



**ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS EM SAÚDE**

CÁSSIA CAROLINE DA HORA SOARES

MÉTODOS DE DETECÇÃO DE DIABETES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Salvador
2018**

CÁSSIA CAROLINE DA HORA SOARES

MÉTODOS DE DETECÇÃO DE DIABETES

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Tecnologias em Saúde da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Tecnologias em Saúde. Área de concentração: Tecnologias em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Erlon Araújo Rodrigues.

Coorientador: Prof. Dr. Diego Menezes.

Salvador
2018

Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas

S676 Soares, Cássia Caroline da Hora
Métodos de detecção de diabetes. / Cássia Caroline da Hora. – 2018.
30f.: il. Color; 30cm.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Erlon Araújo Rodrigues
Coorientador: Prof. Dr. Diego Menezes

Mestre em Tecnologia em Saúde.

Inclui bibliografia

1. Aldose redutase. 2. frutosaminas. 3. Hemoglobina glicada. 4. Diabetes mellitus.
I. Título.

CDU: 616.3

CÁSSIA CAROLINE DA HORA SOARES

"MÉTODOS DE DETECÇÃO DE DIABETES E PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA"

Dissertação apresentada à Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Tecnologias em Saúde.

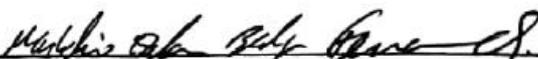
Salvador, 30 de abril de 2018.

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Bruna Aparecida Souza Machado
Doutora em Biotecnologia

Instituto de Tecnologias da Saúde do SENAI CIMATEC, ITS - CIMATEC



Prof. Dr. Marcilio Delan Baliza Fernandes
Doutor em Biologia Celular e Molecular

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, UFRB



Profa. Dra. Sibeles de Oliveira Tozetto Klein
Doutora em Ciências Biológicas

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, EBMS

À minha família, por acreditar e investir em mim – mãe, seu cuidado e dedicação me deram, em momentos decisivos, a esperança para seguir.

Ao meu pai João, cuja presença significou segurança e certeza de que não estou sozinha nesta caminhada.

Ao meu namorado Danilo, por todo incentivo e força.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me ajudar a conseguir avançar em mais uma etapa da minha vida. Sem fé e resiliência, eu não poderia prosseguir.

Aos professores Dr. Luiz Erlon e Diego Menezes, pela oportunidade que me deram.

À minha família, por toda força e encorajamento ao longo da jornada.

“A persistência é o caminho do êxito”.

Charles Chaplin.

RESUMO

Introdução: Diabetes *Mellitus* (DM) é uma doença crônica através da qual o organismo deixa de produzir insulina ou não a utiliza de forma adequada. A hiperglicemia crônica está associada a danos de longo prazo, como disfunção e falência de vários tecidos e órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração, músculo liso, tecido adiposo e vasos sanguíneos. **Objetivo:** Realizar uma revisão narrativa descritiva dos testes utilizados para acompanhamento/diagnóstico de diabetes, propondo a criação de um teste diagnóstico rápido e simples para auxiliar no acompanhamento das complicações secundárias ao diabetes. **Métodos:** Revisão da literatura com base em artigos de língua inglesa, portuguesa e espanhola, publicados entre 1987 e 2018, com ênfase nos atuais testes utilizados para avaliação dos níveis glicêmicos em pacientes diabéticos. **Resultados:** Os exames de dosagem das hemoglobinas glicosiladas ou glicadas (A1C) e das frutosaminas, atualmente em uso corriqueiro na patologia clínica para avaliação dos indivíduos diabéticos, limitam-se a estimar a glicemia dos últimos 20 dias, no caso das frutosaminas, e 120 dias, no caso da hemoglobina glicada. **Conclusão:** O monitoramento dos níveis glicêmicos em pacientes diabéticos é de suma importância para o ajuste da terapêutica e observação das lesões secundárias causadas pela hiperglicemia crônica. Faz-se necessário o desenvolvimento de uma metodologia, teste diagnóstico, mais rápido e simples que possa auxiliar o acompanhamento dos pacientes diabéticos.

Palavras-chave: Diabetes *mellitus*. Hemoglobina glicada. Frutosaminas. Aldose redutase.

ABSTRACT

Introduction: Diabetes Mellitus (DM) is a chronic disease by which the body stops producing insulin or does not use it properly. Chronic hyperglycemia is associated with long term damage such as dysfunction and failure of various tissues and organs, especially eyes, kidneys, nerves, heart, smooth muscle, adipose tissue and blood vessels. **Objectives:** To describe the current scenario of the tests used for diabetes monitoring/diagnosis, proposing the creation of a rapid and simple diagnostic test to assist in the follow-up of complications secondary to diabetes. **Methods:** A literature review was developed based on english, spanish and portuguese articles, published between 1987 and 2018, with emphasis on the current tests used to evaluate glycemic levels in diabetic patients. **Results:** The dosage exams of glycosylated or glycated hemoglobins (A1C) and fructosamines, currently in routine use in the clinical pathology for the evaluation of diabetic subjects, are limited to estimating the glycemia of the last 20 days in the case of the fructosamines, and 120 days, in the case of glycated hemoglobin. **Conclusion:** The monitoring of glycemic levels in diabetic patients is of paramount importance for adjustment of therapy and observation of secondary lesions caused by chronic hyperglycemia. It is necessary to develop a methodology, diagnostic test, faster and simpler that helps the monitoring of diabetic patients.

Keywords: Diabetes mellitus. Glycatedhemoglobin. Fructosamine. Aldose reductase.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1A	Fração Hemoglobina
A1B	Fração Hemoglobina
A1C	Hemoglobina Glicada
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
AR	Aldose Redutase
CO ₂	Gás Carbônico
DCCT	Diabetes Control and Complications Trial
DL	Decilitro
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
GJA	Glicemia de Jejum Alterada
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
KM	Concentração do substrato
LADA	Diabetes latente autoimune no adulto
mg	Miligrama
mM	Milimolar
MODY	Maturity-On set Diabetes of the Young
NM	Nanômetro
NO	Óxido Nítrico
TDG	Teste de Tolerância à Glicose
UKPDS	United Kingdom Prospective Diabetes Study

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	12
2.1	Objetivo geral	12
2.2	Objetivos específicos	12
3	REVISÃO DA LITERATURA	13
3.1	Diabetes <i>mellitus</i> (diabetes/epidemiologia)	13
3.2	Testes laboratoriais mais usados clinicamente no diagnóstico e acompanhamento do diabetes	14
3.2.1	Glicose em jejum	14
3.2.2	Sumário de urina	17
3.2.3	Hemoglobina glicada	17
3.2.4	Frutosaminas	18
3.2.5	Aldose redutase	19
4	METODOLOGIA	21
5	RESULTADOS/DISCUSSÃO	22
5.1	Proposta para detecção da aldose redutase	23
5.1.1	Detecção da aldose redutase	23
5.1.2	Proposta de reagentes utilizados na avaliação da atividade enzimática	23
5.1.3	Técnica proposta para a dosagem da aldose redutase em pacientes diabéticos	24
5.1.4	Cálculo da atividade enzimática	25
6	CONCLUSÃO	26
7	LIMITAÇÕES	27
	REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

Diabetes *mellitus* (DM) é uma doença crônica, em que há insuficiência na produção da insulina ou utilização inadequada desse hormônio pelo organismo. A insulina é produzida pelas células beta, no pâncreas, e sua principal função é regular a quantidade de glicose no sangue⁽¹⁾. Deficiências relacionadas a esse hormônio geram não só hiperglicemias como distúrbios metabólicos nos carboidratos, gorduras e proteínas⁽²⁾. As células beta estão ligadas à patogênese de quase todas as formas de diabetes. A mudança de normoglicemia a hiperglicemia deve-se à morte celular, já que ambos os tipos de diabetes (diabetes tipo 1 e 2) têm como causa principal o desequilíbrio das células beta⁽³⁾.

Segundo a Federação Internacional de Diabetes, estima-se que há 425 milhões de diabéticos em todo o mundo e que, até 2045, esse número, provavelmente, aumentará para 629 milhões de pessoas⁽⁴⁾. A hiperglicemia crônica está associada a danos em longo prazo, como disfunção e falência de vários tecidos e órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração, músculo liso, tecido adiposo e vasos sanguíneos⁽⁵⁾. A hiperglicemia pode causar complicações microvasculares e macrovasculares associadas à reação de Maillard, quais sejam: formação de aldíminas e cetíminas, ativação da biossíntese do sorbitol, aumento de hexosaminas, diferentes isoformas de ativação das proteínas cinases e aumento do estresse oxidativo⁽⁶⁾. A longo prazo, as complicações do diabetes incluem retinopatias, com perda potencial de visão; nefropatias, levando à insuficiência renal; neuropatias periféricas, com risco de úlceras do pé, amputações e elevado risco de problemas cardiovasculares⁽⁷⁾.

Na prática laboratorial, as dosagens das hemoglobinas glicadas (A1C) e das frutosaminas, dosadas no plasma ou soro, têm demonstrado uma alta sensibilidade na avaliação dos pacientes diabéticos, permitindo o acompanhamento das diversas lesões que complicam a doença⁽⁸⁾. A dosagem das glicohemoglobinas, principalmente da HbA_{1c}, indica que, dentro dos três ou mesmo quatro meses passados, os pacientes apresentaram ou não picos hiperglicêmicos⁽⁹⁾. As frutosaminas, mais precisamente as albuminas plasmáticas glicosiladas, quando dosadas e encontradas elevadas, constituem resultados mais precisos, mas, mesmo assim, só indicam que os pacientes tiveram picos hiperglicêmicos dentro dos últimos 20 dias⁽¹⁰⁾.

O objetivo deste trabalho é realizar uma revisão narrativa acerca dos principais métodos de acompanhamento/diagnóstico de diabetes, propondo ainda uma nova metodologia de detecção através da mensuração da enzima aldose redutase. Aldose redutase é uma enzima de resposta rápida, cuja atividade depende da concentração da glicose circulante. Sua dosagem no

sangue permite seguir de perto não só as variações glicêmicas dos pacientes diabéticos como a formação do sorbitol⁽¹¹⁾. O aumento da atividade enzimática permite, por extensão, indicar e acompanhar o desenvolvimento das lesões secundárias que sempre complicam o diabetes e contribuem decisivamente para o agravamento da doença e a diminuição da qualidade de vida dos pacientes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar uma revisão narrativa descritiva do cenário atual dos testes utilizados para acompanhamento/diagnóstico do diabetes.

2.2 Objetivos específicos

Propor a criação de um teste diagnóstico rápido e simples para auxiliar no acompanhamento das complicações secundárias ao diabetes.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Diabetes *mellitus* (diabetes/epidemiologia)

O diabetes é um conjunto de distúrbios metabólicos que tem por consequência a hiperglicemia decorrente dos defeitos na ação da insulina. Os tipos mais comuns de DM são: diabetes tipo 1, causado por deficiência autoimune, no qual as células de defesa do sistema imunológico atacam a produção de insulina (células beta) no pâncreas; diabetes tipo 2, que está presente em cerca de 95% dos casos de diabetes, nos quais a ação e secreção da insulina são afetadas; e diabetes gestacional, que acontece em cerca de 14% das gestantes, caracterizado por qualquer intolerância à glicose, atuando no organismo da mesma forma que o DM tipo 2⁽¹²⁾. Além desses, existem mais dois tipos de diabetes, os quais, apesar de não serem tão conhecidos, têm importância clínica: o diabetes LADA (diabetes latente autoimune no adulto), caracterizado por uma deficiência autoimune (como no diabetes tipo 1) e observado em pacientes com idade superior a 30 anos⁽¹³⁾, e o diabetes tipo MODY (diabetes de início da maturidade dos jovens), de origem familiar, no qual as mutações genéticas afetam a secreção da insulina⁽¹⁴⁾.

DM tipo 1 ocorre em crianças e adultos jovens, tendo como principal característica a insulinoopenia (índices baixos de insulina). A confirmação do diagnóstico ocorre pela presença de autoanticorpos antigênicos específicos que atacam as células produtoras desse hormônio no pâncreas. Já o DM tipo 2 é visto em adultos com idade superior a 30 anos. Apesar de não possuir nenhum marcador específico, esse tipo é observado nos indivíduos com altas taxas dos níveis glicêmicos. Os outros dois tipos comportam-se de forma particular: no diabetes tipo LADA, são encontrados autoanticorpos que atacam as células beta, ocorrendo em indivíduos entre 30-70 anos, e no diabetes tipo MODY é evidenciada a presença de mutações gênicas em 6 genes diferentes, que atuam como fatores de transcrição e codificação^(13,14).

O DM é uma das doenças que mais leva pacientes ao óbito. A Federação Internacional de Diabetes informa que 1 em cada 11 adultos possui diabetes. Estima-se que em 2045 haverá 42 milhões de pessoas com diabetes em toda América do Sul e Central⁴. Segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2012, estimou-se que 3,7 milhões de pessoas no mundo foram a óbito devido ao diabetes ou a complicações secundárias à doença. Diabetes tipo 1 é menos prevalente que diabetes tipo 2, o que se deve a mudanças culturais e sociais da população, tais como: envelhecimento, urbanização crescente, atividades físicas reduzidas, aumento no consumo de carboidratos e baixo consumo de frutas e hortaliças⁽¹⁵⁾.

No Brasil, há mais de 13 milhões de pessoas vivendo com diabetes, número equivalente

a 8,9% da população, entre as quais há uma maior prevalência de mulheres. Em 2017, o Brasil ocupava o terceiro lugar no ranking internacional de diabetes tipo 1 e o quarto lugar dentre os 10 países com maior prevalência de DM tipo 2. Entre as capitais brasileiras, as três com maior número de casos diagnosticados são Rio de Janeiro, Belo Horizonte e Natal. Em Salvador, 8 em cada 100 mil habitantes são diagnosticados com DM, sendo Boa Vista a capital brasileira com o menor índice de indivíduos com diabetes⁽¹⁶⁾.

A prevalência de diabetes praticamente dobrou em todo o mundo entre 1980 e 2014, e um dos maiores fatores de risco associado é a obesidade. A incidência de diabetes na população aumenta as taxas de mortes prematuras, causadas principalmente pelas complicações associadas à doença, dentre elas: cegueira, insuficiência renal, doenças coronarianas e problemas neurais⁽¹⁷⁾. Tanto a hiperglicemia quanto o acúmulo de sorbitol, além do aumento da relação NADH/NAD citoplasmática, desencadeiam lesões na retina, que vão desde a dilatação e hipertrofia das células endoteliais ao aumento da permeabilidade, com grandes exsudatos, oclusões capilares, microaneurismas e hemorragias retinianas, lesões isquêmicas, proliferação vascular, extensas hemorragias intraoculares e edema macular. Altas concentrações plasmáticas de carboidratos, a exemplo da glicose e da frutose, além de polióis, como o iditol e, principalmente, o sorbitol, desencadeiam fenômenos hiperosmóticos intraoculares levando ao glaucoma e à catarata⁽¹⁸⁾.

3.2 Testes laboratoriais mais usados clinicamente no diagnóstico e acompanhamento do diabetes

3.2.1 Glicose em jejum

Os hidratos de carbono são constituídos por oxigênio, carbono e hidrogênio, elementos que atuam como principais fontes de energia, trabalho e movimento nas funções do organismo. A glicose é uma hexose simples (rapidamente absorvida), sendo o único hidrato circulante no sangue⁽¹⁹⁾. A glicose é resumidamente originada de três fontes: digestão de polissacarídeos (amido) e dissacarídeos (lactose, sacarose); da conversão dos ácidos aminados (“blocos” proteicos) e do glicerol (composto orgânico pertencente à função álcool) das gorduras, sobretudo do glicerol; e da hidrólise do glicogênio hepático (principal reserva energética) do fígado, como mostra o Quadro 1⁽²⁰⁾:

Quadro 1 – Obtenção de açúcar

Fonte de alimento	Leite e derivados	Açúcar	Grãos (milho, arroz, trigo)
Monossacarídeos	Glicose + Galactose	Frutose + Glicose	Glicose + Glicose
Polissacarídeos	–	–	Amido
Dissacarídeos	Lactose	Sacarose	Maltose

Fonte: Adaptado de Lima et al.⁽²⁰⁾.

A glicose é a principal fonte de energia das células e tecidos. Os níveis glicêmicos são controlados e regulados por diversos órgãos, tais como: intestino, fígado, pâncreas, músculo esquelético, tecido adiposo e rins. Essa regulação é realizada, quando há exigências metabólicas do corpo⁽²¹⁾, através dos hormônios, sistema nervoso central e periférico. Após a absorção da glicose, não há armazenamento “líquido” desse carboidrato, conseqüentemente a glicose é absorvida pelos tecidos e oxidada em CO₂ ou liberada novamente para a circulação, principalmente como lactato, alanina e glutamina⁽²²⁾.

Os níveis glicêmicos são mantidos pelas interações de diversos hormônios, porém a epinefrina, norepinefrina, o glucagon, os glicocorticoides, o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e o hormônio do crescimento atuam de forma antagônica, elevando a glicemia no sangue. Esses hormônios, que atuam antagonicamente aos níveis glicêmicos, sensibilizam, por sua vez, fígado, rins, tecido adiposo e muscular, alterando o funcionamento das enzimas, o que afeta as reservas de glicogênio e seus precursores. Nessa situação, grande parte da glicose é absorvida em tecidos que não têm necessidade da insulina (cérebro, medula das suprarrenais, trato gastrointestinal). Apesar de a insulina e outros hormônios exercerem uma grande influência na absorção de açúcar no tecido, as alterações na liberação de glicose hepática e renal são importantes⁽²³⁾.

Tabela 1 – Proporção de utilização de glicose em tecidos e órgãos

Tecido/Organismo	Estado pós absorção, ~11.1 umol(Kg min) (principalmente insulina independente)	Estado pós prandial, ~55umol(Kg min) (Principalmente insulina estimulada)
	% do total	% do total
Cérebro	40-45	~10
Músculo	15-20	30-35
Fígado	10-15	25-30
Gastrointestinal (GI) Trato	5-10	10-15
Rim	5-10	10-15
Outros (e.g. pele, sangue, células)	5-10	5-10

Fonte: Gerich⁽²²⁾.

A tabela 1 demonstra a utilização de glicose nos tecidos e órgãos em estado de pós-absorção e pós-prandial. O cérebro é o órgão que mais utiliza a glicose em estados de pós-absorção da insulina, já o músculo, em condições de estímulo, aumenta o uso da glicose como fonte de energia. Nos demais órgãos/tecidos, quase não se altera o percentual de utilização dessa hexose em condições de estímulo pela insulina. As dosagens da glicose são químicas ou enzimáticas. A glicemia em jejum é um exame utilizado para medir os níveis glicêmicos; a taxa de glicose no sangue em paciente em jejum de 8 a 12 horas pode variar entre 60-99 mg/dL. Trata-se do exame mais comumente solicitado na rotina laboratorial, no qual a demonstração de níveis elevados (>125mg/dL) sugere a presença de diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 ou diabetes gestacional⁽²⁴⁾. O aumento da glicose no organismo pode ocorrer de forma silenciosa, e a hiperglicemia é o principal indicativo dessa desordem.

A hiperglicemia ocorre quando há pouca insulina no organismo ou quando ela não é utilizada de forma adequada. Essa desordem é acompanhada de altos níveis de açúcar e corpos cetônicos na urina. Indivíduos considerados pré-diabéticos são aqueles que apresentam uma taxa de glicemia de jejum alterada (GJA) e teste de tolerância à glicose diminuído (TDG). Essas pessoas apresentam riscos comprovadamente maiores de desenvolver DM⁽²⁵⁾.

Na condição do diabético com hiperglicemia crônica, os níveis glicêmicos podem atingir valores muito elevados (até 1000 mg/dL). A hiperglicemia deve ser evitada devido aos problemas microvasculares e macrovasculares originados por ela. Por outro lado, a hipoglicemia também é algo com que se preocupar, pois o jejum prolongado pode prejudicar o cérebro, uma vez que limitações na disponibilidade de combustíveis alternativos ou no

transporte pela barreira hematoencefálica tornam a glicose a fonte de energia usual desse órgão⁽²⁶⁾.

3.2.2 Sumário de urina

Os rins também estão envolvidos na manutenção/regulação da glicose e em anormalidades causadas pelo DM. Essas anormalidades podem atuar em três mecanismos diferentes: liberação de glicose na circulação via glicogênese, absorção de glicose da circulação e reabsorção de glicose do filtrado glomerular na circulação para conservar seu nível glicêmico⁽²⁷⁾.

Glicosúria é o termo dado à presença de glicose na urina. O limiar renal para glicose é de 160mg/dL; acima desse valor, os túbulos renais não conseguem reabsorvê-la através dos glomérulos. Em pacientes diabéticos, é comum a presença de glicose na urina, motivo por que o sumário de urina não serve para diagnóstico/tratamento de DM, embora esse exame seja complementar no diagnóstico da doença. A presença de glicose na urina pode ser revelada de duas formas: pela presença de glicose na “tira reagente” – baseia-se na ação da glicose oxidase, que remove dois hidrogênios da molécula de glicose, combinando-os com oxigênio e produzindo H^2O^2 – ou pela reação de Benedict, em que se mistura o reativo (qualitativo) com a urina, agitando-os na presença de chama (bico de gás ou lamparina). Após a ebulição, desenvolve-se uma coloração (se houver glicose), e o teor de glicose pode ser verificado de acordo com a intensidade da cor azul do precipitado⁽²⁰⁾.

Após um longo período (14-16h), a glicose é liberada na circulação. Por possuir pouco glicogênio e as células renais não serem capazes de sintetizá-lo, o rim não é capaz de liberar glicose através da glicogenólise. O fígado e os rins possuem glicose-6-fosfatase, o que explica o fato de esses órgãos serem capazes de realizar a gliconeogênese⁽²⁸⁾.

3.2.3 Hemoglobina glicada

A dosagem da hemoglobina glicada é necessária para acompanhamento de pacientes diabéticos e para rastreamento da doença sem manifestação clínica. Na prática clínica atual, utilizam-se as dosagens da hemoglobina glicosilada e das frutossaminas como marcadores da evolução e prognóstico da DM.

A hemoglobina glicada (A1C) é derivada de um grupo de substâncias formadas através da hemoglobina e carboidratos. A membrana da hemácia é permeável à glicose, de modo que

aumentos dos níveis glicêmicos no plasma influem na velocidade da biossíntese da A1C⁽²⁹⁾. Os eritrócitos vivem, em média, 120 dias, portanto é possível avaliar picos hiperglicêmicos nos últimos 60 a 90 dias que antecederam a dosagem desse marcador⁽³⁰⁾.

A hemoglobina A é a principal forma estável da hemoglobina no organismo, sendo HbA₀ seu principal componente. Existem subtipos provenientes da hemoglobina A, tais como: A1A, A1B, A1C; dessas frações, a A1C corresponde de fato à hemoglobina glicada, pois um de seus terminais é ligado à glicose⁽³⁰⁾. A partir da pesquisa desenvolvida por dois estudos clínicos – Diabetes Control and Complications Trial (DCCT), em 1993, e United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS), em 1998, ambos os estudos relativos ao DM tipo 1 e 2 –, a dosagem da A1C tornou-se um parâmetro essencial para avaliação do DM. Esses estudos demonstraram que baixos níveis de A1C (>7%) reduzem significativamente as complicações derivadas do diabetes^(31,32). A partir de 2010, as recomendações para diagnóstico de DM foram modificadas: A1C >6,5% e glicose em jejum >200mg/dL indicam diabetes, e indivíduos que apresentassem A1C entre 5,7% e 6,4% tinham grandes riscos de desenvolvimento da doença⁽³³⁾.

A dosagem das hemoglobinas formadas através de A1C é considerada padrão ouro para acompanhamento e controle dos níveis glicêmicos plasmáticos. Alterações vistas nesse marcador indicam alta probabilidade de o indivíduo estar com DM⁽³³⁾.

3.2.4 Frutosaminas

Além da hemoglobina glicosilada, as frutosaminas são utilizadas também como marcadores para acompanhamento dos pacientes diabéticos. Essas proteínas são derivadas de processos que não envolvem a glicólise nem a glicosilação⁽³⁴⁾.

As frutosaminas são a totalidade das proteínas séricas sob a forma de cetosaminas e de derivados de amina ou de acetil de frutosamina³⁵. Essas proteínas surgem de processos não enzimáticos a partir de carboidratos e albumina; são decorrentes de uma modificação pós-tradução, diferentemente do mecanismo envolvido nas glicoproteínas. A dosagem das frutosaminas permite o acompanhamento dos picos hiperglicêmicos em um menor tempo, ao se comparar com a metodologia de dosagem da A1C, pois a estimativa da glicose é mensurada em menor tempo (picos hiperglicêmicos dos últimos 20 dias)⁽³⁶⁾.

As frutosaminas servem como um parâmetro alternativo da automonitoração da glicemia capilar para estimar o controle glicêmico em curto prazo⁽³⁷⁾. Correlacionam-se também com a hiperglicemia pós-prandial e a variabilidade glicêmica⁽³⁸⁾.

O aumento das frutosaminas em pacientes diabéticos é decorrente da formação de

cetoaminas estáveis e reversíveis na presença de hiperglicemia crônica. Assim como a hemoglobina glicada, as frutosaminas são dependentes da concentração de glicose e, como são derivadas de processos não enzimáticos das proteínas séricas (precisamente, albumina), as frutosaminas estimam a glicemia média das últimas três semanas⁽³⁹⁾.

3.2.5 Aldose redutase

Além dos métodos tradicionais para detecção e acompanhamento do DM, é possível acompanhar a evolução das complicações secundárias ao diabetes previamente através da dosagem da enzima aldose redutase (AR), com amostras obtidas através do plasma (uso de anticoagulante) ou soro (livre de aditivos) dos pacientes.

O pesquisador Van Heyningen (1959) descobriu a presença de sorbitol no globo ocular de pacientes diabéticos. O sorbitol é catalisado pela AR, que transforma a glicose em sorbitol, e, juntamente com outra enzima (sorbitol desidrogenase), converte o sorbitol em frutose, constituindo assim a via do polioliol. Esse achado fez com que os cientistas procurassem a ligação entre a enzima AR e o desenvolvimento das complicações do diabetes, uma vez que a reação envolvendo a enzima é efetiva, com a elevação da glicose⁽⁴⁰⁾.

A ligação entre a enzima AR e o diabetes foi observada através das lesões secundárias, por conta da presença da enzima em pacientes que desenvolveram catarata. A terapia convencional, embora utilize insulina para controle do diabetes, não previne as complicações secundárias decorrentes da hiperglicemia crônica⁽⁴⁰⁾. Tanto a hiperglicemia quanto o acúmulo de sorbitol, além do aumento da relação NADH/NAD citoplasmática, desencadeiam lesões na retina que vão desde a dilatação e hipertrofia das células endoteliais ao aumento da permeabilidade, com grandes exsudatos, oclusões capilares, microaneurismas e hemorragias retinianas, lesões isquêmicas, proliferação vascular, extensas hemorragias intraoculares e edema macular. Altas concentrações plasmáticas de carboidratos, a exemplo da glicose e da frutose, além de polióis como o iditol e, principalmente, o sorbitol, desencadeiam fenômenos hiperosmóticos intraoculares, levando ao glaucoma e à catarata⁽⁴¹⁾.

A formação do sorbitol através da aceleração do processo químico da AR está correlacionada ao aumento da glicose intracelular. Dessa forma, há uma maior saturação de polioliol desidrogenase para oxidar o sorbitol em frutose. O sorbitol não passa normalmente pela membrana celular, o que ocasiona o seu acúmulo⁽⁴²⁾. Estudos experimentais em ratos demonstraram que o acúmulo de sorbitol no espaço extracelular está associado a uma depleção de inositol (mioinositol), importante componente dos fosfolipídios das membranas plasmáticas,

principalmente dos nervos e do endotélio vascular. O gasto de NADPH na transformação de glicose em sorbitol compete com a enzima óxido nítrico (NO) sintetase, diminuindo a formação de NO. A redução do óxido nítrico, potente vasodilatador, diminui o fluxo sanguíneo que irriga os nervos, levando a uma isquemia relativa, com alterações da relação NADH/NAD citoplasmática e do estado de óxido-redução celular⁽⁴³⁾.

A AR (estrutura alditol: NADP óxido-redutase, E.C 1.1.1.21) é uma enzima que transforma aldoses, principalmente a glicose e a galactose, em sorbitol e dulcitol, respectivamente. Não apresenta atividade significativa quando dosada no sangue ou nos diferentes tecidos dos indivíduos normais, não diabéticos. Como se trata de uma enzima altamente adaptável, nos pacientes diabéticos que cursam com crises de hiperglicemia, dependente de NADP reduzido, responde com aumento de sua atividade em todos os tecidos, normalmente onde a captação de glicose não depende de insulina, como o tecido nervoso, a retina, o sistema vascular e o glomérulo renal. Neles e nas hemácias em regime de hiperglicemia, 30% da glicose são transformados em sorbitol⁽⁴⁴⁾.

Como a AR é uma enzima de resposta rápida cuja atividade depende da concentração da glicose circulante, sua dosagem no sangue permite seguir de perto não só as variações glicêmicas dos pacientes diabéticos como a formação do sorbitol. O aumento da atividade enzimática permite, por extensão, indicar e acompanhar as lesões secundárias que sempre complicam o diabetes e contribuem decisivamente para o agravamento da doença e a diminuição da qualidade de vida dos pacientes.

4 METODOLOGIA

A revisão da literatura foi realizada por meio de busca nas bases de dados Scielo, Pubmed e Science Direct, nos sites da Sociedade Brasileira de Diabetes, Organização Mundial da Saúde, Ministério da Saúde e Federação Internacional de Diabetes, e em livros, sendo utilizados os seguintes descritores: em português, diabetes *mellitus*, hemoglobina glicada, frutossaminas e aldose redutase, e, em inglês, diabetes *mellitus*, glycated hemoglobin, fructosamine and aldose reductase. Foram utilizados estudos nos idiomas português, espanhol e inglês, entre os anos de 1987 e 2018.

Foram selecionados artigos de revisão, observacionais, experimentais e livros de bioquímica clínica que abordaram o DM, os principais testes utilizados para avaliação dos níveis glicêmicos em pacientes diabéticos e a função enzimática da AR. Foram excluídos resumos e estudos que abordaram o acompanhamento de pacientes diabéticos por outras dosagens, tais como: glicemia média estimada, teste de tolerância e glicose pós-prandial.

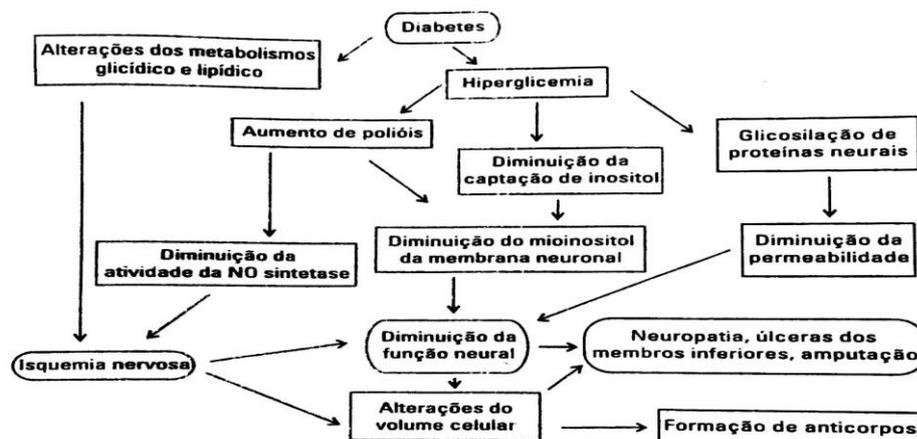
5 RESULTADOS/DISCUSSÃO

A hiperglicemia crônica gera diversas alterações teciduais e estruturais. A síntese da glicose no diabetes é modificada devido às altas taxas no nível dos açúcares, o que supera as taxas fisiológicas. Alguns autores sugeriram que essa síntese ocorre por 3 mecanismos diferentes: o primeiro deles é a via do poliols, na qual a hiperglicemia eleva o fluxo de glicose, induzindo a uma maior taxa de sorbitol, produzindo NADPH, que é consumido pela enzima AR (primeira enzima utilizada nessa via)⁽⁴⁵⁾; o segundo mecanismo proposto é baseado na capacidade de reação química da glicose com proteínas no processo não enzimático de glicação; e o terceiro mecanismo é baseado na deficiência de mioinositol (principal fator de regulação neural), pois o distúrbio no metabolismo do mioinositol e fosfolipídios derivados pode ter ligação com a hiperglicemia, o que compromete o funcionamento neural e axonal⁽⁴⁶⁾.

As referências pesquisadas demonstraram que os exames mais comumente solicitados para diagnóstico do DM são: glicose em jejum, A1C, frutossamina, teste de tolerância à glicose e sumário de urina, evidenciando A1C como teste padrão-ouro para acompanhamento da referida doença. Apesar de existirem diversos exames que auxiliam no diagnóstico do DM, ainda não há uma técnica com maior especificidade e sensibilidade capaz de evidenciar alterações em pacientes diabéticos com hiperglicemia crônica antes do aparecimento das lesões secundárias (como demonstra a figura 1).

Foi desenvolvida ainda uma técnica para mensuração da enzima AR, como proposta para acompanhamento mais preciso dos pacientes que cursam com hiperglicemia crônica antes do desenvolvimento das lesões ligadas ao diabetes.

Figura 1 – Fatores que contribuem para o desenvolvimento de patologias secundárias ao diabetes

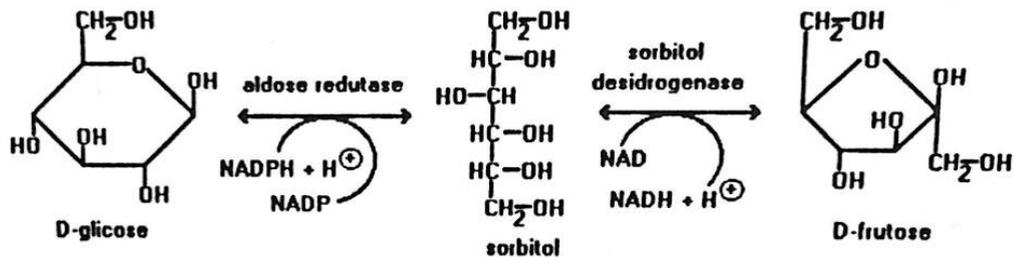


5.1 Proposta para detecção da aldose redutase

5.1.1 Detecção da aldose redutase

A glicose, na presença da enzima aldose redutase, ao ser reduzida, gera sorbitol e dulcitol. As enzimas aldose redutase (estrutura química alditol: NADP óxido-redutase, E.C. 1.1.1.21) e sorbitol desidrogenase (estrutura química L-iditol: NAD óxido-redutase, E.C. 1.1.1.14) transformam a glicose em frutose (demonstrada na figura 2).

Figura 2 – Biossíntese do sorbitol.



Fonte: Rodrigues⁽⁴⁵⁾.

A atividade da AR pode ser medida pelo decréscimo da absorvância em 340nm, que representa a quantidade de NADP reduzido, gasto na redução da D-galactose em dulcitol, em 5 minutos de incubação a 37 °C. Como a AR tem maior afinidade pela D-galactose ($K_m = 20\text{mM}$) que pela D-glicose ($K_m = 70\text{mM}$), aquele açúcar será usado como substrato para a avaliação da atividade enzimática.

Em condições normais, a glicose possui alta afinidade pelas hexocinases (enzima que catalisa ATP) e, ao mesmo tempo, baixa afinidade pela AR, o que conseqüentemente não possibilita a formação de sorbitol. Em condições hiperglicêmicas, a atividade da AR é aumentada e o sorbitol desidrogenase é diminuído, gerando assim acúmulo de sorbitol intracelular⁽⁴⁷⁾.

5.1.2 Proposta de reagentes utilizados na avaliação da atividade enzimática

Para aplicação da metodologia de detecção da enzima AR, é necessário amostra de soro

de pacientes diabéticos e não diabéticos, com idade superior a 18 anos e de ambos os sexos. Os critérios de inclusão das amostras a serem testadas serão: amostras obtidas de punção venosa em tubo sem aditivo e pacientes com histórico de hiperglicemia; e os de exclusão, amostras obtidas através de punção venosa, porém com outros aditivos, e pacientes que cursavam com outras complicações não derivadas do diabetes. Ainda para detecção da enzima AR, seriam necessários os seguintes reagentes:

1. Solução tamponada de TRIS-EDTA-MgCl₂, 56mM, pH 7.4.
2. Solução tamponada de NADP reduzido, 340 µM. 1,0 ml dessa solução distribuído em cada frasco de 2,5 – 3,0 ml de capacidade, liofilizado e marcado como frasco A. Foi demonstrada, por meio de fluorescência, a maior afinidade da AR ao NADPH do que ao NADP, indicando assim a presença dessa enzima no metabolismo redutivo⁽⁴⁸⁾.
3. Solução concentrada de D-galactose, 50mM. Distribuir 1,0 ml dessa solução em cada frasco de 2,5 – 3,0 ml de capacidade, e, após liofilização, ele será marcado como frasco B.

5.1.3 Técnica proposta para a dosagem da aldose redutase em pacientes diabéticos

Para dosagem da AR nos soros dos pacientes, foi desenvolvida uma técnica para a qual seriam necessários as amostras, reagentes, banho-maria e um espectrofotômetro, seguindo os seguintes procedimentos:

1. Juntar 1 mL de água destilada em cada um dos frascos liofilizados, A (solução tamponada de NADP) e B (solução concentrada de D-galactose), agitando até completa dissolução dos seus conteúdos.
2. Adicionar o conteúdo de um deles no outro (denominado frasco C). Dessa maneira, nos dois mililitros resultantes, o substrato da AR, a D-galactose, fica na concentração final de 25mM (450 mg/dL), e sua coenzima, o NADP reduzido, na concentração de 170mM, dissolvidos na solução tamponada TRIS-EDTA-MgCl₂, 28 mM, pH 7.4.
3. Incubar esse frasco a 37 °C durante 5 minutos. Acrescentar 50 µL do soro ou plasma e, imediatamente, ler a densidade óptica em 340nm, depois de ajustar (calibrar) o espectrofotômetro para 100% de transmissão com água destilada. Anotar a absorbância correspondente ao tempo zero.
4. Incubar a 37 °C durante 5 minutos, e, de imediato, ler e anotar a nova absorbância correspondente ao tempo citado.

5.1.4 Cálculo da atividade enzimática

Para obtermos o valor da atividade da AR, expressa em micromoles de substrato reduzido por minuto, elaboramos a seguinte fórmula:

$$U/g = \frac{\Delta D.O/\text{min}}{6.3 \times 10^{-3}} \times \frac{2.050}{0,05}$$

min = tempo de incubação;

6,3 x 10⁻³ = coeficiente de extinção micromolar do NADP reduzido a 340 nm;

Δ D.O = diferença entre os valores de absorvância dos tempos zero e 5 minutos;

2.050 = volume total do meio de incubação;

0,05 = volume da amostra plasmática ou sérica.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo teve o objetivo de realizar uma revisão narrativa acerca dos métodos de detecção do DM, propondo ainda uma metodologia para a mensuração da enzima AR (proposta pela técnica descrita no capítulo 5), evidenciando que esta pode ser uma alternativa para acompanhar mais precisamente os pacientes diabéticos. A presença dessa enzima foi demonstrada em estudos anteriores através de técnicas de imunohistoquímicas em ratos. Nenhuma dosagem foi vista em seres humanos, a partir das lesões secundárias à citada doença. A prospecção tecnológica demonstrou ainda mais a importância de se criar um novo kit para detecção/acompanhamento da doença, já que as pesquisas existentes encontram-se apenas no âmbito de inibição da enzima e não detecção.

Para auxílio no acompanhamento dos pacientes diabéticos, faz-se necessária a mensuração da enzima aldose redutase no sangue, para um controle mais preciso desses pacientes que cursam com hiperglicemia. Dessa forma, há possibilidade de prever, e até mesmo conter, as lesões secundárias ocasionadas pela citada doença.

7 LIMITAÇÕES

A proposta da técnica de dosagem da aldose redutase sérica/plasmática não foi testada, devido à insuficiência de recursos financeiros para a compra da enzima catalisadora (NADPH), que é de suma importância para demonstrar a presença da enzima aldose redutase. A prospecção após teste da técnica é a produção de um kit rápido e simples para dosagem da enzima nos pacientes hiperglicêmicos. Há, ainda, a possibilidade de comparações desse método com o que é utilizado como padrão-ouro (A1C).

REFERÊNCIAS

1. Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD). O que é diabetes? 2017 [acesso em 20 abr 2018]. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/publico/diabetes/>.
2. Mancia SR, Trujillo J, Chaverri JP. Utility of curcumin for the treatment of diabetes mellitus: Evidence from preclinical and clinical studies. *J Nutr Intermed Metab*. 2018; 1-13.
3. Sara HA et al. 12-Lipoxygenase and Islet β -Cell Dysfunction in Diabetes. *Mol Endocrinol*. 2015; 29(6): 791-800.
4. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. 2017 [acesso em 20 abr 2018]. Disponível em: <http://www.diabetesatlas.org/>.
5. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Position statement. *Diabetes Care*. 2004; 27(supl. 1): S4-10.
6. Van BT et al. Improved fluorimetric enzymatic sorbitol assay in human blood. *Clin Chim Acta*. 1998; 273: 171-184.
7. Marziani G et al. Alteraciones glucémicas en los pacientes con enfermedad renal crónica Glycaemic changes in patients with chronic kidney disease. *Soc Esp Nefr*. 2016; 36(2): 133-140.
8. Lee JE et al. The Ratio of Estimated Average Glucose to Fasting Plasma Glucose is Superior to Glycated Albumin, Hemoglobin A1c, Fructosamine, and GA/A1c Ratio for Assessing β -Cell Function in Childhood Diabetes. *Biomed Res Int*. 2014; (2): 1-8.
9. Makris K, Spanou L. Is There a Relationship between Mean Blood Glucose and Glycated Hemoglobin? *J Diabetes Sci Technol*. 2011; 5(6): 1572-1583.
10. Kohnert K et al. Utility of different glycemic control metrics for optimizing management of diabetes. *World J Diabetes*. 2015; 6(1): 17-29.
11. Sekiguchi K et al. Aldose reductase inhibitor ranirestat significantly improves nerve conduction velocity in diabetic polyneuropathy: a randomized double-blind placebo-controlled study in Japan. *J Diabetes Investig*. 2018 jul 5.
12. Alam U et al. General aspects of diabetes mellitus. *Handb Clin Neurol*. 2014; 126: 211-22.
13. Guelho D, Paiva I, Carvalheiro M. Diabetes mellitus – um «continuum» fisiopatológico. *Rev Port Endocrinol Diabetes Metab*. 2013; 8(1): 44-49.
14. Oliveira C, Furuzawa G, Reis A. Diabetes Mellitus do tipo MODY. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2002; 46(2): 186-192.
15. Organização Mundial da Saúde (OMS). Relatório Global do Diabetes. 2016 [acesso em

- 22 abr 2018]. Disponível em: <http://www.who.int/diabetes/publications/grd-2016/en/>.
16. Ministério da Saúde (MS). *Vigitel Brasil 2016*. 2016 [acesso em 22 abr 2018]. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/abril/17/Vigitel.pdf>.
 17. Casos de diabete no mundo quadruplicam entre 1980 e 2014. O Estado de São Paulo [online]. 6 abr 2016 [acesso em 20 abr 2018]; Saúde. Disponível em: <https://saude.estadao.com.br/noticias/geral,numero-de-casos-de-diabete-no-mundo-quadruplica-entre-1980-e-2014,10000025194>.
 18. Head KA. Natural therapies for ocular disorders. Part two: Cataracts and glaucoma. *Altern Med Rev*. 2001; 6(2): 141-166.
 19. Souza L. Hidratos de carbono. *Brasil Escola* [acesso em 04 abr 2018]. Disponível em: <https://brasilecola.uol.com.br/quimica/hidratos-carbono.htm>.
 20. Lima AO et al. *Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica – Técnica e Interpretação*. 8 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2001. p. 10-13.
 21. Universidade Federal do Rio Grande. *Regulação da Glicose no Corpo*. Disponível em: http://www.numeb.furg.br/index.php?option=com_content.
 22. Gerich JE. Physiology of glucose homeostasis, *Diabetes Obes Metab*. 2000; 2(6): 345-350.
 23. Gerich JE. Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications. *Diabet Med*. 2010; 27(2): 136-142.
 24. The Expert Committee on The Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Follow-up Report on the Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2003; 26(11): 3160-3167.
 25. Souza CF et al. Pré-diabetes: diagnóstico, avaliação de complicações crônicas e tratamento. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2012; 56(5): 275-284.
 26. Ferreira LT et al. Diabetes melito: hiperglicemia crônica e suas complicações. *Arq Bras Ciên Saúde*. 2001; 36(3): 182-188.
 27. Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD). *Diabetes e doença renal crônica*. 2014 [acesso em 05 mai 2018]. Disponível em: <https://www.diabetes.org.br/publico/artigos-sobre-diabetes/59-diabetes-e-doenca-renal-cronica>.
 28. Landau BR et al. Contributions of gluconeogenesis to glucose production in the fasted state. *J Clin Invest*. 1996; 98: 378-385.
 29. Sumita NM, Andriolo A. Importância da determinação da hemoglobina glicada no monitoramento do paciente portador de diabetes mellitus. *J Bras Patol Med Lab*. 2006; 42(3): 185-191.

30. Netto PA et al. Atualização sobre hemoglobina glicada (HbA_{1C}) para avaliação do controle glicêmico e para o diagnóstico do diabetes: aspectos clínicos e laboratoriais. *J Bras Patol Med Lab.* 2009; 45(1): 31-48.
31. DCCT Research Group. Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1993; 329: 977-986.
32. UK Prospective Diabetes Study Group. Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. *Lancet.* 1998; 352(9131): 837-853.
33. Chacra AR. Qual é o real valor da dosagem da hemoglobina glicada (A1C)? *J Bras Pato Med Lab.* 2008; 44(3): 0-0.
34. Fujinomoto CY et al. Correlação das dosagens de frutossamina e de hemoglobina glicosilada com o perfil glicêmico em gestantes com diabetes mellitus. *Rev Bras Ginec Obst.* 2016; 38: 20-26.
35. Agneray J et al. *Biochimie Clinique.* 2 ed. França: Editora SIMEP; 1988. p. 67-68.
36. Armbruster DA. Fructosamine: structure, analysis, and clinical usefulness. *Clin Chem.* 1987; 33(12): 2153-2163.
37. Koga M, Kasayama S. Clinical impact of glycated albumin as another glycemic control marker. *Endocr J.* 2010; 57(9): 751-762.
38. Chon S et al. Evaluation of glycemic variability in well-controlled type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Technol Ther.* 2013; 15(6): 455-460.
39. Youssef D et al. Fructosamine: an under utilized tool in diabetes management: case report and literature review. *Tenn Med.* 2008; 101(11): 31-33.
40. Dvornik A. *Aldose Reductase Inhibitors. Hyperglycemia in the Pathogenesis of Diabetic Complications.* New York: Biomedical Information Corporation; 1987. p. 222-324.
41. Yan L. Redox imbalance stress in diabetes mellitus: Role of the polyol pathway. *Animal Model Exp Med.* 2018; 1: 7-13.
42. Dvornik A. *Aldose Reductase Inhibitors. Hyperglycemia in the Pathogenesis of Diabetic Complications.* New York: Biomedical Information Corporation; 1987. p. 70-154.
43. Kihara M et al. Effect of zenarestat, an aldose reductase inhibitor, on endoneurial blood flow in experimental diabetic neuropathy of rat. *Neurosc Lett.* 2001; 310: 81-84.
44. Shinohara R et al. Improved fluorimetric enzymatic sorbitol assay in human blood. *Clin Chim Acta.* 1998; 273: 171-184.
45. Rodrigues LE. Metabolismo dos polióis no diabetes. *Boletim da SBEM;* 1999.

46. Pedrosa H. Neuropatia diabética periférica. In: Pedrosa H. Diabetes na prática clínica [online]. 2014 [acesso em 20 abr 2018]. Disponível em: www.diabetes.org.br/ebook/component/k2/item/39-neuropatia-diabetica-periferica.
47. Kador P et al. Effect of sorbitol dehydrogenase inhibition on sugar cataract formation in galactose-fed and diabetic rats. *Exp Eye Res.* 1998; 67: 203-208.
48. Vander DL et al. Substrat especificity of human aldose reductase: identificati on of 4-hydroxynonenal as na endogenous substrate. *Biochim Biophys Acta.* 1995; (2): 117-126.