia.^{39, 48} Todavia, não se exclui que o desenvolvimento da microangiopatia (ou de outras complicações da diabetes) seja essencialmente afectado por determinada fracção proteica do soro, mais sensível à glicosilação e à metodologia utilizada.⁴⁶ Com métodos específicos que individualizam a formação da ligação cetamida (estável) foi de facto confirmado um aumento muito significativo da glicosilação não-enzimática das proteínas séricas na diabetes humana^{47, 49-51} e também em ratos.⁵² *In vitro*, diferentes classes de proteínas humanas e de ratos estão sujeitas a glicosilação não-enzimática.^{42, 43, 52} Em qualquer destas condições, a elevação das proteínas séricas glicosiladas era proporcional à hiperglicémia^{49, 50, 52} ou à concentração de glicose no meio da incubação.^{42, 43} A elevada correlação observada entre as proteínas totais e a albumina, glicosiladas,^{49, 52} não exclui, contudo, uma intensa glicosilação a nível das outras fracções proteicas, designadamente demonstradas nas regiões de eluição cromatográfica das imunoglobulinas IgG e IgM/ α -macroglobina.⁴⁹

A glicosilação não-enzimática das proteínas plasmáticas assemelha-se à do soro. *In vitro*, depende da duração e temperatura de incubação.⁵³ Todas as proteínas plasmáticas (com destaque para a albumina) são passíveis de glicosilação

não-enzimática, não se detectando diferenças de reactividade entre amostras de normais e diabéticos, nem correlação significativa com os níveis incidentes de outras glicoproteínas plasmáticas, como o fibrogénio, α_2 -macroglobulinas e haptoglobina.⁵³ Embora a fracção glicosilada do plasma de doentes diabéticos seja, como a do soro, nitidamente superior ao normal,⁵⁴ observações em estirpes de hamsters diabéticos põem em causa a validade daquelas determinações.⁵⁵ Na origem deste desacordo estaria a heterogeneidade genética da população humana.¹

Em diabéticos verifica-se um acentuado aumento da albumina glicosilada^{44, 56, 57} por vezes mais significativo que o da HbA_{1c}.⁵⁷ Em doentes que pareciam estar metabolicamente controlados, com base em critérios convencionais (glicémia e glicosúria)⁵¹ ou pelos valores de HbA_{1c},⁵⁷ observaram-se níveis elevados de albumina (ou proteínas) séricas glicosiladas. Esta discrepância poderá justificar a ausência de correlação significativa entre a HbA_{1c} e a albumina glicosilada,⁵⁷ ao que se opõe, contudo, a nítida interdependência observada em outros trabalhos para os mesmos parâmetros.⁵⁶ Esta diferença talvez seja explicada pelo estado de controlo metabólico e evolução terapêutica de doentes estudados, já que a variação dos níveis de albumina glicosilada ocorre muito mais rapidamente que a da hemoglobina glicosilada, a concentrações comparáveis de glicémia.⁵⁶

A glicosilação processa-se por mecanismo não-enzimático com a formação da ligação cetamida⁴² ao nível de grupos ϵ -amina da lisina.⁴⁴ A ciclização da cetamina na estrutura de hemiacetal contribui provavelmente para a estabilidade da condensação glicosil-proteína em condições fisiológicas (Fig. 3).

A par da glicose, outros monossacáridos como a frutose, galactose, manose e ribose, têm a capacidade de formar glicosil-albumina *in vitro*.⁴⁴ A incorporação da galactose, tal como a da glicose, na albumina humana purificada evolui segundo uma reacção da 1.^a ordem (relativamente à concentração da albumina e do monossacárido), aumentando ainda com o pH e temperatura de incubação. A galactosilação da albumina apresenta-se muito mais rápida e cerca de 300 vezes mais extensa que a glicosilação,⁵⁸ ambas ocorrendo por mecanismos não-enzimáticos e sob condições experi-

mentais equivalentes que conduzem à formação de uma ligação covalente.

Eventualmente, as diferenças relativas de reactividade da galactose e glicose para a albumina poderão derivar da existência de centros de fixação diferentes e com especificidade própria para cada monossacárido. Esta hipótese estaria de acordo com os resultados da incorporação não-enzimática da manose e glicose na insulina, muito mais rápida e extensa com o primeiro daqueles monossacáridos que para a glicose.⁴⁴

A modificação química de uma proteína pela galactose, aparentemente semelhante à obtida com a glicose, permite sugerir que algumas das complicações patológicas associadas à galactosémia derivam da condensação não-enzimática e pós-tradução de alguns tipos de proteínas corporais com a galactose, em excesso nos tecidos *in vivo*.

De facto, numa criança com galactosémia a concentração de albumina sérica galactosilada era quase o triplo do normal.⁵⁹ A confirmar-se em situações idênticas, aquela alteração talvez afecte a capacidade de transporte de metabolitos pela albumina, p.ex., a bilirrubina, deste modo justificando a icterícia observada nos galactosémicos.

A glicosilação não-enzimática da albumina poderia revelar-se também um factor influente na patogénese da microangiopatia diabética. Na realidade, verifica-se que microvasos isolados da camada adiposa do epidídimo de ratos captam com grande avidéz a albumina glicosilada, ao contrário da forma não-glicosilada, que é rejeitada.⁶⁰ Contudo, se a albumina glicosilada exceder os níveis fisiológicos, estimula a endocitose da fracção não-glicosilada. Aparentemente, a glicosilação não-enzimática da albumina ocorre a par de idêntica transformação dos componentes da membrana endotelial, a qual favorece a endocitose da albumina glicosilada e rejeita a fracção não-glicosilada. A causa destas diferenças é por enquanto desconhecida.

A extravasão da fluorescéina, que ocorre em união com a albumina, é uma das alterações mais precoces da retinopatia diabética.⁶¹ Na diabetes juvenil de detecção precoce ou de longa duração verifica-se um aumento da permeabilidade microvascular às proteínas plasmáticas.⁶² Em geral, poderá dizer-se que o espessamento da membrana basal dos vasos de determinados tecidos, que constitui uma das características iniciais da diabetes mellitus, é acompanhada pelo aumento da permeabilidade aos iões e macromoléculas, designadamente da albumina.^{63, 64} Estas alterações variam com a duração da doença,^{65, 66} qualidade do controlo metabólico⁶⁶ e actividade física.⁶⁷

Neste contexto poderá suceder que a glicosilação não-enzimática da albumina e proteínas da membrana endotelial contribua para o extravasamento da albumina em sectores restritos. A verificar-se também na diabetes humana, poderá admitir-se que a perda crónica da albumina (ou de outras proteínas plasmáticas) contribua para o desenvolvimento da microangiopatia diabética.

Lipoproteínas plasmáticas

Finalmente, o aparente excesso da glicosilação não-enzimática das lipoproteínas humanas de baixa densidade (LDL)^{68, 69} poderá abrir novas perspectivas na patogénese da arteroesclerose da diabetes. De facto, as lipoproteínas em referência exercem acção relevante no desenvolvimento da arteroesclerose que, por si, representa a principal causa da morbidade e mortalidade na diabetes.⁷⁰⁻⁷² Em condições normais, as lipoproteínas são removidas do plasma por endocitose, após fixação a receptores específicos da membrana celular. Segue-se a degradação lisossómica da apolipoproteína

na β (a principal proteína das LDL) e a hidrólise dos ésteres de colesterol das lipoproteínas.⁷³ O colesterol livre resultante estimula a própria reesterificação e, simultaneamente, deprime a sua síntese o que, em conjunto, se reflecte na homeostase intracelular do colesterol. Interferências neste mecanismo tendem a acelerar a arteroesclerose. É o que parece suceder na diabetes, já que modificações químicas nos grupos de lisina da apolipoproteína β limitam a fixação das LDL aos receptores de membrana.⁷⁴

In vitro, as lipoproteínas de baixa densidade são glicosiladas proporcionalmente à concentração de glicose do meio, com a formação de complexos glicosil-lisina.^{68, 69} Esta transformação diminui a degradação das lipoproteínas nos fibroblastos humanos em cultura, em correlação positiva com a quantidade de glicose incorporada.⁶⁹ Enquanto as lipoproteínas normais inibem a actividade da β -hidroximetil-glutaril-CoA-redutase e estimulam a da acilcoenzima A-colesterol-aciltransferase, a fracção glicosilada não parece revelar qualquer efeito.⁶⁹

A glicose 6-fosfato restringe, ainda com mais eficácia, a afinidade para o receptor e a degradação das lipoproteínas glicosiladas resultantes. Assim, tal como sucede nos eritrócitos de diabéticos, que contêm pequenas quantidades de hemoglobina conjugada com glicose 6-fosfato,⁴ também as LDL complexadas com este metabolito evidenciam comportamento semelhante ao das lipoproteínas condensadas com glicose livre. *In vivo* a degradação das LDL glicosiladas revela-se subnormal em cobaias, a par do aumento da percentagem de lisina glicosilada nas LDL de doentes diabéticos insulino-dependentes.⁶⁹ Este resultado foi ainda confirmado com um método diferente em doentes diabéticos.⁶⁸

Miscelânea

A glicosilação não-enzimática abrange uma diversidade insuspeitada e, por vezes, surpreendente de proteínas corporais. Alguns desses exemplos, limitados a estudos experimentais, poderão revelar-se de grande importância no contexto do controlo e evolução da diabetes mellitus. É o que sucede designadamente com a insulina que, *in vitro*, incorpora por covalência resíduos de glicose e manose.⁷⁵ A glicosilação da insulina por ambas as hexoses limita a sua actividade biológica no tecido adiposo, relativamente à oxidação da glicose, lipogénese e antilipólise. Se, como tudo leva a crer, a glicosilação da insulina também ocorrer *in vivo*, particularmente na diabetes mellitus, diversas questões hoje ainda em aberto na evolução e tratamento desta doença terão de ser reanalisadas sob perspectivas mais realistas.

A glicosilação potencial das proteínas dos nervos periféricos constitui outro exemplo relevante. Em cães e ratos diabéticos, a glicosilação não-enzimática das proteínas dos nervos periféricos era duas a três vezes superior aos valores dos controlos normoglicémicos.⁷⁶ Nesse estudo verifica-se que os principais complexos de glicosilação eram glicosil-lisina ou produtos de rearranjo hidrolíticos, eventualmente localizados nas proteínas axonais, da mielina ou diversos componentes de ambos.

Igualmente sugestivo, pelos seus efeitos potenciais, é o aumento da glicosilação não-enzimática das tubulinas cerebrais de rato, quer *in vitro* ou *in vivo*.⁷⁷ Aquela ocorrência justificaria a diminuição da polimerização das tubulinas que, em alternativa, se organizavam em complexos amorfos de elevado peso molecular.

A demonstrar-se idêntica ocorrência em humanos diabéticos estaria confirmado um potencial factor determinante das anomalias morfológicas, fisiológicas e degenerescência clínicas que caracterizam a neuropatia diabética. Nesta complicação, a alteração morfológica mais significativa associa-

da à diminuição da velocidade de condução é uma desmielinização parcelar. A glicosilação não-enzimática demonstrada para a mielina⁷⁸ apoia, em princípio, a interferência deste mecanismo na patogênese da neuropatia diabética.

Finalmente, as consequências imunológicas da glicosilação não-enzimática das IgG e IgM,⁴⁹ ainda por avaliar, não podem ser ignoradas.

IMPLICAÇÕES NO CONTROLO METABÓLICO

De todos os tipos de proteínas glicosiladas por mecanismos não-enzimáticos apenas as que intervêm como componentes sanguíneos parecem revestir-se de interesse prático na avaliação do estado de controlo metabólico na diabetes.^{3, 4, 38} por duas razões principais. Em primeiro lugar, qualquer amostra de sangue representa como que uma biópsia tecidual, de fácil obtenção e donde se individualizam rapidamente os constituintes desejados; pelo contrário, a caracterização dos restantes tecidos é dificultada pela sua inacessibilidade e, sobretudo, pela metodologia e cuidados requeridos, por vezes injustificados. Em segundo lugar, os constituintes eritrocitários ou séricos têm uma vida-média estabelecida entre dias ou meses, renovando-se num prazo razoavelmente adequado ao estudo pretendido; por contraste, a glicosilação não-enzimática em outros tecidos (p.ex., colagénio, nervos periféricos, componentes renais, do cristalino) referem-se a alterações duradouras e aparentemente estabelecidas em períodos de hiperglicémia precoce, em estruturas que se renovam pouco ou nada ao longo da vida do portador.

A hemoglobina^{3, 4, 16} e as proteínas séricas totais⁵ são, entre as fracções sanguíneas susceptíveis à glicosilação não-enzimática, as mais utilizadas como índice de controlo metabólico. Os métodos disponíveis para a sua determinação são relativamente acessíveis a qualquer laboratório de rotina e, sobretudo, existem provas concludentes de que os níveis obtidos reflectem a concentração média de glicose coexistente num determinado limite de tempo.²⁻⁴

Relativamente à hemoglobina glicosilada poderá determinar-se a fracção de HbA_{1c} ou, em alternativa, a fracção glicosilada total (HbA₁), que representa o somatório dos componentes A_{1a}, A_{1b} e A_{1c}. Atendendo contudo à elevada correlação evidenciada com a HbA_{1c},^{16, 18, 79} considera-se que a HbA₁ é significativamente representativa, para fins clínicos, da extensão da glicosilação não-enzimática da hemoglobina. A determinação da HbA_{1c}, que requer equipamento sofisticado dificilmente acessível à generalidade dos laboratórios, ficará assim reservada para estudos mais individualizados e de investigação.

Quanto às proteínas séricas há que referir a sua relativa facilidade de doseamento, tecnicamente mais simples que o da albumina glicosilada, que não dispensa a purificação prévia da albumina. Considerando a elevada percentagem de albumina na composição das proteínas séricas e a estreita correlação positiva existente entre ambas as fracções glicosiladas, o ensaio para as glicoproteínas séricas parece ser, também, um indicador bastante válido do grau de hiperglicémia.

O outro componente sanguíneo demonstradamente susceptível de glicosilação não-enzimática é a membrana eritrocitária. Em termos práticos poderá dizer-se que não oferece vantagens, relativamente à determinação da HbA₁; requer metodologia muito diferenciada e, por outro lado, a vida-média das membranas identifica-se com a dos restantes componentes proteicos eritrocitários e, portanto à da HbA₁, muito mais fácil de dosear.

Tradicionalmente, o diagnóstico e avaliação clínica da diabetes mellitus baseiam-se em testes de glicosúria e glicémia, estes com ou sem sobrecarga oral de glicose.¹ Embora a sua utilização continue a ser recomendada, particularmente em diabéticos não-insulino dependentes,^{1, 3} aqueles testes apresentam limitações, em que se destacam as seguintes: (a) aferem apenas valores pontuais, representativos do momento de observação; (b) requerem a cooperação activa dos doentes; (c) são influenciados por variáveis como o período do dia, exercício ou ingestão alimentar.

Em alternativa, qualquer medição que reflectisse a glicémia integrada de determinado período de tempo ofereceria a vantagem de avaliar, com rapidez, a eficácia de eventuais alterações terapêuticas ou, genericamente, o estado de controlo metabólico nesse período.

A informação acumulada sobre a estrutura e biosíntese da HbA₁ considera-a um parâmetro representativo do índice de glicémia verificada em dado doente diabético nas 4 a 6 semanas anteriores.^{3, 4, 16, 80} A gravidade da hiperglicémia e as variações da hemoglobina glicosilada evidenciam estreita interrelação em murganhos e doentes diabéticos.^{15, 24} Entretanto, verifica-se idêntica correlação entre os níveis de HbA_{1c} (ou HbA₁) e alguns dos parâmetros convencionais de controlo da diabetes, como a glicémia de jejum ou a glicosúria.^{3, 7, 14, 79, 80}

Eventualmente, a determinação da HbA₁ poderá contribuir para o diagnóstico da diabetes, embora seja menos discriminativa que o teste da sobrecarga ou a glicémia de jejum, no despiste da diabetes subclínica. De facto, uma proporção significativa de doentes assintomáticos com teste anormal de tolerância à glicose apresentava valores normais de HbA_{1c}.⁷⁹

Por sua vez, valores normais de HbA₁ poderão diferenciar da diabetes situações agudas que evoluem com hiperglicémia, por ex., o enfarte agudo do miocárdio.⁸¹ A determinação da Hb glicosilada foi também proposta no despiste da anemia hemolítica e avaliação do grau de hemólise, desde que a diabetes mellitus possa ser excluída.⁸²

O doseamento da HbA₁ (ou HbA_{1c}) poderá assumir-se como um índice válido em diabetologia, sobretudo na diabetes insulino-dependente, que evolui com flutuações por vezes acentuadas da glicémia. Estas oscilações da glicémia raramente ocorrem em diabéticos não-insulino-dependentes sob controlo dietético e/ou antidiabéticos orais;^{1, 83} em consequência, a avaliação da intolerância à glicose poderá ser efectuada com maior rapidez e economia através da glicémia de jejum.^{3, 16}

A aceitação da HbA₁ como indicador metabólico da diabetes continua a ser posta em causa por outros estudos, que referem a inexistência de vantagens significativas, quer na rentabilidade ou especificidade do diagnóstico.^{1, 84}

Tal como a hemoglobina glicosilada, as proteínas séricas glicosiladas parecem correlacionar-se apenas com outros índices de controlo glicídico e não com situações gerais, como a idade, sexo, duração da diabetes e presença ou ausência de retinopatia.^{47, 50} De facto, a extensão da glicosilação das proteínas séricas ou plasmáticas correlacionava-se significativamente com a HbA₁ e também com a glicémia de jejum.^{49, 53} Os níveis de albumina glicosilada eram também proporcionais ao aumento de HbA₁, correlacionando-se naqueles estudos com a glicémia em jejum⁵⁰ ou apenas com a glicémia média.⁵⁵ Aparentemente, algumas destas discrepâncias poderão ser atribuídas a diferenças na gravidade de evolução dos diabéticos analisados e, também, a problemas metodológicos consequentes à remoção ou inclusão da fracção lábil glicosilada.^{49, 54}

A correlação entre as glicoproteínas séricas e a glicémia de jejum era mais acentuada em diabéticos do tipo 2 que

nos insulino-dependentes,⁴⁷ o que seria a favor da utilidade das proteínas séricas glicosiladas como medida da glicemia relativamente estabilizada.

Observações em doentes com insulinoma⁵⁶ sugerem que a velocidade de formação de glicosil-albumina é muito superior à sua eliminação da corrente sanguínea. Assim, é de prever que a hiperglicemia incidente induza ao rápido aumento daquela proteína na forma glicosilada, que se demonstra proporcional aos valores médios de glicemia.⁵⁵ Todavia, a velocidade de renovação da albumina ou, genericamente, das proteínas séricas glicosiladas é 4 a 5 vezes superior à da hemoglobina.

À exceção da albumina, virtualmente todas as proteínas séricas são glicoproteínas isto é, proteínas com uma ou mais cadeias glicídicas unidas por ligações covalentes. Todavia, a glicose não parece incluir-se entre os componentes normais de proteínas circulantes.⁸⁵ Em consequência, o aumento da fracção glicosilada por mecanismos não-enzimáticos e, sobretudo, a glicosilação da albumina face à hiperglicemia da diabetes representa uma situação claramente anormal, com potencial incidência nas funções dessas proteínas (p.ex., transporte, propriedades imunológicas, etc.).

Poder-se-á também supor que as flutuações de glicemia sejam sensibilizadas mais pelas proteínas séricas glicosiladas que pela HbA_{1c}. Este aspecto sobressai particularmente no decurso da terapêutica antidiabética, em que a par de quase 40% de diminuição dos níveis das proteínas séricas glicosiladas não se verificam alterações significativas nos valores de HbA_{1c}.^{47, 56} Em ratos diabéticos⁵² foi possível verificar, através da terapêutica com insulina, que as variações na albumina glicosilada eram mais sensíveis que as da glicoglobina às variações da glicemia.

Em conformidade, o valor das proteínas séricas glicosiladas poderá considerar-se um indicador útil do estado da glicemia decorrente uma a duas semanas antes das colheitas.^{51, 55}

AGRADECIMENTOS

O autor expressa o seu agradecimento ao Sr. Chim W. San, pela ilustração gráfica do texto e à Sra. D. Emília Alves, que o dactilografou.

Trabalho realizado no âmbito da linha 2 INIC (MbL2).

BIBLIOGRAFIA

- GENUTH, S.: Classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Med. Clin. Nth. Amer.* 1982; 66: 1191-1207.
- BAILEY, A. J.: The non-enzymatic glycosylation of proteins. In «Pathogenic Concepts of Diabetic Microangiopathy», E. Standl e H. Mehnert (eds), Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 1981 pg. 90-94.
- GABBAY, K. H.: Glycosylated hemoglobin and diabetes mellitus. *Med. Clin. Nth. Amer.* 1982; 66: 1309-1315.
- BUNN, H. F.; HANEY, D. N.; GALLOP, P. M.: The glycosylation of hemoglobin: relevance to diabetes mellitus. *Science* 1978; 200: 21-27.
- BUNN, H. F.: BUNN, H. F.: Non-enzymatic glycosylation of protein: relevance to diabetes. *Amer. J. Med.* 1981; 70: 325-330.
- RAHBAR, S.: An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. *Clin. Chim. Acta* 1968; 22: 296-298.
- BUNN, H. F.; HANEY, D. N.; KAMIN, S.; GABBAY, K. H.; GALLOP, P. M.: The biosynthesis of human hemoglobin in vivo. *J. Clin. Invest.* 1976; 57: 1652-1659.
- FLUCKINGER, R.; WINTERHALTER, K.: In vitro synthesis of hemoglobin A_{1c}. *FEBS Lett.* 1978; 71: 356-360.
- BUNN, H. F.; HANEY, D. N.; GABBAY, K. H.; GALLOP, P. M.: Further identification of the nature and linkage of the carbohydrate in hemoglobin A_{1c}. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1975; 67: 103-109.
- KOENIG, R. J.; BLOBSTEIN, S. H.; CERAMI, A.: A structure of carbohydrate of hemoglobin A_{1c}. *J. Biol. Chem.* 1977; 252: 2992-2997.
- MCDONALD, M. J.; SHAPIRO, R.; BLEICHMAN, M.; SOLWAY, M.; BUNN, H. F.: Glycosylated minor components of human adult hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 1978; 253: 2327-2332.
- BUNN, H. F.; BRIEHL, R. W.: The interaction of 2,3-diphosphoglycerate with various human hemoglobins. *J. Clin. Invest.* 1970; 49: 1008-1014.
- SHAPIRO, R.; McMANUS, M. J.; ZALUT, C.; BUNN, H. F.: Sites of nonenzymatic glycosylation of human hemoglobin A. *J. Biol. Chem.* 1980; 255: 3120-3127.
- GABBAY, K. H.; HASTY, K.; BRESLOW, J. C.; ELLISON, R. C.; BUNN, H. F.; GALLOP, P. M.: Glycosylated hemoglobin and long-term blood glucose control in diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1971; 44: 859-864.
- KOENIG, R. J.; PETERSON, C. M.; JONES, R. C.; SAUDEK, C.; LEHRMAN, M.; CERAMI, A.: Correlation of regulation and hemoglobin A_{1c} in diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 1976; 295: 417-420.
- GONEN, G.; RUBENSTEIN, A. H.; ROCKMAN, H.; TANEGA, S. P.; HORWITZ, D. L.: Haemoglobin A_{1c}. An indication of the metabolic control of diabetic patients. *Lancet* 1977; 734-737.
- MCDONALD, J. M.; DAVIS, J. E.: Glycosylated hemoglobin and diabetes mellitus. *Human Pathol.* 1979; 10: 279-291.
- DUNN, P. J.; COLE, R. A.; SOELDNER, J. S.; GLEASON, R. E.: Reproducibility of hemoglobin A_{1c} and sensitivity to various degrees of glucose intolerance. *Ann. Int. Med.* 1979; 91: 390-396.
- ROBINS, S. P.; BAILEY, A. J.: Age-related changes in collagen: the identification of reducible lysine-carbohydrate condensation products. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1972; 48: 76-84.
- SCHNIDER, S. L.; KOHN, R. R.: Glycosylation of human collagen in aging and diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 1980; 66: 1179-1181.
- HAMLIN, C. R.; KOHN, R. R.: Evidence for propensive, age-related structural changes in post-mature human collagen. *Biochem. Biophys. Acta* 1971; 236: 458-467.
- ROSENBERG, H.; MODRACK, J. B.; HASSING, J. M.; AL-TURK, W. A.; STOHS, S. J.: Glycosylated collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1979; 91: 498-501.
- FOX, C. J.; DARBY, S. C.; IRELAND, J. T.; SONKSEN, P. H.: Blood glucose control and glomerular capillary basement membrane thickening in experimental diabetes. *Brit. Med. J.* 1977; 2: 605-607.
- KOENIG, R. J.; CERAMI, A.: Synthesis of hemoglobin A₁ in normal and diabetic mice: potential model of basement membrane thickening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1975; 72: 3687-3691.
- COHEN, M. P.; SURMAN, M.: Renal glomerular basement membrane. In vivo biosynthesis and turnover in normal rats. *J. Biol. Chem.* 1980; 255: 1767-1770.

26. COHEN, M. P.; URDANIVIA, E.; SURMA, M.; WU, V. Y.: Increased glycosylation of glomerular basement membrane collagen in diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980; 95: 765-769.
27. COHEN, M. P.; URDANIVIA, E.; SURMA, M.; CIBERWSKI, S. J.: Non-enzymatic glycosylation of basement membranes; in vitro studies. *Diabetes* 1981; 30: 367-371.
28. McVERRY, B. A.; FISCHER, C.; HOPP, A.; HUEHNS, E. R.: Production of pseudodiabetic renal glomerular changes in mice after repeated injections of glycosylated proteins. *Lancet*. 1980; i: 738-740.
29. TAKAZAKURA, E.; NAKAMOTO, Y.; HAZAKAWA, H.; KAWAI, K.; MURAMOTO, S.; YOSHIDA, K.; SLIMIZU, M.; SHINODO, A.; TAKEUCHI, J.: Onset and progression of diabetic glomerulosclerosis. *Diabetes* 1975; 24: 1-9.
30. STEVENS, U. J.; ROUZER, C. A.; MONNIER, V. M.; CERAMI, A.: Diabetic cataract formation: potential role of glycosylation of lens crystallins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1978; 75: 2918-2922.
31. PANDE, A.; GARNER, W. H.; SPECTOR, A.: Glycosylation of human lens proteins and cataractogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1979; 89: 1260-1266.
32. MONNIER, V. M.; STEVENS, V. J.; CERAMI, A.: Non-enzymatic glycosylation, sulfhydryl oxidation and aggregation of lens proteins in experimental sugar cataracts. *J. Exp. Med.* 1979; 150: 1098-1107.
33. CHIOU, S. H.; CHYLACK, L. T. Jr.; TUNG, W. H.; BUNN, H. F.: Nonenzymatic glycosylation of bovine lens crystallins. *J. Biol. Chem.* 1981; 256: 5176-5180.
34. SPIRO, R. G.: Search for a biochemical basis of diabetic microangiopathy. *Diabetologia* 1976; 12: 1-14.
35. BAILEY, A. J.; ROBINS, S. P.; TANNER, M. J. A.: Reducible components in the proteins of human erythrocyte membrane. *Biochem. Biophys. Acta.* 1976; 434: 51-57.
36. MILLER, J. A.; GRAVALLESE, E.; BUNN, H. F.: Non-enzymatic glycosylation of erythrocyte membrane proteins. Relevance to diabetes. *J. Clin. Invest.* 1980; 65: 896-901.
37. SCHLEIDER, Z.; SCHELLER, L.; WIELAND, O. H.: Quantitative investigation of nonenzymatic glycosylation of erythrocyte membrane from normal and diabetic persons. In «Pathogenic Concepts of Diabetic Microangiopathy». E. Standl e H. Mehner (eds), Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 1981; pg. 95-97.
38. PETERSON, C. M.; KOENIG, R. V.; JONES, R. L.; MELVIN, E. T.; LEHRMAN, M. L.: Reversible hematologic sequelae of diabetes mellitus. *Ann. Int. Med.* 1977; 86: 425-429.
39. McMILLAN, D. E.: Plasma protein changes, blood viscosity and diabetic microangiopathy. *Diabetes* 1976; 25 (suppl. 2): 858-864.
40. McMILLAN, D. E.; UTTERBACK, N. G.; LaPUMA, J.: Reduced erythrocyte deformability in diabetes. *Diabetes* 1978; 27: 895-901.
41. BIERRY, H.; RATHERY, F.: Diabète et glycémie. *C. R. Acad. Sci.* 1921; 172: 244-246.
42. DAY, J. F.; THORPE, S. M.; BAYNES, J. W.: Non-enzymatically glycosylated albumin: in vitro preparation and isolation from normal human serum. *J. Biol. Chem.* 1979; 254: 595-597.
43. DAY, J. F.; THORNBURG, R. W.; THORPE, S. M.; BAYNES, J. W.: Non-enzymatic glycosylation of rat albumin: Studies in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 1979; 254: 9394-9400.
44. DOLHOFER, R.; WIELAND, O. H.: Glycosylation of serum albumin: elevated glycosyl-albumin in diabetic patients FEBS Lett. 1979; 103: 282-286.
45. SCHULTZE, H. E.; HEREMAN, J. F.: Molecular Biology of Human Proteins, vol. 1, Elsevier/North Holland, Amsterdam New York, 1966; p. 475.
46. KENNEDY, A. L.; KANDELL, T. K.; MERIMEE, T. J.: Serum protein-bound hexose in diabetes. *Diabetes* 1979; 28: 1006-1010.
47. KENNEDY, L.; MEHL, T. D.; RILEY, W. J.; MERIMEE, T. J.: Non-enzymatically glycosylated serum protein in diabetes mellitus: an index of short-term glycaemia. *Diabetologia* 1981; 21: 94-98.
48. JARQUE, P.; MARBLE, A.; TULLER, E. F.: Protein, lipoproteins and protein bound carbohydrates in the serum of diabetic patients. *Amer. J. Med.* 1959; 27: 221-230.
49. McFARLAND, K. F.; CATALANO, E. W.; DAY, J. F.; THORPE, S. R.; BAYNES, J. W.: Non-enzymatic glycosylation of serum protein in diabetes mellitus. *Diabetes* 1979; 28: 1011-1014.
50. KENNEDY, A. C.; MEHN, T. D.; MERIMEE, T. J.: Non-enzymatically glycosylated serum protein: spurious elevation due to free glucose in serum. *Diabetes* 1980; 29: 413-415.
51. GRAGNOLI, G.; TANGANELLI, I.; SIGNORINI, A. M.; TARLI, P.; PAOLI, C.: Non-enzymatic glycosylation of serum protein as an indicator of diabetic control. *Acta Diabet. Lat.* 1982; 19: 161-166.
52. DAY, J. F.; INGEBRETSEN, C. G.; INGEBRETSEN, W. R. Jr.; BAYNES, J. W.; THORPE, S. R.: Non-enzymatic glycosylation of serum proteins and hemoglobin: response to changes in blood glucose levels in diabetic rats. *Diabetes* 1980; 29: 524-527.
53. YUE, D. N.; MORRI, K.; McLENNAN, S.; TURTLE, J. R.: Glycosylation of plasma protein and its relation to glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes* 1980; 29: 296-300.
54. MA, A.; NAUGHTON, M. A.; CAMERON, D. P.: Glycosylated plasma protein: a simple method for the elimination of interference by glucose in its estimation. *Clin. Chim. Acta* 1981; 115: 111-117.
55. COPELAND, J.; BLASHFIELD, K.; BAUER, B.; GERRITSEN, G. C.; GIUSBERG, L. C.: Plasma glycoproteins of diabetic and normal chinese hamsters. *Experientia* 1982; 38: 301-302.
56. DOLHOFER, R.; RENNER, R.; WIELAND, O. H.: Different behaviours of haemoglobin A_{1a-c} and glycosyl-albumin levels during recovery from diabetic ketoacidosis and non-acidotic coma. *Diabetologia* 1981; 21: 211-215.
57. GUTHROW, C. E.; MORRIS, M. A.; DAY, J. F.; THORPE, S. M.; BAYNES, J. W.: Enhanced nonenzymatic glycosylation of human serum albumin in diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979; 76: 4258-4261.
58. URBANOWSKI, J. C.; COHENFORD, M. A.; DAIN, J. A.: Non-enzymatic galactosylation of human serum albumin. *J. Biol. Chem.* 1982; 207: 11-115.
59. URBANOWSKI, J. C.; COHENFORD, M. A.; LEVY, H. C.; CRAWFORD, J. D.; DAIN, J. A.: Non-enzymatically galactosylated serum albumin in a galactosemic infant. *N. Engl. J. Med.* 1982; 306: 84-86.
60. WILLIAMS, S. K.; DEVENNY, J. J.; BITENSKY, M. W.: Micropinocytic ingestion of glycosylated albumin by isolated microvessels: possible role in pathogenesis of diabetic microangiopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1981; 78: 2393-2397.
61. CUNHA-VAZ, J. G.; FONSECA, J. R.; ABREU, J. F.; RUAS, M. A.: Detection of early retinal changes in diabetes by vitreous fluorophotometry. *Diabetes* 1979; 28: 16-19.
62. PARVING, H. H.: Increased microvascular permeability to plasma proteins in short and long-term juvenile diabetes. *Diabetes* 25 (suppl. 2) 1976; 884-889.
63. ALPERT, J. S.; COFFMAN, J. D.; BALODIMOS, M. C.; KONCZ, L.; SOELDNER, J. S.: Capillary permeability and blood flow in skeletal muscle of patients with diabetes mellitus and genetic prediabetes. *N. Engl. J. Med.* 1972; 2: 454-460.

64. BRODNER-MORTENSEN, J.; DITZEL, J.; MOGENSEN, C. E.; RODBRO, P.: Microvascular permeability to albumin and glomerular filtration rate in diabetic and normal children. *Diabetologia* 1979; 16: 307-311.
65. MOGENSEN, C. E.: Glomerular filtration rate and renal plasma flow in short-term juvenile diabetes mellitus. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1971; 28: 91-100.
66. PARVING, H.-H.; RUTILI, F.; GRANATH, K.; NOER, I.; DECKERT, T.; LYGSOE, J.; LARSEN, N. A.: Effect of metabolic regulation on renal leakiness to dextran molecules in short-term insulin-dependent diabetics. *Diabetologia* 1979; 17: 157-160.
67. MOGENSEN, E.; VITTINGHUS, E.: Urinary albumin excretion during exercise in juvenile diabetes. A provocation test for early abnormalities. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1978; 35: 295-300.
68. SCHLEICHER, E.; DEUFEL, T.; WIELAND, O. H.: Non-enzymatic glycosylation of human serum lipoprotein. *FEBS Lett.* 1981; 129: 1-4.
69. WITZTUM, J. L.; MOHOMEY, E. M.; BRANKS, M. J.; FISHER, M.; ELAM, R.; STEINBERG, D.: Non-enzymatic glycosylation of low density lipoprotein alters its biological activity. *Diabetes* 1982; 31: 283-291.
70. RASKIN, P.: Diabetic regulation and its relationship to microangiopathy. *Metabolism* 1978; 27: 235-252.
71. COLWELL, J. A.; HALUSHKA, P. U.; SARJI, K. E.; LOPES-VIRELLA, M. F.; SAGEL, J.: Vascular disease in diabetes. Pathophysiological mechanism and therapy. *Arch. Int. Med.* 1979; 139: 225-230.
72. STEINER, G.: Diabetes and atherosclerosis. An overview. *Diabetes* 30 (suppl. 2) 1981; 1-7.
73. GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S.: The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Ann. Rev. Biochem.* 1977; 46: 897-930.
74. MAHLEY, R. M.; INNERARITY, T. L.; WEITGRABER, K. H.; OH, S.Y.: Altered metabolism (in vivo and in vitro) of plasma lipoproteins after selective chemical modification of lysine residues of the apoproteins. *J. Clin. Invest.* 1979; 64: 743-750.
75. DOLHOFER, R.; WIELAND, O. H.: Preparation and biological properties of glycosylated insulin. *FEBS Lett.* 1979; 100: 133-136.
76. VLASSAR, H.; BROWNLIE, M.; CERAMI, A.: Non-enzymatic glycosylation of peripheral nerve protein in diabetic mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1981; 78: 5190-5198.
77. WILLIAMS, S. K.; HOWARTH, N. L.; DEVENNY, J. J.; BITENSKY, M. W.: Structural and function consequences of increased tubulin glycosylation in diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1982; 79: 6546-6550.
78. FLUCKINGER, R.; WINTERHALTER, K. H.: Glycosylated hemoglobin. In: «Molecular Interactions of Hemoglobin». D. Labie, C. Poyart, J. Rosa (eds), INSERM 1977; 70: 319-326.
79. DUNN, P. J.; COLE, R. A.; SOELDNER, J. S.; GLEASON, R. E.; KWA, E.; FIROOZABADI, H.; YOUNGER, D.; GRAHAM, C. A.: Temporal relationship of glycosylated haemoglobin concentration to glucose control in diabetics. *Diabetologia* 1979; 17: 213-220.
80. BODEN, G.; MASTER, R. W.; GORDON, S. S.; SHUMAN, C. R.; OWEN, O. E.: Monitoring metabolic control in diabetic out-patients with glycosylated hemoglobins. *Ann. Int. Med.* 1980; 92: 357-360.
81. SOLER, N. G.; FRANK, S.: Value of glycosylated hemoglobin measurements after acute myocardial infarction. *JAMA* 1981; 246: 1690-1693.
82. PANZER, S.; KAONIK, G.; LECHNER, K.; BETTELHEIM, P.; NEUMAN, E.; DUDCZAK, R.: Glycosylated hemoglobins (GHb): an index of red cell survival. *Blood* 1982; 59: 1348-1350.
83. PAISEY, R. B.; BRADSHAW, P.; HARTOG, M.: Home blood glucose concentration in maturity onset diabetes. *Brit. Med. J.* 1980; 1: 596-588.
84. SANTIAGO, J. V.; DAVIS, J. E.; FISHER, F.: Hemoglobin A_{1c} levels in a diabetes detection program. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1978; 47: 578-590.
85. ASHWELL, G.; STEER, C. J.: Hepatic recognition and catabolism of serum glycoproteins. *JAMA* 1981; 246: 2358-2364.

Pedido de separatas: J. Martins e Silva
 Departamento de Bioquímica
 Faculdade de Medicina de Lisboa
 Av. Prof. Egas Moniz
 1600 Lisboa. Portugal