

COMPOSTOS DE MAILLARD COMO CAUSA DE ENVELHECIMENTO

M.S. AZEVEDO

Instituto de Química Fisiológica. Faculdade de Medicina. Lisboa

RESUMO

Várias teorias têm sido propostas para explicar o mecanismo do envelhecimento. Dentro destas teorias duas têm fortes razões que as justificam: a da geração de radicais de O_2 e o da glicosilação não enzimática das proteínas, isto é, da formação dos compostos de Maillard. São precisamente o oxigénio e a glucose, essenciais para o Sistema Nervoso Central, e praticamente para todos os tecidos, os agentes do envelhecimento, segundo as modernas teorias. Pela verificação feita por nós de que os compostos de Maillard geram radicais livres de O_2 , podem sintetizar-se as duas teorias do envelhecimento, numa só.

SUMMARY

Maillard compounds as the cause of aging

Several theories have been presented to explain the mechanism of aging. Among those theories, two are supported by strong reasons: the generation of oxygen radicals and nonenzymatic glycosylation of proteins. Oxygen and glucose are essential for the central nervous system (and practically for all tissues) and at the same time they are the main cause of aging. Through our demonstration that Maillard compounds generate oxygen free radicals, both theories may be united in one.

INTRODUÇÃO

Serão as causas responsáveis pelo envelhecimento do SNC as mesmas do envelhecimento somático?

De todas as células do SNC, a mais vulnerável à lesão é o neurónio, enquanto que os oligodendrócitos, astrócitos, microglia e pericitos são muito resistentes. Verifica-se que tanto a interrupção do fornecimento de O_2 como de glucose ao SNC causam em segundos alterações no interior das células que incluem degenerescência das neurofibrilhas, presença de grânulos de lipofuscina e depósito amiloide.

A velocidade de formação de lipofuscina nos neurónios correlaciona-se com a idade e é simultânea com a diminuição do RNA citoplasmático¹.

Até há pouco tempo, considerou-se que a formação de lipofuscina o pigmento da idade seria devido à interacção de lípidos oxidados com as proteínas celulares. A lipoperoxidação provoca a formação do malonaldeído, composto contendo dois grupos carbonil, muito reactivos. Através desses grupos, o malonaldeído pode ligar-se a grupos amina de proteínas ou de ácidos nucleicos; inicialmente formando uma base de Schiff que depois sofre um rearranjo e estabiliza, dando origem a ligações cruzadas que alteram tanto a estrutura como a função das proteínas².

Os açúcares redutores na presença de oxigénio podem autooxidar-se e dessa autooxidação resultam dicarbonilos que são muito reactivos e que se unem a grupos amina de amino ácidos e ácidos nucleicos.

A simples ligação de um único dicarbonil dos açúcares (processo de glicosilação não enzimática) a proteínas vai originar alteração da estrutura e função destas.

Os compostos resultantes da ligação de mono ou dicarbonilos de açúcares, principalmente da glucose, a proteína, originam um pigmento escuro, que aumenta com o avanço da idade — as melanoidinas³.

Recentemente verificou-se que as melanoidinas faziam parte também daquilo que era designado por pigmento da idade, a lipofuscina⁴.

Formação dos Compostos de Maillard

Foi Maillard quem pela primeira vez em 1912, verificou que açúcares redutores se uniam a grupos amina de amino ácidos, quer estes estivessem isolados ou fizessem parte de proteínas. Constatou que inicialmente se formavam compostos incolores, e que, mais tarde, estes reagiam entre si. Imitavam fluorescência e tornavam-se acastanhados.

Já nessa altura Maillard propôs que as sequelas tardias da diabetes seriam devidas à glicosilação não enzimática das proteínas⁵.

Maillard estudou a complexidade das reacções. Foram considerados dois tipos de compostos formados após ligação de um açúcar redutor a um grupo amina de um a proteína. Se o composto for incolor significa que se formou recentemente e assim é denominado *composto de Maillard precoce*; se fôr corado, *composto de Maillard tardio*, ou *Melanoidina*^{5,6}.

Este assunto teve um desenvolvimento enorme depois da segunda guerra mundial, após constatação de que os produtos alimentares armazenados escureciam e perdiam o seu valor nutritivo. Este problema era particularmente grave com o leite. A alteração conduzia ao seu escurecimento e era potenciada pela presença de metais, de O_2 e pelo aumento da temperatura e da humidade do ambiente^{7,8}.

Glicosilação Não Enzimática de Proteínas *in vivo*

O assunto voltou à esfera médica, após Rahbar em 1968 ter verificado que doentes diabéticos tinham aumento de uma hemoglobina mais rápida electroforeticamente que a HbA, e que foi designada por HbA1⁹. Verificou-se depois que esse aumento de mobilidade electroforética era devida à ligação de glucose a amino ácidos por um processo não enzimático.

Considerou-se ser o processo de doseamento da HbA1 um processo útil para a avaliação do controle metabólico do doente diabético, devido ao facto de os valores se correlacio-

narem com os valores médios da glicémia dos últimos 3 meses, período correspondente à vida média do eritrócito^{11,12}.

Mas, além de servir como indicador do controle metabólico do diabético, a glicosilação não enzimática de proteínas é responsável pelas complicações tardias da diabetes de longa evolução, confirmando a ideia inicial de Maillard de 1912¹¹⁻¹³. Possivelmente será também a causa responsável, em parte, pela catarata senil e pelo processo de envelhecimento¹⁴⁻¹⁶.

Após a ligação da glucose às proteínas forma-se primeiro a base de Schiff, a qual depois, por um rearranjo dito de Amadori, vai dar origem a uma cetoamina, já irreversível. Se duas cetoaminas reagirem entre si, forma-se um composto tricíclico (2-furanil-4⁵-2-furanil-1H-imidazol) (FFI)¹³.

Este composto é antigénico e verifica-se que os macrófagos têm receptores para eles, conseguindo degradar um grande número destes compostos, que são tóxicos. Com o avanço da idade do indivíduo diminui o número de receptores para o FFI, nos macrófagos^{4,13,14}.

A glicosilação não enzimática das proteínas parece ser responsável também pelo envelhecimento. Afecta todas as proteínas, mas o processo é mais grave para as proteínas de vida longa, devido à formação dos compostos de Maillard tardios. É um processo cumulativo que conduz à lesão celular^{4,14}.

Sabe-se que este processo está ligado às complicações crónicas da diabetes. Todas as proteínas são afectadas, mas a situação é dramática para as proteínas de vida longa^{4,13,14} como as proteínas da mielina, cristalino, elastina e colagénio. O processo contribui para o desenvolvimento da aterosclerose, microangiopatia, neuropatia e catarata, que são precoces nos diabéticos¹²⁻¹⁴.

Segundo alguns autores, as complicações crónicas da diabetes equivaleriam a um envelhecimento acelerado, pois que as suas causas seriam as mesmas^{4,14,15,16}.

As células do SNC têm uma vida prolongada, e inclusive, considera-se que os neurónios não são substituídos.

A glicosilação não enzimática das proteínas faz-se mesmo com concentrações fisiológicas de glicémia. Se as proteínas tiverem vida longa, os produtos resultantes dessa glicosilação, acumulam-se. É o que se passa na catarata senil. Possivelmente as células do SNC, principalmente os neurónios, poderão sofrer com esse processo.

Vlassara em 1983, verifica que tanto a mielina do Sistema Nervoso Central, como a do Sistema Nervoso Periférico é afectada nos diabéticos pelos "advanced glycosylation end products" (AGE).

Estes poderão ser responsáveis pela degenerescência focal e pela fragmentação da mielina cerebral, verificada nos diabéticos com mais de 40 anos¹⁷.

Quando se examinam as proteínas dos cristalinos e o colagénio da dura-mater de indivíduos idosos e de diabéticos, verifica-se que o pigmento escuro detectado por espectroscopia e fluorescência é idêntico aos AGE, preparados *in vitro* por incubação de proteínas ou amino ácidos com glucose.

A acumulação do pigmento fluorescente específico do colagénio da dura-mater é proporcional à idade do indivíduo. Verifica-se que os diabéticos possuem maior acumulação do pigmento do que a esperada para a sua idade. Nestes casos constatou-se que a lipofuscina não é só formada por lípidos oxidados e por proteínas, mas que contém também AGE-proteínas, que não foram digeridas pelos macrófagos^{2,17}.

Nos diabéticos existe uma susceptibilidade para a gravidade das complicações tardias que está relacionada com causas genéticas. A gravidade das lesões além de depender das concentrações de glucose, dependeria também de outros factores, possivelmente falência de sistemas protectores¹⁸⁻²⁰.

A glicosilação não enzimática afecta também o transporte axonal, visto que as tubulinas, após ligação da glucose, ou

de outro açúcar, formam agregados de alto peso molecular. Impede-me o processo normal de polimerização das tubulinas, devido ao facto da glucose ao ligar-se à lisina destas proteínas, impossibilitar a ligação do GTP de que depende a polimerização funcional para dar origem aos microtúbulos^{12,13}. Afecta ainda a função os anti-corpos, conduzindo a uma maior susceptibilidade a infecções²¹.

Conclusões

Existem várias teorias para explicar o envelhecimento. Uma delas invoca a geração de radicais livres como causa principal. Foi Harman quem em 1956 sugeriu que as reacções de radicais seriam a causa do envelhecimento, embora factores genéticos e ambientais pudessem ser modeladores.

A vida dos indivíduos está limitada pelo número de mitoses possíveis das suas células. Se elas já não forem capazes de se dividirem, não são substituídas e os tecidos entram num processo de senescência²².

Existem processos de reparação do DNA que também são afectados pelo avanço da idade²².

Outra teoria invoca a glucose como causa de envelhecimento, devido à glicosilação não enzimática de proteínas^{4,14}.

Com o avanço da idade, existe intolerância à glucose, isto é, resistência à acção da insulina^{24,25}. Também se sabe que com a idade diminui a potência dos sistemas protectores da acção lesiva de radicais de O₂, como sejam os enzimas: Superóxido Dismutase (SOD), Catalase e Peroxidase do Glutatião²⁶.

De acordo com estudos feitos em primatas, sabe-se que a actividade da SOD está relacionada com a longevidade do indivíduo²⁷.

Verifica-se que a autoxidação dos açúcares, incluindo a glucose, gera formas activas de O₂, susceptíveis de induzirem clivagens do DNA^{15,16,28,29}. Esta capacidade é máxima para os aminoaçúcares²⁹. Os compostos de Amadori, também denominados compostos de Maillard precoces são equivalentes a aminoaçúcares. A frutosaamina é o aminoaçúcar que resulta da ligação da glucose à lisina tem a máxima potência nessa clivagem²⁹.

Em trabalhos publicados, verificámos que compostos de Maillard resultantes da glicosilação não enzimática de aminoácidos, assim como aminoaçúcares, incluindo a frutosaamina, reduzem o *Nitro Blue Tetrazolium* (NTB), em meio alcalino. Essa redução era suprimida pela SOD, mas não por neutralizadores do radical hidroxilo, o que nos levou a concluir que os compostos resultantes da glicosilação não enzimática de proteínas geravam radicais de O₂, nomeadamente o radical superóxido^{30,31}.

Paradoxalmente, são precisamente a glucose e o oxigénio, essenciais para o SNC e praticamente todos os tecidos, a causa do envelhecimento, devido à geração de radicais livres e de outros compostos reactivos que conduzem à formação de ligações cruzadas, tanto de proteínas, como de ácidos nucleicos.

Há ainda a salientar que a SOD perde a sua actividade, após ligação da glucose à arginina do centro activo³².

Pela verificação feita por nós de que os compostos de Maillard geram radicais livres de oxigénio, e já confirmada por outros autores³³, será lógico sintetizar as duas teorias para explicar o envelhecimento (radicais livres e glucose) numa só. — A GLUCOSE COMO GERADORA DE RADICAIS LIVRES, após ligação a proteína, será a grande responsável pelo envelhecimento.

BIBLIOGRAFIA

1. BOWEN D.M., DAVID A.N.: Biochemistry of brain degeneration in Davison A.N.: Biochemistry and Neurological Disease, Oxford Blackwell Scientific Publishers, 1976: 2-50.

2. GUTTERIDGE J.M.C.: Age pigments and free radicals: fluorescent lipid complexes formed by iron and copper-containing proteins, *B B Acta*, 1985; 835: 144-148.
3. WOLF S.P., DEAN R.T.: Glucose autoxidation and protein modification: the potential role of *autoxidative glycosylation* in diabetes. *Biochem J*, 1987; 245: 243-250.
4. CERAMI A.: Hypothesis: Glucose as a Mediator of Aging. *J of the Amer Geriatrics Soc*, 1985; 23: 626-633.
5. Introduction. Proceedings of a Conference on Nonenzymatic glycosylation and browning reaction. their relevance to diabetes Mellitus. *Diabetes*, 1982; 31: sup. 3, V-VI.
6. FINOT P.A.: Nonenzymatic browning products: physiologic effects and metabolic transition in relation to chemical structure. *A Review Diabetes*, 1982; 31: sup. 3, 22-28.
7. SALTARCH M., LABUZA T.P.: Nonenzymatic browning via Maillard reaction in foods. *Diabetes*, 1982; 31: sup. 3, 29-36.
8. KAWAMURA S.: Earlier Studies on the Maillard reaction by Japanese scientists in amino-carbonyl reactions in food and biological systems. Fujimaki M., Nami H., Kato H. Tokyo, Elsevier, 1986: 3-13.
9. RAHBAR S.: An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. *Clin Chim Acta*, 1968; 22: 296-298.
10. RAHBAR S., BLUMINFELD O., RANNEY H.M.: Studies of an unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Biochem and Biophys Res Comm*, 1969; 36: 838-843.
11. KOLANA G.B.: Blood Sugar and the complications of Diabetes. *Science*, 1979; 203: 1098-1099.
12. BROWNLEE M., CERAMI A.: The Biochemistry of the complications of Diabetes Mellitus. *Ann Rev of Bioch*, 1981: 50: 385-431.
13. BROWNLEE M., VLASSARA H., CERAMI A.: Nonenzymatic complications. *Annals of Int Med*, 1984; 101: 527-537.
14. CERAMI A., VLASSARA H., BROWNLEE: Glucose and aging. *Scientif Am*, 1987; 256: 82-88.
15. SPECTOR A.: Oxidation and cataract: Human Cataract formation. London, Pitman 1984: 48-64.
16. KADOR P.F., KINOSHITA J.H.: Diabetic and galactosaemic cataracts. *Human Cataract formation*, London, Pit, 1984: 110-151.
17. VLASSARA H., BROWNLEE M., CERAMI A.: Excessive nonenzymatic glycosilation of peripheral and central nervous system. Myelin components in Diabetic rats. *Diabetes*, 1983; 32: 670-674.
18. RASKIN P., ROSENSTOCK J.: Blood glucose control and diabetic complications. *Ann of Int Med*, 1986; 105: 254-263.
19. MINAKES K.L.: Aging and Diabetes Mellitus as risk factors for vascular disease: *The Am J of Med*, 1987; 82: sup. 1B, 47-53.
20. WALSH R.A.: Cardiovascular effects of the aging process. *The Am J of Med*, 1987; 80: sup. 1B, 34-40.
21. KANESHIGE H.: Nonenzymatic glycosylation of serum IgG and its effects on antibody activity in patients with Diabetes Mellitus. *Diabetes*, 1987; 36: 822-828.
22. VIJG J.: DNA repair in relation the aging process. *J Am J Ger Soc*, 1987; 35: 532-541.
23. HARMAN D.: Free radical theory of aging: role of free radicals in the origination and evolution of life, aging and disease processes: Alan R Liss Inc. New York, 1987, in *Free Radicals, Aging and Degenerative Diseases*, pag. 3-49.
24. FINK R.I., OLETSKY J.M.: Effects of aging on glucose—mediated glucose disposal and glucose transport. *J Clin Invest*, 1986; 77: 2034-2041.
25. JACKSON R.A., HAWA M.I., ROSHANA R.D., BUSHRA M.S., DISILVIO L., JASPANI J.B.: Influence of aging on hepatic and peripheral glucose metabolism in humans. *Diabetes*, 1988; 37: 119-129.
26. COHEN G.: Oxidative stress in the Nervous System. *Hemult Sies Ed Acad Press*, 1985, in *Oxidative Stress*, pag. 383-402.
27. TOLMASOFF J.M., ONO T., CUTLER R.G.: Superoxide dismutase: correlation with life span and specific metabolic rate in primate species: *Proc Natl Acad Sci. USA*, 1980; 77: 2777-2781.
28. KASHIMURA N., MORITA J., SATO I., KUMGAWA L., NISHIKAWA S., ITO S., KOMADA M.: DNA cleavage reaction and in vitro virus incubating action of partially substituted reducing sugar derivative. In *Amino Carbonyl Reactions in Food and Biological Systems*. Fujimaki M., Namiki M., Kato H., Tokyo, Elsevier, 1986: 401-410.
29. NANJOU S., FUJI S., TANAKA K., UEDA K., KOMANO T.: Induction of strand breakage in OX 174 DNA by aminosugar derivatives. *Agric Biol Chem*, 1984; 48: 2865-2867.
30. AZEVEDO M., FALCÃO J., RAPOSO J., MANSO C.: Superoxide radical by Amadori Compounds. *Free Radical Research. Free Rad Res Comms*, 1988; 4: 331-335.
31. AZEVEDO M., RAPOSO J., FALCÃO J., FONTES M.F., MANSO C.: Oxygen radicals generation by Maillard Compounds. *Diabetic Complications. J of Diabetic Complications*, 1988; 2: 19-21.
32. ARAIT K., MAGUCHI S., FUJI S., ISHIBASHI H., OIKAWAT K., TANIGUSHI N.: Glycation and inactivation of human Cu-Zn superoxide dismutase—Identification of the in vitro glycated sites. *The J of Biol Chem*, 1987; 262: 16969-16972.
33. SAKURAI T., TSUCHIYA S.: Superoxide production from non enzymatically glycated protein. *Febs Letters*, 1988; 236: 400-410.

Pedido de Separata:
 Maria Azevedo
 Instituto de Química Fisiológica
 Faculdade de Medicina de Lisboa
 1600 Lisboa