

MICROVISCOSIDADE DA MEMBRANA ERITROCITÁRIA, HEMOGLOBINA GLICOSILADA E GLICOPROTEÍNAS SÉRICAS EM DIABÉTICOS NÃO-INSULINO-DEPENDENTES

M. CARLOTA PROENÇA, J. M. MARTINS, J. MARTINS E SILVA

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

RESUMO

Em 24 diabéticos ambulatoriais não-insulino-dependentes de ambos os sexos (10 mulheres e 14 homens), com 58 ± 11 anos de idade média e em 20 controlos saudáveis de idade semelhante foram determinados os valores da glicose plasmática em jejum, hemoglobina glicosilada total (HbA₁), glicoproteínas séricas e microviscosidade da membrana eritrocitária. No grupo de diabéticos observou-se aumento muito significativo ($p < 0,001$) da glicémia, HbA₁ e glicoproteínas séricas e elevação também significativa ($p < 0,01$) para a microviscosidade da membrana. O aumento da HbA₁ dependeria da glicémia ($p < 0,001$) e correlacionava-se com as glicoproteínas séricas ($p < 0,01$). Entretanto não se observou correlação entre a glicémia e os valores das glicoproteínas ou microviscosidade; esta variava negativamente ($p < 0,05$) com a concentração de glicoproteínas séricas e também com a taxa de HbA₁ ($p < 0,01$). Os resultados obtidos parecem confirmar o aumento da glicosilação das proteínas séricas e hemoglobina na diabetes descompensadas, o que talvez possa revelar-se influente no comportamento reológico do sangue ao afectar a microviscosidade da membrana eritrocitária.

SUMMARY

Erythrocyte membrane microviscosity, glycohemoglobin and serum glycoproteins in human diabetes.

Twenty-four non-acidotic, non-insulin-dependent diabetics of both sexes (10 females and 14 males), mean age 58 ± 11 years, and 20 healthy controls of similar ages volunteered for this study. The degree of diabetic control was assessed by fasting plasma glucose and haemoglobin A₁ (HbA₁) levels. Serum glycoproteins (SGP) and red cell membrane microviscosity were also determined. The mean values of glucose, HbA₁ and SGP were all very significantly ($p < 0.001$) elevated. Significantly ($p < 0.01$) higher levels of membrane microviscosity were observed. HbA₁ was highly correlated with glucose ($p < 0.001$) and SGP ($p < 0.01$). No significant correlation existed between glucose and SGP or membrane microviscosity. However, a slight negative correlation ($p = 0.05$) was observed between membrane microviscosity and SGP and also with HbA₁ ($p < 0.01$). These results would confirm the enhanced glycosylation of serum and hemoglobin in uncontrolled diabetes and suggest an interdependence between these variables and red cell membrane microviscosity, perhaps with influence on erythrocyte rheological behaviour.

INTRODUÇÃO

A redução da deformabilidade eritrocitária é uma das alterações hemorreológicas observadas na diabetes mellitus.¹⁻⁵ Entre outros factores, aquela anomalia poderá contribuir para o agravamento da perfusão sanguínea e das trocas de gases e nutrientes a nível da microcirculação.^{1,5}

Observações anteriores têm sugerido que a redução da deformabilidade eritrocitária na diabetes evolui a par da descompensação metabólica incidente.¹

Na diabetes do tipo I, a deformabilidade eritrocitária dependeria mais da carência de insulina do que da hiperglicémia coexistente.⁶ O aumento da viscosidade do núcleo de hidrocarbonetos da membrana eritrocitária poderia ser, também, uma das causas da menor deformabilidade das hemácias em diabéticos.² Estudos recentes tendem a confirmar esta hipótese, ao revelarem um aumento muito significativo da microviscosidade da membrana eritrocitária em doentes com diabetes insulino-dependente e não-insulino-dependente.⁷

Neste trabalho pretende-se relacionar o valor da microviscosidade da membrana eritrocitária com alguns índices de controlo metabólico (designadamente a glicémia, concentração de glicoproteínas séricas e taxa de hemoglobina glicosilada total) em diabéticos não-insulino-dependentes.

MATERIAL E MÉTODOS

Vinte e quatro diabéticos ambulatoriais de ambos os sexos (10 mulheres e 14 homens) com 58 ± 11 ($\pm$ desvio padrão, variação 30-74) anos de idade e 20 controlos saudáveis (8 mulheres e 10 homens) com 55 ± 14 (32-75) anos de idade média deram o seu consentimento para este estudo.

Os doentes, com diabetes não-insulino-dependente e sem sinais de cetoacidose ou outra situação aguda, foram seleccionados com base em valores de glicose plasmática $\geq 6,17$ mmol/l (em jejum em pelo menos duas amostras recentes) e/ou $\geq 10,0$ mmol/l (60 min após prova de sobrecarga com 75 g de glicose).

De cada indivíduo foram colhidos cerca de 40 ml de sangue venoso periférico, entre as 8 e as 10 h da manhã, após uma noite de jejum. Da amostra, parte colhida com anticoagulante, (heparina 12,5 U/ml sangue) e o restante sem anticoagulante, separou-se imediatamente plasma para a determinação da glicemia (método de glicose-oxidase, Sigma Chemical Company n.º 510) e soro para ensaio das glicoproteínas; foram ainda preparados de imediato hemolisados para a determinação da hemoglobina glicosilada total (HbA₁) e separadas membranas eritrocitárias para o estudo de polarização de fluorescência.

A taxa de HbA₁ foi calculada pelo método de Kynoch e Lehmann⁸ até 72 h depois da colheita, com duas modificações adicionais: os hemolisados eritrocitários foram previamente dialisados durante 12 h a 4 °C contra tampão 1 (NaH₂ PO₄ · 2H₂O, pH 6,8), para remoção da fracção lábil da glicosilação⁹ e a eluição com ambos os tampões utilizados, através de microcolunas cromatográficas contendo resina Bio Rex 70 (BIO RAD, 200-400 mesh), foi termoes-tatizada a 22 °C, de acordo com propostas anteriores.¹⁰ Os resultados foram controlados como padrões de HbA₁ (Boehringer Mannheim, GmbH).

O grau de glicosilação das proteínas séricas foi determinado por uma modificação do teste com ácido tiobarbitúrico, desenvolvido por Fluckiger e Winterhalter,¹¹ em que a glicose fixada por mecanismos não-enzimáticos é libertada sob a forma de 5-hidroxitilfurfural (5-HMF) e, deste modo, quantificada colorimetricamente.¹² As amostras de soro foram previamente dialisadas durante 12 h a 4 °C contra solução salina isotónica, para evitar o aumento aleatório das glicoproteínas pela glicose livre. Em alternativa à galactose, utilizada como padrão em trabalhos anteriores,¹³ calculou-se o valor final da glicosilação das proteínas séricas (HMF/mg proteína) com base numa curva de calibração em que se utiliza 5-HMF puro (Sigma Chemical Company) como padrão.¹⁴ A concentração proteica nas amostras de soro dialisado foi medida pelo método de biureto. Utilizou-se um espectrofotómetro Beckman-35 com cuvetes de 10 mm na leitura das absorvâncias finais de todos os ensaios anteriores.

As membranas eritrocitárias foram preparadas segundo o método de Cha et cols.¹⁵ Resumidamente, os eritrocitos foram hemolisados com solução hipotónica (1 mM EDTA, 1 mM Tris. HCl, pH 7,4) a 4 °C, seguindo-se lavagens sucessivas com a mesma solução e, por fim, com solução salina a 2 % e tris-maleato 5 mM, pH 7,4. Na separação das diversas fases a 0 °C foi utilizada uma centrífuga Sorval SS. Do sedimento, constituído por membranas, preparou-se

uma suspensão com a concentração proteica final de 1,2 mg/ml, determinada pelo método de Lowry e col.¹⁶

Os estudos da polarização da fluorescência das membranas eritrocitárias foram realizados segundo o método de Schiliro.¹⁷ Utilizou-se 1,6-difenil 1,3,5-hexatrieno (DPH) como sonda hidrofóbica que tende a fixar-se no sistema de dupla camada lipídica da membrana, e um espectrofluorímetro Perkin-Elmer MPF 44A equipado com registador e acessórios de polarização para as leituras de fluorescência a 352 nm (excitação) e 430 nm (emissão), usando preparações de membranas sem DPH como referência.

Do grau de polarização de fluorescência (p) foi calculado o valor do *equivalente da microviscosidade* (η_r , em poise), pela seguinte equação:¹⁸

$$\eta_r = \frac{2p}{0,46-p}$$

Todas as determinações foram realizadas em duplicado. Os resultados laboratoriais são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, utilizando o teste t de Student e coeficientes de correlação para análise e comparação dos valores de normais e diabéticos, na programação de um microcomputador Sinclair Spectrum 48 K.

RESULTADOS

As idades de normais e de diabéticos não diferiam estatisticamente entre si.

Como pode ser observado na Tabela 1, os valores da glicemia, HbA₁ e glicoproteínas séricas do grupo de diabéticos apresentavam-se acentuadamente ($p < 0,001$) superiores aos do grupo de controlo. A diferença de valores obtidos para as glicoproteínas séricas e os descritos em trabalho anterior do nosso grupo,¹³ duas a três vezes superiores, deve-se à substituição do padrão de galactose pelo 5-HMF.

A microviscosidade da membrana eritrocitária revelou-se também mais elevada ($p < 0,01$) nos diabéticos que nos controlos. Nos diabéticos a glicemia apresentava correlação positiva muito significativa ($r = 0,72$, $p < 0,001$) com os valores de HbA₁, por sua vez correlacionados com as glicoproteínas séricas ($r = 0,44$, $p < 0,01$) e, negativamente, com a microviscosidade ($r = -0,50$, $p < 0,01$); esta variável correlacionava-se também negativamente com as glicoproteínas séricas, ($r = -0,34$, $p < 0,05$). Pelo contrário, as variações da glicemia não se correlacionavam significativamente com as glicoproteínas séricas nem com a microviscosidade da membrana eritrocitária.

TABELA 1 Valores médios ($\pm$ erro padrão da média) da glicose plasmática, hemoglobina glicosilada total (HbA₁), glicoproteínas séricas e microviscosidade do sector lipídico das membranas eritrocitárias em diabéticos não-insulino-dependentes, comparados com um grupo de controlos saudáveis.

	Glicose (mmol/l)	HbA ₁ (%)	Glicoproteínas séricas (mmol HMF/mg proteína)	Microviscosidade (poise)
Controlos Normais	3,88 $\pm$ 0,15 (20)	8,0 $\pm$ 0,3 (20)	0,36 $\pm$ 0,02 (15)	2,92 $\pm$ 0,17 (20)
valor de p	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,01
Diabéticos	10,68 $\pm$ 1,09 (24)	13,0 $\pm$ 0,8 (24)	0,45 $\pm$ 0,02 (22)	3,77 $\pm$ 0,36 (20)

p Indica o significado da diferença entre normais e diabéticos. Entre parêntesis é expressa a dimensão da amostra para cada parâmetro.

DISCUSSÃO

O aumento da glicosilação não-enzimática de alguns constituintes sanguíneos de diabéticos, com destaque para a hemoglobina^{19, 20} e, mais recentemente, para as proteínas séricas,^{12, 14} tem sido referido como um índice de controlo glicídico mais valioso que hiperglicémias isoladas, sobretudo em diabéticos insulino-dependentes.^{14, 19-21} A utilidade clínica daquelas glicoproteínas baseia-se essencialmente na sua estabilidade,¹⁹⁻²³ permitindo uma apreciação dos níveis da hiperglicémia coexistente, não no momento da colheita, mas em períodos reportados às 4-6 semanas (para a HbA_{1c})²⁴ ou 1-2 semanas anteriores (para as glicoproteínas séricas).¹⁴ Nesta perspectiva, os valores obtidos para a HbA_{1c} e glicoproteínas (Tabela 1) assimilariam uma situação de franca descompensação metabólica, já existente nas semanas precedentes; a elevada correlação detectada entre a HbA_{1c} e a glicémia confirmaria a relativa estabilidade da situação metabólica nos diabéticos não-insulino-dependentes, bem patenteada pela estreita correlação entre a glicémia em jejum e os valores integrados de 24 h (75). A manutenção da hiperglicémia a níveis relativamente constantes seria, nos diabéticos do tipo II, um factor predisponente para o aumento da glicosilação proteica, designadamente da hemoglobina e seroproteínas.

Em trabalhos anteriores do nosso grupo, com diabéticos do tipo I e II, já haviam sido assinalados resultados idênticos¹³ aos agora apresentados. Todavia, os valores obtidos para as glicoproteínas séricas eram, nos controlos e diabéticos, superiores aos agora obtidos. Em parte esta diferença deverá ser atribuída ao tipo de padrões utilizados; mesmo assim, os valores do grupo de diabéticos são inferiores aos verificados por Kennedy e cols,¹⁴ em contraste com os normais, que se sobrepõem aos nossos resultados. Relativamente à HbA_{1c}, os níveis observados assemelham-se aos descritos por outros grupos, em condições clínicas e metodológicas equivalentes.^{12, 26}

O aumento observado para a microviscosidade da membrana eritrocitária de diabéticos (Tabela 1) confirma resultados anteriores;^{7, 27} ainda que os valores referidos sejam substancialmente mais elevados que os nossos, quer para os controlos ou diabéticos, essas diferenças podem ser justificadas pelas temperaturas de incubação utilizadas, pois que a 37 °C obtêm-se valores nitidamente inferiores aos registados a 25 °C.¹⁸ Em comparação com a relativa homogeneidade dos valores observados no grupo de diabéticos e controlos^{7, 25} os nossos resultados revelam-se muito mais dispersos no grupo de diabéticos (1,38-8,34 poise), por razões ainda desconhecidas.

A hiperviscosidade da membrana globular tem sido apontada como um dos factores determinantes da diminuição da deformabilidade eritrocitária referida na diabetes.² Em associação com o aumento da viscosidade sanguínea^{28, 29} e e hiperagregação eritrocitária,^{1, 28} a reduzida deformabilidade dos glóbulos vermelhos^{1, 2} estaria envolvida na patogénese da microangiopatia diabética.

As propriedades viscoelásticas da membrana eritrocitária subjacentes à deformabilidade globular são definidas pela resistência ao movimento bidimensional da membrana, dependente da fracção proteica.³⁰ Em contraste, a microviscosidade explicita a difusão tridimensional das moléculas através da dupla camada lipídica da membrana.¹⁸ A hiperviscosidade observada neste estudo e anteriores^{7, 27} deverá ser assim interpretada como o resultado de eventuais alterações de composição lipídica da membrana, que parecem predominar no sector mais hidrofóbico da dupla camada.²⁷ É ainda admissível que o aumento da microviscosidade da mem-

brana possa resultar de outros factores complexos; os valores mais elevados da microviscosidade em diabéticos não-insulino-dependentes, relativamente aos calculados em insulino-dependentes,²⁷ poderá ser atribuída a efeitos da insulina nas propriedades estruturais da membrana.^{31, 32}

A correlação negativa observada neste trabalho entre a microviscosidade da membrana eritrocitária e a taxa de HbA_{1c} ou concentração das glicoproteínas séricas poderia, na mesma ordem de ideias, reflectir os efeitos de hiperglicosilação proteica nas propriedades estáticas e dinâmicas dos componentes lipídicos das membranas eritrocitárias de diabéticos. A natureza da interrelação estrutura-funções da membrana eritrocitária ainda está por definir. Todavia, as alterações da organização molecular daquela estrutura talvez se constituam um factor influente nas anomalias reológicas observadas na diabetes.

AGRADECIMENTOS

Os autores salientam a ajuda relevante do Sr. Carlos Moreira, monitor de Bioquímica, pela preparação e programação da análise estatística e agradecem ao Sr. Chim W. San pelo apoio técnico e a Sra. D. Emília Alves por dactilografar o texto.

Trabalho parcialmente subsidiado pelo INIC, Mbl2.

BIBLIOGRAFIA

- SCHMID-SCHONBEIN, H e VOLGER, E.: Red cell aggregation and red-cell deformability in diabetes. *Diabetes* 1976; 25 (suppl. 2) 897-902.
- McMILLAN, D. E.; UTTERBACK, N. G., e LA PUMA, J.: Reduced erythrocyte deformability in diabetes. *Diabetes* 1978; 27: 895-901.
- KNIGHT, K.; RAMPLING, M. V. e SIRS, J. A.: Erythrocyte flexibility in blood from patients with diabetes mellitus. *Biorheology* 1978; 15: 51-52.
- JUHAN, I.; BUONOCORE, M.; VOVAN, L.; DURAND, F.; CALAS, M. F.; MOULIN, J. P. e VAGUE, P.: Filtrabilité des hématies chez les diabétiques. *Nouv. Presse Méd.* 1979; 8: 4083-4085.
- LEVY-CRUZ, F.; GONZALEZ, M. A.; PROENÇA, M. C.; FREITAS, J. P.; SOUSA-RAMALHO, P. e MARTINS-SILVA, J.: Abnormalities of erythrocyte filterability in diabetic microangiopathy. 1st International Symposium on Erythrocyte Deformability Microcirculation and Vascular Pathology, Lisbon, 13 Nov. 1982; (Proceedings in: *Acta Med. Portuguesa*, 1979; suppl. 4, 83-85).
- VAGUE, P.; JUHAN-VAGUE, I. e MOULIN, J. P.: Evidence for the role of insulin on erythrocyte deformability. Eighteenth Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Budapest, Hungary 1-4 Set. (Abstract 327, In: *Diabetologia* 1982; 23: 151-212).
- BABA, Y.; KAI, M.; KAMADA, T.; SETOYAMA, S. e OTSUJI, S.: Higher levels of erythrocyte membrane microviscosity in diabetes. *Diabetes* 1979; 28: 1138-1140.
- KYNOCH, P. A. M. e LEHMANN, H.: Rapid estimation (2 ½ hours) of glycosylated haemoglobin for routine purposes. *Lancet II* 1977; : 16.
- DODS, R. R. e BOHMEN, C.: Glycosylated haemoglobin assay and oral glucose tolerance test compared for detection of diabetes mellitus. *Clin. Chem.* 1979; 25: 764-768.
- WORTH, R. C.; ASHWORTH, L. A.; BURRIN, J. M.; JOHNSTON, D. G.; SKILLEN, A. W.; ANDERSON, J. e ALBERTI, K. G. M. M.: Column assay of haemoglobin A_{1c}: critical effect of temperature. *Clin. Chim. Acta* 1980; 104: 401-404.

11. FLÜCKIGER, R. e WINTERHALTER, K. H.: In vitro synthesis of hemoglobin A_{1c}. *FEBS Lett* 1976; 71: 356-360.
12. McFARLAND, K. F.; CATALANO, E. W.; DAY, J. F.; THORPE, S.R. e BAYNES, J. W.: Nonenzymatic glycosylation of serum proteins in diabetes mellitus. *Diabetes* 1979; 28: 1011-1014.
13. LEVY-CRUZ, F.; PROENÇA, M. CARLOTA; GONZALEZ, M. ANTONIETA; FREITAS, J. P.; SOUSA-RAMALHO, J. e MARTINS-SILVA, J.: Alterações eritrocitárias e da microcirculação em doentes com diabetes mellitus — Características reológicas, transporte de oxigénio e proteínas glicosiladas (em publicação — 1.º Prémio Ernesto Roma/Boehringer Mannheim 1982).
14. KENNEDY, L.; MEHL, T. D.; RILEY, W. J. e MERIMEE, T. J.: Non-enzymatically glycosylated serum proteins in diabetes mellitus: an index of short-term glycaemia. *Diabetologia* 1981; 21: 94-98.
15. CHA, Y. N.; SHIN, B. C. e LEE, K. S.: Active uptake of Ca²⁺ and Ca²⁺ activated Mg²⁺ ATPase in red cell membrane fragments. *J. Gen. Physiol.* 1971; 57: 202-215.
16. LOWRY, O. H.; ROSEBRAUGH, N. Y.; FAIR, A. C. e RANDALL, R. J.: 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.
17. SCHILIRO, G.; AVITABILE, M.; LI VOLT, S.; BARCELONA, M. L.; SPISNI, A.; GEREMIA, E.; MASOTTI, L.; VANELLA, A. e MOLLICA, F.: Fluorescence studies on erythrocyte membrane from normal and thalassaemic subjects. *IRCS Med. Sc. — Biochemistry* 1981; 9: 599.
18. SCHINITSKY, M. e BARENHOLZ, M.: Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *Biochim. Biophys.*, 1978; Acta 515: 367-394.
19. BUNN, H. F.; GABBAY, K. H. e GALLOP, P. M.: The glycosylation of hemoglobin: relevance to diabetes mellitus. *Science*, 1978; 200: 21-27.
20. GONEN, B. e RUBENSTEIN, A. H.: Haemoglobin A₁ and diabetes mellitus. *Diabetologia*, 1978; 15: 1-8.
21. BODEN, G.; MASTER, R. W.; GORDON, S. S.; SHUMAN, C. R. e OWEN, P. E.: Monitoring metabolic control in diabetic out patients with glycosylated hemoglobin. *Ann. Int. Med.*, 1980; 92: 357-360.
22. DAY, J. F.; THORPE, S. R. e BAYNES, J. W.: Non-enzymatically glycosylated albumin. *J. Biol. Chem.*, 1979; 254: 595-597.
23. DAY, J. F.; THORNBURN, R. W.; THORPE, S. R. e BAYNES, J. W.: Nonenzymatic glycosylation of rat albumin. *J. Biol. Chem.*, 1979; 254: 943-950.
24. KOENIG, R. J.; PETERSON, C. M.; JONES, R. L.; SAUDEK, C.; LEHRMAN, M. e CERAMI, A.: Correlation of glucose regulation and hemoglobin A_{1c} in diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*, 1976; 295: 417-420.
25. HOLMAN, R. R. e TURNER, R. C.: The quest for basal normoglycaemia. *Lancet*, 1977; I: 469-474.
26. KENNEDY, A. L.; KANDEL, T. W. e MERIMEE, T. J.: Serum protein-bound hexose in diabetes. The effect of glycemic control. *Diabetes*, 1979; 28: 1006-1010.
27. OTSUGI, S.; BABA, Y. e KAMADA, T.: Erythrocyte membrane microviscosity in diabetes. In: «*Pathogenic Concepts of Diabetic Microangiopathy*», 1981; E. STANDL e H. MEHNERT (eds), GEORG THIEME VERLAG, Stuttgart New York, p. 97-102.
28. DINTENFASS, L.: Haemorheology of diabetes mellitus. *Adv. Microcirc.*, 1979; 8: 14-36.
29. McMILLAN, D. E.: Plasma protein changes, blood viscosity and diabetic microangiopathy. *Diabetes (suppl. 2)*, 1976; 25: 858-864.
30. CHIEN, S.: Determinants of blood viscosity and red cell deformability. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 40, 1981; (suppl. 156): 7-12.
31. SAUERHEBER, R. D.; LEWIS, U. J.; ESGATE, J. A. e GORDON, L. M.: Effect of calcium, insulin and growth hormone on membrane fluidity, a spin label study of rat adipocyte and human erythrocyte ghosts. *Biochem. Biophys.*, 1980; Acta 597: 292-304.
32. CZECH, M. P.: Insulin action and the regulation of hexose transport. *Diabetes*, 1980; 29: 399-409.

Pedido de Separatas: M. Carlota Proença
 Departamento de Bioquímica
 Faculdade de Medicina de Lisboa
 1600 Lisboa. Portugal.