



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Utilização da espectroscopia de fluorescência para mensuramento de
moléculas autofluorescentes em indivíduos diabéticos**

CINTHIA ZANINI GOMES

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientadora:
Profa. Dra. Maria Helena Bellini**

**São Paulo
2011**





AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Utilização da espectroscopia de fluorescência para
mensuramento de moléculas autofluorescentes em
indivíduos diabéticos**

CINTHIA ZANINI GOMES

**Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear – Aplicações.**

Orientadora: Prof. Dr. Maria Helena Bellini

São Paulo

2011

DEDICATÓRIA

À minha família

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde e por todas as oportunidades e pessoas maravilhosas colocadas em meu caminho.

À minha família, pela força, compreensão, carinho, dedicação, por acreditar sempre em mim e não me deixar desistir.

Aos meus amigos, próximos e distantes, pelas risadas, desabafos e companheirismo.

A todos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, aos que já passaram e aos que permanecem, e aos colaboradores por compartilhar dúvidas, problemas, conselhos e soluções.

À Dra Maria Helena Bellini pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

Ao Seu Pedro por nos levar e trazer sempre com gentileza, educação e bom humor. Que esteja em paz.

A todos os voluntários participantes deste estudo pela confiança na seriedade deste trabalho e pela contribuição ao avanço da ciência.

A todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Utilização da espectroscopia de fluorescência para mensuramento de moléculas autofluorescentes em indivíduos diabéticos

Cinthia Zanini Gomes

RESUMO

Diabetes Mellitus (DM) é uma síndrome metabólica complexa, causada pela secreção diminuída ou ausente de insulina pelas células beta pancreáticas, levando a hiperglicemia. A hiperglicemia promove a glicação de proteínas e, conseqüentemente, o aparecimento de produtos finais da glicação avançada (AGEs). Atualmente, os pacientes diabéticos são monitorados pela determinação dos níveis de glicemia e hemoglobina glicada (HbA1c). As complicações geradas pela hiperglicemia podem ser divididas em micro e macrovasculares, representadas por retinopatias, nefropatias, neuropatias e doenças cardiovasculares. A albumina (HSA) é a proteína sérica mais abundante no organismo humano e está sujeita à glicação. A protoporfirina XI (PpIX) é a molécula precursora da síntese do heme, componente estrutural da hemoglobina. Ensaios *in vitro* e em animais indicaram que a hiperglicemia promove uma diminuição de sua concentração em eritrócitos. A espectroscopia de fluorescência é uma técnica bastante utilizada na área biomédica. A autofluorescência corresponde à fluorescência intrínseca presente em algumas moléculas, estando esta associada à estrutura das mesmas. O objetivo deste trabalho foi utilizar a técnica de espectroscopia de fluorescência para mensurar os níveis de autofluorescência da PpIX eritrocitária e AGE-HSA em pacientes diabéticos e indivíduos saudáveis e compará-los com os níveis de glicemia e HbA1c. Este estudo foi realizado com 151 indivíduos (58 controles e 93 diabéticos). Os dados epidemiológicos de pacientes e controles foram obtidos nos prontuários médicos. Para os indivíduos controle, os valores de glicemia foram adquiridos dos prontuários médicos e os níveis de Hb1Ac obtidos pela utilização de kits comerciais. A determinação da autofluorescência da PpIX foi realizada com excitação de 405 nm e emissão de 632 nm. Para a determinação do AGE-HSA foi realizada excitação de 370 nm e emissão de 455 nm. Aproximadamente 50% dos diabéticos apresentaram lesões micro ou macrovasculares decorrentes da hiperglicemia. Não foram observadas diferenças significativas nos valores de intensidade de emissão de PpIX entre os grupos estudados ($P=0,89$). Na análise do AGE-HSA observou-se diferenças significativas dos valores de intensidade de emissão entre os dois grupos, sendo este valor 1,45 vezes maior para o grupo de indivíduos diabéticos ($P<0,0001$). Os pacientes com complicações diabéticas apresentavam intensidade de emissão de fluorescência 1,19 vezes maior que os indivíduos sem complicações decorrentes da doença ($P= 0,01$), mesmo não havendo diferenças significativas nos valores de HbA1c entre os dois grupos. Concluímos que a espectroscopia de fluorescência foi uma técnica eficaz na identificação da autofluorescência da PpIX e do AGE-HSA. A PpIX não foi um biomarcador eficiente para o acompanhamento do DM. A determinação dos níveis de autofluorescência do AGE-HSA foi eficiente para a discriminação entre os grupos e para o monitoramento da progressão da doença, podendo ser mais eficiente que a dosagem de HbA1c. A espectroscopia de fluorescência é uma técnica simples, rápida e de baixo custo para o acompanhamento de indivíduos diabéticos.

Palavras-chave: PpIX, AGE-HSA, Espectroscopia de fluorescência, Complicações diabéticas.

Use of fluorescence spectroscopy to measure molecular autofluorescence in diabetic subjects

Cinthia Zanini Gomes

ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM) comprises a complex metabolic syndrome, caused by reduced or absent secretion of insulin by pancreatic beta cells, leading to hyperglycemia. Hyperglycemia promotes glycation of proteins and, consequently, the appearance of advanced glycation end products (AGEs). Currently, diabetic patients are monitored by determining levels of glucose and glycated hemoglobin (HbA1c). The complications caused by hyperglycemia may be divided into micro and macrovascular complications, represented by retinopathy, nephropathy, neuropathy and cardiovascular disease. Albumin (HSA) is the most abundant serum protein in the human body and is subject to glycation. The Protoporphyrin IX (PpIX) is the precursor molecule of heme synthesis, structural component of hemoglobin. The *in vitro* and animals studies have indicated that hyperglycemia promotes a decrease in its concentration in erythrocytes. The fluorescence spectroscopy is a technique widely used in biomedical field. The autofluorescence corresponds to the intrinsic fluorescence present in some molecules, this being associated with the same structure. The aim of this study was to use fluorescence spectroscopy to measure levels of erythrocyte PpIX autofluorescence and AGE-HSA in diabetic and healthy subjects and compare them with levels of blood glucose and HbA1c. This study was conducted with 151 subjects (58 controls and 93 diabetics). Epidemiological data of patients and controls were obtained from medical records. For control subjects, blood glucose levels were obtained from medical records and levels of Hb1Ac obtained by using commercial kits. The determination of the PpIX autofluorescence was performed with excitation at 405 nm and emission at 632 nm. Determination of AGE-HSA was performed with excitation at 370 nm and emission at 455 nm. Approximately 50% of diabetic had micro and macrovascular lesions resulting from hyperglycemia. There were no significant differences in the PpIX emission intensity values between groups ($P = 0.89$). In the analysis of AGE-HSA was observed significant differences in the values of emission intensity between the two groups, and this value was 1.45-fold greater for the group of diabetic ($P < 0.0001$). Patients with diabetic complications had fluorescence emission intensity of 1.19-fold higher than individuals without disease complications ($P = 0.01$), even with no significant differences in HbA1c values between the two groups. We conclude that fluorescence spectroscopy was an effective technique in the identification of the PpIX autofluorescence and AGE-HSA. The PpIX was not an effective biomarker for the monitoring of diabetes. The determination of AGE-HSA autofluorescência was efficient for the discrimination between groups and monitoring disease progression, may be more effective than HbA1c dosage. The fluorescence spectroscopy is a simple, fast and low cost for the monitoring of diabetic patients.

Keywords: PpIX, AGE-HSA, Fluorescence spectroscopy, Diabetes complications.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Diabetes Mellitus	13
1.2 Produtos Finais da Glicação Avançada (AGEs)	17
1.3 Protoporfirina IX	22
1.4 Autofluorescência	23
1.5 Espectroscopia de Fluorescência	26
2. OBJETIVO	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Recrutamento de Indivíduos diabéticos e controles saudáveis	29
3.2 Coleta de Amostras	29
3.3 Processamento das Amostras	29
3.4 Extração da PpIX	30
3.5 Determinação do AGE-HSA	30
3.6 Análise espectroscópica das amostras de PpIX e AGE-HSA	30
3.7 Obtenção de espectro de fluorescência padrão da PpIX	31
3.8 Preparação do AGE-BSA	31
3.9 Preparação de curva padrão da BSA	31
3.10 Determinação de Hemoglobina Glicada (Hb1Ac)	31
3.10.1 Reação	32
3.11 Obtenção dos valores de glicemia	32
3.12 Análises Estatísticas	32
4. RESULTADOS	34
4.1 Análise espectroscópica da PpIX	37
4.2 Análise espectroscópica do AGE-HSA	38
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Prevalência mundial do DM no ano 2000 e estimativa para 2030_____	15
Tabela 2 - Valores de glicose plasmática utilizados para diagnóstico do DM, tanto para o teste de glicemia de jejum quanto para o TOTG_____	17
Tabela 3 - Comprimentos de onda de excitação e emissão de fluoróforos endógenos_____ _____	26
Tabela 4 - Idade média e distribuição dos sexos nos grupos diabético e controle _____ _____	34
Tabela 5 - Dados epidemiológicos dos indivíduos diabéticos_____	35
Tabela 6 - Medicamentos utilizados para controle hiperglicêmico no grupo de indivíduos diabéticos_____	36
Tabela 7 - Medicamentos utilizados pelos indivíduos do grupo diabético_____	37
Tabela 8 - Comprimentos de onda de excitação e emissão para moléculas de AGE-BSA e AGE-HSA _____	45
Tabela 9 - Tempo e custo estimado para realização de diferentes métodos laboratoriais_____	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formação da base Schiff e do produto de Amadori _____	18
Figura 2 - Reação de Maillard e formação dos AGEs _____	19
Figura 3 - Estrutura molecular dos AGEs Pentosidina, CML e Pirralina _____	19
Figura 4 - Estrutura da molécula de albumina _____	21
Figura 5 - Molécula da porfirina (A) e da PpIX (B) _____	22
Figura 6 - Espectro eletromagnético da luz _____	24
Figura 7 - Estrutura molecular dos aminoácidos Triptofano (A), Tirosina (B) e Fenilalanina (C) _____	25
Figura 8 - Esquema geral de funcionamento de espectrofotômetro de fluorescência que utiliza lâmpada de xenônio como fonte de excitação _____	27
Figura 9 - Mediana dos valores de glicemia do grupo diabético e controle _____	35
Figura 10 - Medianas dos valores de HbA1c do grupo diabético e controle _____	36
Figura 11 - Perfil do espectro de fluorescência de 100 ng/ml de PpIX sintética (Sigma) _____	37
Figura 12 - A: Mediana das intensidades de emissão da PpIX no grupo diabético e controle; B: Espectro de autofluorescência da PpIX no grupo diabético (I) e controle (II) _____	38
Figura 13 - A: Espectro de emissão da lâmpada de xenônio. B: Espectro de emissão da cubeta de quartzo com PBS (I), com água Milli Q® (II), e espectro de emissão da BSA (III) em concentração de 50 mg/ml _____	39
Figura 14 - Espectro de fluorescência do BSA (A) e do AGE-BSA (B) _____	39
Figura 15 - Curva padrão da BSA. I: Espectro de fluorescência da BSA em diferentes concentrações. II: Dados analisados no programa Excel 2007. A: 6,25 mg/ml; B: 12,5 mg/ml; C: 25 mg/ml; D: 50 mg/ml _____	40
Figura 16 - A: Mediana das intensidades de emissão do AGE-HSA no grupo diabético e controle. B: Espectro de autofluorescência do AGE-HSA no grupo diabético (I) e controle (II) _____	41
Figura 17 - A: Medianas de intensidade de emissão do AGE-HSA dos indivíduos diabéticos com e sem complicações e controles. (B): Mediana do valor de HbA1c de indivíduos diabéticos com e sem complicações e controles _____	42

LISTA DE ABREVIATURA

AGE-BSA	Produto final da glicação avançada – albumina sérica bovina
AGE-HAS	Produto final da glicação avançada – albumina sérica humana
AGEs	Produtos finais da glicação avançada (do inglês - <i>Advanced glycation end-products</i>)
ALA	Ácido gama-aminolevulínico
AVC	Acidente vascular cerebral
BSA	Albumina sérica bovina (do inglês - <i>Bovin serum albumin</i>)
CEL	Carboxietilisina
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CML	Carboximetilisina
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DOGDIC	Ligação cruzada imidazolina derivada de 3-deoxiglicosona
DOLD	Dímero de lisina e 3-deoxiglicosona
DP	Desvio padrão
EUA	Estados Unidos da América
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
GALA	Ácido glioxílico lisina amida
GODIC	Ligação cruzada imidazolina derivada de glioxal
GOLA	Glioxal lisina amida
GOLD	Dímero de glioxal-lisina
HbA	Hemoglobina A
HbA1c	Hemoglobina glicada
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance (do inglês - <i>High-performance liquid chromatography</i>)
HSA	Albumina sérica humana (do inglês - <i>Human serum albumin</i>)
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
LED	Diodo emissor de luz (do inglês - <i>Light-emitting diode</i>)

MCPS	Milhões de contagens de fótons por segundo
MODIC	Ligação cruzada imidazolina derivada de metil glioxal
MODY	do inglês - <i>Maturity Onset Diabetes of the Young</i>
MOLD	Dímero de metilglioxal-lisina
N	Número de indivíduos
NADPH	Nicotinamida adenina difosfato
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
PA	Para análise
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês - <i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PKC	Proteína quinase C
PpIX	Protoporfirina IX
RI	Resistência à insulina
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês - <i>Reactive oxygen species</i>)
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
ZnPpIX	Zinco protoporfirina IX

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
O_2^-	Radical superóxido
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
OH^-	Radical hidroxil
mg/dl	Miligramas por decilitro
g	Gramas
h	Horas
<	Menor
>	Maior
kDa	Quilo Daltons
mg/ml	Miligramas por mililitro
α	Alfa
FM	Frequência modulada
TV	Televisão
AM	Amplitude modulada
nm	Nanômetros
λ	Comprimento de onda
ν	Frequência
cm	Centímetros
ml	Mililitro
°C	Graus Celsius
g	Força centrífuga relativa
μ l	Microlitros
®	Marca registrada
mm	Milímetros
μ m	Micrometros
W	Watts
ng/ μ l	Nanogramas por microlitro
mg	Miligramas
g/L	Gramas por litro
mmol/L	Milimol por litro

±	Mais ou menos
P	Significância estatística
$\bar{x} \pm DP$	Média mais ou menos desvio padrão
ng/ml	Nanogramas por mililitro
R\$	Reais

1. INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM) corresponde a uma complexa síndrome metabólica, causada pela secreção diminuída ou ausente de insulina ou pela diminuição da sensibilidade dos tecidos a mesma (1).

Disfunções na produção ou absorção da insulina pelos tecidos vão levar a dificuldades no metabolismo de lipídeos, carboidratos e proteínas gerando hiperglicemia crônica, freqüentemente associada à dislipidemia, hipertensão arterial e disfunção endotelial (1).

Os danos celulares causados pela hiperglicemia irão ocorrer nas células que não possuem habilidade para reduzir o transporte de glicose para seu interior, como as células endoteliais e mesangiais, fazendo com que a concentração interna de glicose fique bastante elevada, levando ao estresse oxidativo, responsável pelo desencadeamento dos danos (2).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes, 2006, o DM pode ser classificado como (3):

- DM tipo 1: doença auto-imune órgão específica, causada pela destruição seletiva das células beta pancreáticas. É considerada uma das doenças crônicas mais comuns em crianças e adolescentes (4). Seu aparecimento está ligado a fatores hereditários, sendo que fatores ambientais, como infecções virais, introdução de glúten e leite de vaca precocemente na dieta, toxinas e estresse emocional, podem contribuir para o desenvolvimento desta patologia (5). A suscetibilidade genética para o desenvolvimento do DM tipo 1 varia de acordo com a etnia dos indivíduos. Sabe-se que indivíduos caucasianos apresentam maior suscetibilidade para o desenvolvimento da doença, sendo as regiões da Finlândia e Sardenha (Itália) os locais de maior prevalência mundial. Países Asiáticos e Sul Americanos apresentam as menores taxas de desenvolvimento da doença (6).
- DM tipo 2: causado por produção insuficiente de insulina pelas células beta pancreáticas e resistência à insulina (RI) pelos tecidos alvo (7), caracterizando 90% a 95% dos casos de diabetes.

O surgimento do DM tipo 2 irá ocorrer apenas em indivíduos que desenvolvem tanto RI quanto defeitos nas células beta pancreáticas, e embora ainda haja alguns debates a respeito de qual seria o evento inicial no desenvolvimento da doença, estudos confirmam que o surgimento da RI antecede os defeitos das células beta, sendo a anormalidade inicial desta patologia (8). É considerado um dos maiores problemas de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento, estando associado, principalmente, ao estilo de vida – dieta, sedentarismo e estresse (9). A suscetibilidade de desenvolver o DM tipo 2, assim como ocorre no DM tipo 1, também varia de acordo com a etnia, sendo canadenses e índios americanos as populações mais propensas a desenvolver a doença (10).

- DM gestacional: corresponde a qualquer alteração na tolerância à glicose com início ou diagnóstico no período da gestação, ocorrendo, assim como no DM tipo 2, devido à produção insuficiente de insulina pelas células beta pancreáticas e resistência à insulina pelos tecidos alvo (3). Geralmente após o período de gestação o quadro de diabetes tende a ser revertido, porém faz-se necessário a reavaliação dessas mulheres de quatro a seis semanas após o parto para verificar se realmente houve o desaparecimento da doença (11).
- Outros tipos específicos de DM: correspondem a casos de DM menos frequentes onde a causa pode ser identificada, incluindo defeitos genéticos nas células beta ou na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, entre outros (3). Dentro dessa classificação destaca-se o diabetes MODY (do inglês – *Maturity Onset Diabetes of the Young*), que corresponde a um tipo de diabetes monogênico, ou seja, causado por mutações em um único gene, decorrente de herança autossômica dominante (12), que se caracteriza por uma forma leve de DM (hiperglicemia leve e assintomática), não dependente de insulina, acometendo, geralmente, indivíduos não obesos e com forte histórico familiar de DM tipo 2 (envolvendo no mínimo três gerações) (3, 13).

Segundo Wild S e colaboradores, 2004, a alta prevalência do DM está relacionada com o crescimento e envelhecimento populacional, urbanização, e aumento da prevalência de obesidade e sedentarismo. A TABELA 1 mostra a prevalência do DM no ano de 2000 e a estimativa para o número de indivíduos acometidos no ano de 2030, em diversos países (14).

TABELA 1 - Prevalência mundial do DM no ano 2000 e estimativa para 2030 (14).

	2000	2030
Países	Número de indivíduos diabéticos (milhões)	
Índia	31,7	79,4
China	20,8	42,3
EUA	17,7	30,3
Indonésia	8,4	21,3
Japão	6,8	8,9
Paquistão	5,2	13,9
Brasil	4,6	11,3
Bangladesh	3,2	11,1
Mundial	171,2	366,2

Os danos causados pela presença do diabetes podem ser divididos em micro e macroangiopáticos (ou micro e macrovasculares) (15). A hiperglicemia aparece como fator determinante para o aparecimento de complicações micro e macrovasculares e a resistência à insulina desempenha importante papel no desenvolvimento de complicações macrovasculares (16).

Atualmente quatro hipóteses são aceitas para explicar os danos micro e macrovasculares causados pela hiperglicemia (2):

- Aumento da ativação da via dos poliois: A glicose intracelular aumentada é convertida em sorbitol, que se acumula no interior das células levando ao aumento da suscetibilidade ao estresse oxidativo intracelular (17).
- Aumento da formação de AGEs: os produtos finais da glicação avançada (do inglês *advanced glycation end-products* – AGEs), levam a modificações nas proteínas intracelulares, na matriz extracelular e em proteínas circulantes no sangue (2). Os AGEs serão vistos em maior detalhe mais adiante.

- Ativação da proteína quinase C (PKC): a hiperglicemia leva ao aumento da produção de diacilglicerol que ativa diversas isoformas da PKC levando a anormalidades no fluxo sanguíneo e na permeabilidade vascular, além de causar vasoconstrição (18).
- Aumento da ativação da via da hexosamina: a glicose intracelular em excesso é metabolizada pela via da hexosamina que tem como produto substâncias que modulam proteínas que agem como fatores de transcrição, alterando a expressão de diversos genes (17).

Todas as vias citadas vão levar ao surgimento de estresse oxidativo devido à super produção de espécies reativas de oxigênio (ROS - do inglês *reactive oxygen species*), representadas por radicais superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (OH^-), capazes de danificar lipídeos, proteínas e DNA (15).

As principais complicações microvasculares desencadeadas pela hiperglicemia ocorrem na retina, nas células mesangiais dos glomérulos renais, nos neurônios e nas células dos nervos centrais e periféricos, causando retinopatia, nefropatia e neuropatia central e periférica respectivamente (18).

Os danos macrovasculares gerados pelo DM correspondem às lesões causadas às células do endotélio arterial, levando a complicações cardiovasculares como aterosclerose e acidente vascular cerebral (AVC) (2, 15).

O diagnóstico do diabetes é realizado pela dosagem de glicemia, por coleta de sangue venoso após jejum de 8 a 12 horas. O limite máximo da normalidade da glicemia de jejum atualmente utilizado corresponde a 99 mg/dl, sendo que valores entre 100 e 125 mg/dl caracterizam o quadro de pré-diabetes (19), que corresponde a um estado intermediário entre o normal glicêmico e o DM (3).

Além da glicemia de jejum, realiza-se também o teste oral de tolerância à glicose (TOTG), para obtenção da confirmação do diagnóstico. Este teste consiste em uma coleta de sangue após jejum de 8 a 12 horas, seguida de administração de 75 g de glicose e posteriores coletas, a cada meia hora, num período que varia de duas a quatro horas (20).

A TABELA 2 trás os valores de glicose plasmática utilizados para diagnóstico do DM, segundo a *American Diabetes Association*, 2003, tanto para o teste de glicemia de jejum quanto para o TOTG (19).

TABELA 2 - Valores de glicose plasmática utilizados para diagnóstico do DM, tanto para o teste de glicemia de jejum quanto para o TOTG (19).

Categoria	Jejum (8 h)*	2h após ingestão de 75 g de glicose*
Normal	<100	<140
Pré-diabetes	de 100 a 125	de 140 a 200
Diabetes mellitus	>125	>200

*Unidade: mg/dl

Após o diagnóstico, é preciso que se faça um acompanhamento do indivíduo para monitorar os níveis glicêmicos. Este acompanhamento é realizado pela dosagem de hemoglobina glicada (HbA1c) (21). A HbA1c corresponde ao produto da reação irreversível de ligação da hemoglobina A (HbA) com moléculas de açúcar (3).

A dosagem de HbA1c se mostra bastante eficiente para monitoramento do DM, pois sua porcentagem varia de acordo com a concentração de glicose sanguínea, permitindo que se possa verificar os níveis glicêmicos do indivíduo nos últimos três meses, que corresponde ao tempo médio de vida do eritrócito. Quanto maior for a concentração de glicose sanguínea, maior será a porcentagem de HbA1c, sendo que valores até 6,2% são considerados normais (20) e valores acima de 7% estão relacionados com o aumento progressivo do risco de desenvolvimento de complicações crônicas (3). Sua dosagem deve ser rotineira, realizada pelo menos duas vezes por ano no indivíduo diabético para que se possa avaliar o grau de controle glicêmico nesses indivíduos (22).

Os métodos laboratoriais mais comuns para mensurar a HbA1c correspondem a imunoensaios e ensaios de cromatografia. Esses métodos são caros e complexos, necessitando de equipamentos específicos, diversos reagentes e uso intensivo de mão de obra, acarretando em baixo grau de reprodutibilidade. Frente a esta problemática, torna-se necessário o desenvolvimento de uma técnica mais simples e de menor custo para o acompanhamento dos indivíduos diabéticos (22).

1.2 Produtos Finais da Glicação Avançada (AGEs)

Os produtos finais da glicação avançada (AGEs – do inglês *advanced glycation end-products*) correspondem a um complexo grupo de moléculas produzidas a partir de reações não enzimáticas de açúcares com lipídeos, aminofosfolipídeos, proteínas, ou ácidos nucleicos (23).

Sua formação ocorre através da reação de Maillard, também conhecida como glicação. A reação de Maillard inicia-se com a condensação do grupo carboxila de um açúcar (como a glicose) com um grupo amina proveniente de uma proteína, lipídeo ou ácido nucléico, formando a base de Schiff. Por ser muito instável a base de Schiff sofre rearranjos formando os produtos de Amadori, que possuem grupos carbonilas reativos (23, 24). A FIGURA 1 mostra simplificada a formação da base de Schiff e do produto de Amadori.

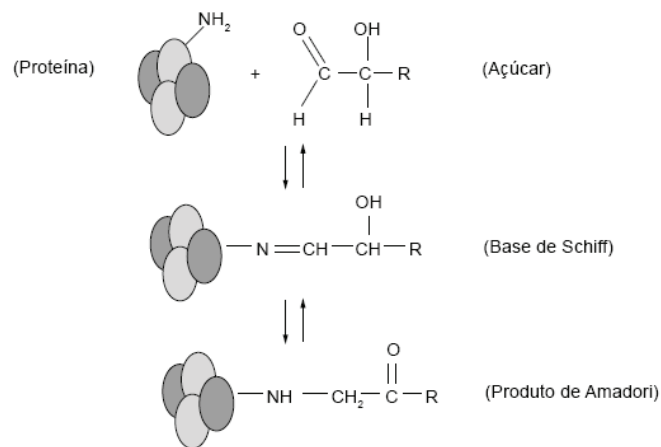


FIGURA 1 - Formação da base Schiff e do produto de Amadori (22).

Os grupos carbonilas reativos dos produtos de Amadori se condensam com aminas primárias dando origem aos AGEs. A hemoglobina glicada e a frutossamina representam os produtos de Amadori mais conhecidos (23, 24). A FIGURA 2 trás a reação de Maillard, mostrando a formação dos AGEs.

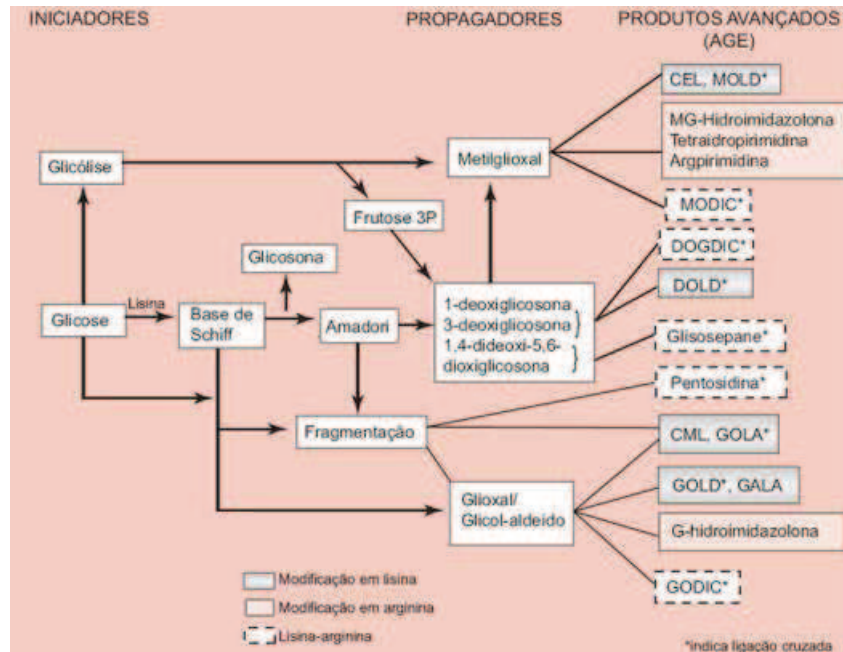


FIGURA 2: Reação de Maillard e formação dos AGEs. CML: carboximetilisina; CEL: carboxietilisina; DOGDIC: ligação cruzada imidazolina derivada de 3-deoxiglicosona; DOLD: dímero de lisina e 3-deoxiglicosona; GOLA: glicoxal lisina amida; GOLD: dímero de glicoxal-lisina, GALA: ácido glicólico lisina amida; GODIC: ligação cruzada imidazolina derivada de glicoxal; MODIC: ligação cruzada imidazolina derivada de metil glicoxal; MOLD: dímero de metilglicoxal-lisina (25).

Por formar um grupo complexo e heterogêneo de moléculas, apenas alguns AGEs são claramente identificados, sendo a carboximetilisina (CML), a pentosidina e a pirralina os AGEs melhor caracterizados (26). A FIGURA 3 mostra a estrutura molecular desses AGEs.

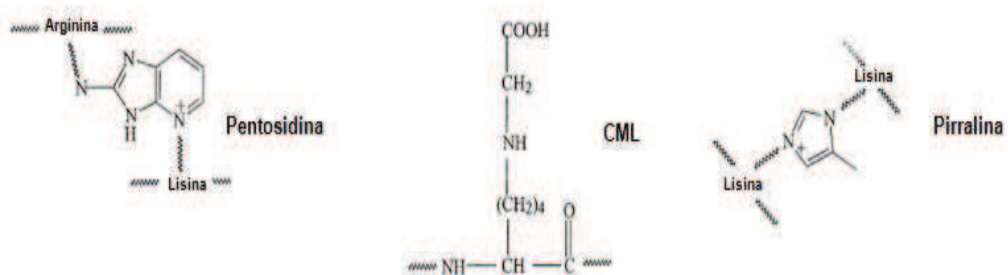


FIGURA 3 - Estrutura molecular dos AGEs Pentosidina, CML e Pirralina (24).

As moléculas atualmente conhecidas podem ser classificadas como fluorescentes ou não fluorescentes, dependendo da estrutura molecular de cada AGE formado, estando esta característica relacionada com a presença de anéis aromáticos (27, 28).

Sua formação é, em maior parte, um processo endógeno, porém essas moléculas também podem ser introduzidas no organismo de maneira exógena, através da alimentação e do fumo. Alimentos ricos em lipídeos e carboidratos são a principal fonte exógena de AGEs e métodos de preparo utilizando altas temperaturas e baixa umidade, como fritar, grelhar ou assar, podem potencializar a formação dessas substâncias (29).

Em relação ao fumo, os AGEs são produzidos e volatilizados pela combustão do tabaco e são absorvidos pelos pulmões, podendo reagir com proteínas séricas (25).

Sob condições fisiológicas a formação de AGEs é um processo lento que afeta, geralmente, moléculas de meia vida longa, como componentes da membrana basal e componentes estruturais da matriz extracelular (24), porém em situações de hiperglicemia essa formação aumenta significativamente (2).

Atualmente se conhece três mecanismos de danos causados pelos AGEs às células, representados por (24, 25, 30):

- Modificação de estruturas intracelulares: A formação intracelular de AGEs pode levar a alterações genômicas, devido a interações com nucleotídeos, histonas ou proteínas envolvidas na transcrição gênica. Os danos causados ao DNA correspondem a quebras de fita dupla, prejudicando a integridade do material genético.
- Interação com proteínas da matriz extracelular e membranas basais: a formação de AGEs compromete a conformação geométrica das proteínas da matriz, diminuindo a solubilidade e digestibilidade enzimática, levando a anormalidades estruturais e funcionais irreversíveis. Propicia alterações na membrana basal, além de levar a diminuição da adesão das células endoteliais à matriz. As principais moléculas afetadas pela formação de AGEs incluem colágeno, elastina, mielina, tubulina, fibrinogênio e laminina, mostrando sua relação com o processo de envelhecimento e rigidez da vasculatura.
- Modificação de proteínas e lipídeos sanguíneos: a modificação dessas proteínas pode levar a produção de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, desencadeando alterações vasculares.

Dentre as proteínas presentes no organismo passíveis a glicação, pode-se citar a albumina (HSA – do inglês *human serum albumin*), proteína sérica de baixo peso molecular (67 kDa) mais abundante (aproximadamente 40 mg/ml) nos seres humanos (31, 32). Ela é responsável pela manutenção da osmolaridade do plasma e dos fluidos intersticiais, transporte de substâncias, além de apresentar ação antioxidante (33). A HSA apresenta cadeia única com 585 resíduos de aminoácidos, três domínios homólogos (I, II e III), e uma estrutura helicoidal. Possui ainda um resíduo de triptofano, relacionado com as características fluorescentes da molécula (31). Sua forte tendência à glicação se deve a presença de resíduos de lisina e arginina. A FIGURA 4 mostra a estrutura da molécula de albumina (32).

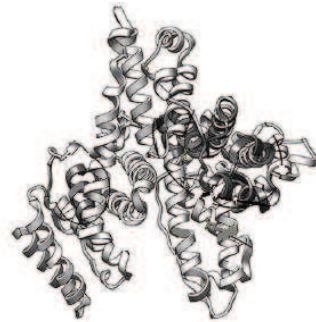


FIGURA 4 - Estrutura da molécula de albumina (32).

Durante o processo de glicação a molécula sofre alterações ou perda na sua estrutura helicoidal e diminuição do número de α -hélices. (33). Novas alterações estruturais, pela reação com grupos amina, vão originar o AGE-HSA.

O AGE-HSA apresenta características fluorescentes devido às alterações moleculares causadas pelos rearranjos (31), e quanto maior o grau da modificação da molécula, maior será a fluorescência por ela emitida (34).

Em indivíduos adultos saudáveis, cerca de 10% da HSA aparece glicada. Este valor pode ser aumentado de 2 a 3 vezes em condições hiperglicêmicas, fazendo com que a HSA glicada seja um bom marcador para o monitoramento da hiperglicemia a curto prazo (de 2 a 4 semanas) (35).

Diversos estudos, *in vitro*, utilizam a albumina sérica bovina (BSA – do inglês *bovin serum albumin*) para simular o processo fisiopatológico da formação do AGE-HSA (36), devido à similaridade da BSA com a albumina humana (37). Para esta análise realiza-se a indução do processo de glicação pela incubação de BSA com glicose em elevadas temperaturas por um período de tempo que

pode variar entre 6 e 12 semanas, gerando a BSA glicada, que sofre novos rearranjos formando o AGE-BSA (38).

O aumento dos níveis de AGE-HSA pode levar ao surgimento de espécies reativas de oxigênio intracelular que ativam uma cascata de sinalização culminando na ativação de fatores de transcrição, que levam ao desencadeamento de processos inflamatórios. Todo este processo está diretamente relacionado com o surgimento de danos microvasculares, como retinopatias, nefropatias e neuropatias (32).

Por se relacionar com o surgimento de complicações decorrentes do diabetes, a mensuração dos níveis de AGE-HSA se faz útil para acompanhamento da progressão da doença (39). Apesar de não haver um método universalmente aceito (30), sua mensuração pode ser realizada por HPLC, espectroscopia de massa, testes imunoreativos ou espectroscopia de fluorescência (25).

1.3 Protoporfirina IX

Porfirinas correspondem a compostos que possuem anéis orgânicos heterocíclicos, conhecidos como porfinas (40, 41), que aparecem como unidades centrais de diversas moléculas, como a hemoglobina, clorofila e vitamina B₁₂, tendo altas taxas de fotoatividade e fotoreatividade (41, 42).

O ácido 1,3,5,8-tetrametil-2,4-divinilporfina-6,7-dipropiônico, também chamado de protoporfirina IX (PpIX) (42), compreende uma porfirina precursora da síntese do heme, componente estrutural da hemoglobina (43). A FIGURA 5 mostra as moléculas de porfirina e PpIX.

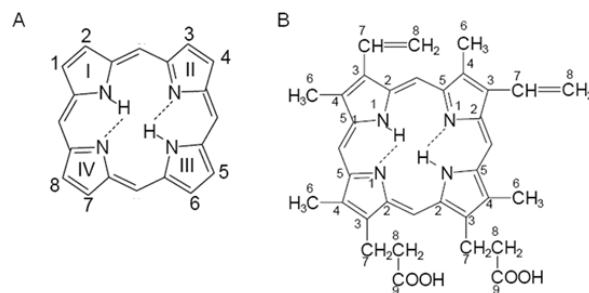


FIGURA 5 - Molécula da porfirina (A) e da PpIX (B) (42).

A formação da PpIX se inicia dentro da mitocôndria, onde a união do aminoácido glicina com o intermediário do ciclo de Krebs succinil-CoA forma o ácido gama-aminolevulínico (ALA). Essa reação ocorre na presença da enzima ALA-sintetase e do cofator piridoxina (vitamina B₆). No citoplasma, duas moléculas de ALA se unem para formar o porfobilinogênio. Quatro moléculas do porfobilinogênio se unem para formar a uroporfirinogênio III e esta sofre descarboxilação para formar a coproporfirinogênio III. De volta à mitocôndria, a coproporfirinogênio III é convertida em protoporfirinogênio IX e posteriormente em protoporfirina IX (44). Através da ação da enzima ferrocatalase uma molécula de ferro é inserida a molécula da PpIX, convertendo-a em heme (45).

Normalmente, uma pequena porção da PpIX escapa deste processo e pode ser encontrada nos eritrócitos na forma livre ou ligada a outros metais, como o zinco (ZnPpIX), que representa um quelante alternativo, sendo também introduzido na molécula pela enzima ferrocatalase (45). Em indivíduos adultos saudáveis pode-se encontrar uma proporção de aproximadamente 50 moléculas de ZnPpIX para cada 1×10^6 moléculas de heme presentes no sangue (46).

A síntese do heme ocorre nos eritroblastos, eritrócitos imaturos ainda na medula óssea e no fígado, e alterações durante sua formação podem levar a prejuízos na célula madura. Metabolismo anormal da PpIX eritrocitária tem sido observado em diversas doenças como o câncer, envenenamento por chumbo, anemia por deficiência de ferro e porfirias agudas (43).

Além das desordens citadas, estudo *in vitro* realizado por Doss M e colaboradores, 1981, utilizando cultura de células de fígado aviárias, mostrou que o aumento da glicose pode causar diminuição da biossíntese do heme pela inibição da enzima ALA sintetase e diminuição da síntese de protoporfirina (47).

Recentemente, estudo *in vivo*, utilizando camundongos onde se induziu diabetes pelo uso da estreptozotocina, mostrou que nos camundongos diabéticos havia diminuição significativa dos níveis de PpIX em relação aos camundongos saudáveis, utilizando a técnica de espectroscopia de fluorescência.

1.4 Autofluorescência

Defini-se por fluorescência a emissão de luz por diversas moléculas, que ocorre em estágios eletronicamente excitados. Corresponde a uma categoria de luminescência com excitação no estágio singleto, onde o elétron excitado está

emparelhado com um elétron em estado fundamental. Este emparelhamento permite que o elétron excitado retorne para o seu estado fundamental, ocorrendo emissão de um fóton (48).

O processo de excitação se dá pela iluminação da molécula com luz (ultravioleta ou visível). Esta luz é absorvida, levando a molécula a um maior nível de energia vibracional. No processo de emissão ocorre a perda desta energia absorvida, fazendo com que a molécula volte para seu estado fundamental de energia vibracional (48).

Os processos de absorção e emissão da luz ocorrem em escala de tempo muito maior (10^{-15} segundos) que os processos vibracionais, fazendo com que a energia de emissão da molécula seja menor que a energia absorvida, sendo, portanto o comprimento de onda de excitação menor do que o comprimento de onda de emissão (49).

Na FIGURA 6 pode-se observar o espectro eletromagnético da luz, mostrando a relação entre os comprimentos de onda de excitação e emissão com a faixa de cores da luz visível (50).

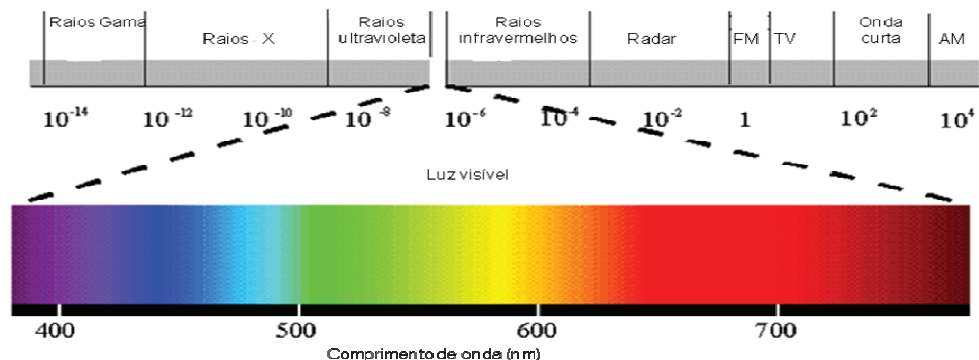


FIGURA 6 – Espectro eletromagnético da luz (50).

O espectro eletromagnético representa o conjunto de todas as ondas vibracionais elétricas e magnéticas que se propagam no ar (51), ordenando as diferentes radiações de acordo com seus comprimentos de onda. A região correspondente a luz visível inclui comprimentos de onda que vão de 400 nm a 700 nm, contendo neste intervalo, as radiações correspondentes a todas as cores que o olho humano consegue identificar (52).

Moléculas que interagem com a luz recebem o nome de cromóforos, que possuem a capacidade de influenciar diretamente na emissão de fluorescência. Os três principais tipos de cromóforos encontrados são representados por (53):

- Fluoróforos: moléculas que absorvem a luz e a transformam em fluorescência.
- Absorvedores: moléculas que absorvem a luz, porém não a transformam em fluorescência.
- Espalhadores: moléculas que modificam a direção do fóton com o qual interagem, sem modificar seu comprimento de onda.

As características fluorescentes das substâncias vão depender da concentração e distribuição dos fluoróforos presentes e das propriedades ópticas do solvente em que as moléculas estão dissolvidas. A concentração e distribuição de moléculas absorvedoras e espalhadores pode afetar a propagação da luz, influenciando na amplitude do sinal fluorescente (54).

Os fluoróforos são representados por moléculas aromáticas, apresentando fluorescência típica. Essas moléculas podem ser divididas em dois grupos: fluoróforos intrínsecos, (ou ainda autofluorescentes ou endógenos), representados por aqueles que ocorrem naturalmente; e extrínsecos (ou exógenos), sendo aqueles adicionados a uma amostra que não possui características espectrais desejáveis (48).

Diversas moléculas biológicas apresentam fluoróforos endógenos (49) sendo esta característica relacionada com a estrutura das mesmas (presença de anéis aromáticos). Os principais aminoácidos com características fluorescentes são representados pelo triptofano, tirosina e fenilalanina (55). A FIGURA 7 mostra a estrutura molecular desses aminoácidos.

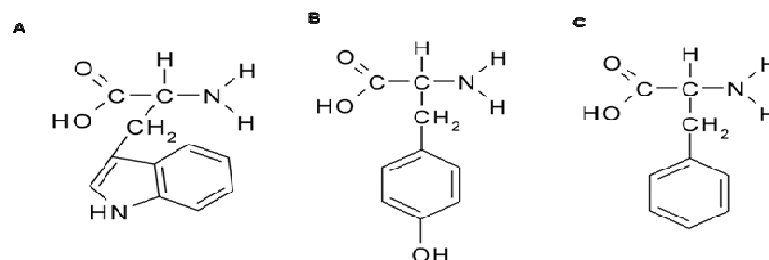


FIGURA 7 - Estrutura molecular dos aminoácidos Triptofano (A), Tirosina (B) e Fenilalanina (C) (55).

A TABELA 3 mostra as diversas moléculas autofluorescentes presentes no organismo com seus respectivos comprimentos de onda de excitação e emissão (49, 54). Cada molécula apresenta um comprimento de onda de excitação e emissão específico, permitindo sua identificação (54).

TABELA 3 - Comprimentos de onda de excitação e emissão de fluoróforos endógenos (54).

Fluoróforos Endógenos	Excitação (nm)	Emissão (nm)
Aminoácidos		
Triptofano	280	350
Tirosina	275	300
Fenilalanina	260	280
Proteínas Estruturais		
Colágeno	325	400, 405
Elastina	290, 325	340, 400
Enzimas e Coenzimas		
FAD, flavinas	450	535
NADH	290, 351	440, 460
NADPH	336	464
Vitaminas		
Vitamina A	327	510
Vitamina K	335	480
Vitamina D	390	480
Componentes da Vitamina B6		
Piridoxina	332, 340	400
Piridoxamina	335	400
Piridoxal	330	385
Ácido piridóxico	315	425
Piridoxal 5-fosfato	330	400
Vitamina B12	275	305
Lipídeos		
Fosfolipídeos	436	540, 560
Lipoficsina	340-395	540, 430-460
Ceroides	340-395	430-460, 540
Porfirinas		
	400-450	630, 690

1.5 Espectroscopia de Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência, que se baseia na detecção da emissão de fótons (53) é, atualmente, uma das técnicas mais utilizadas na área biomédica para determinação da energia absorvida e emitida por diversas moléculas (54).

A FIGURA 8 mostra o esquema geral de funcionamento de um espectrofotômetro de fluorescência que utiliza lâmpada de xenônio como fonte de excitação. A amostra é colocada no equipamento, que emite luz num determinado comprimento de onda, específico para a molécula que se quer analisar. Antes de atingir a amostra, esta luz passa por um monocromador, responsável pela

separação da luz que atingirá a amostra. Através de uma série de espelhos adequadamente posicionados, a luz chega até a amostra e provoca excitação das moléculas, que emitem luz num outro comprimento de onda, que também passa por um monocromador e é captado pelo fotomultiplicador e convertido em imagem (56).

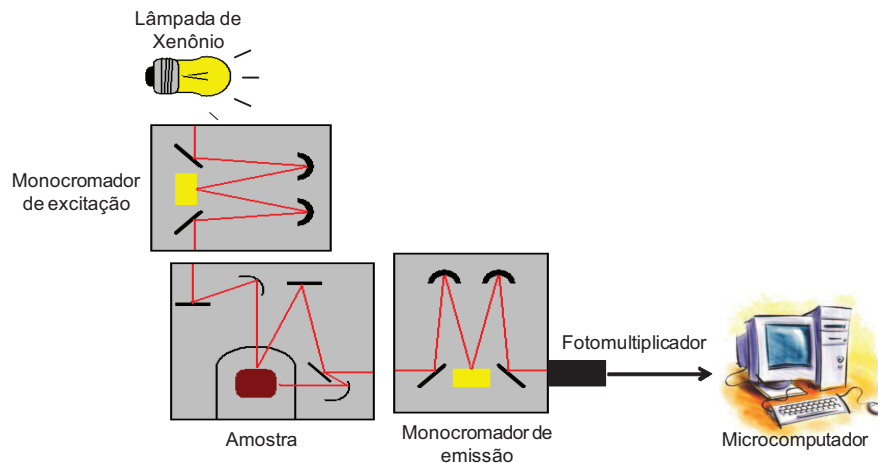


FIGURA 8 - Esquema geral de funcionamento de espectrofotômetro de fluorescência que utiliza lâmpada de xenônio como fonte de excitação.

As fontes de luz, utilizadas para excitação das amostras, podem variar de acordo com o tipo de espectrofotômetro usado, sendo as mais utilizadas as lâmpadas de xenônio, mercúrio e LED (do inglês - *light-emitting diode*). A fonte de luz utilizada pode ser descrita em termos de comprimento de onda (λ), dado em nanômetros (nm), frequência (ν) ou número de ondas, dado em cm^{-1} , dependendo do equipamento utilizado (56).

A espectroscopia de fluorescência se caracteriza por ser uma técnica de alta sensibilidade, rápida e que possibilita análise em tempo real, sendo muito vantajosa para estudos biológicos e acompanhamento de diversas doenças (43), podendo elucidar características chave dos tecidos, como taxa de metabolismo celular, vascularidade, oxigenação intravascular e alterações na morfologia dos tecidos, de maneira não ou minimamente invasiva (49).

Na área médica, a espectroscopia de fluorescência vem sendo muito explorada para diagnóstico e acompanhamento de diversos tumores pela identificação e dosagem de fluoróforos endógenos encontrados nesses tecidos. A utilização de fluoróforos exógenos também pode ser observada pela utilização de fotossensibilizadores que se acumulam no tecido tumoral permitindo sua identificação (49, 57).

2. OBJETIVO

Verificar a aplicabilidade da espectroscopia de fluorescência na determinação dos níveis de autofluorescência da PpIX eritrocitária e AGE-HSA em indivíduos diabéticos e controles saudáveis e avaliar sua possível correlação com os valores de glicemia e HbA1c, principais marcadores utilizados para diagnóstico e acompanhamento da doença.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Recrutamento de Indivíduos diabéticos e controles saudáveis

Foram recrutados 93 pacientes com diabetes tipo 1 e tipo 2 no Ambulatório de Diabetes da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), no período entre Junho e Outubro de 2009.

As 58 amostras de indivíduos saudáveis, utilizados como controles foram obtidas no Instituto do Sono da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) no período entre Dezembro de 2009 e Maio de 2010.

Após total esclarecimento sobre a pesquisa e os procedimentos a serem realizados os indivíduos assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) (CEP 0278/09).

Dados epidemiológicos e bioquímicos foram obtidos através das fichas ambulatoriais e entrevista realizada com os indivíduos. O recrutamento dos mesmos foi realizado de forma que se pudesse obter um emparelhamento de sexo e idade entre os grupos estudados.

3.2 Coleta de Amostras

Aproximadamente 7 ml de sangue foram coletados por punção venosa da veia do antebraço de cada indivíduo.

Todas as amostras foram coletadas em tubos contendo heparina ou fluoreto de sódio, para evitar a coagulação, e mantidas a 4°C até o momento de seu processamento.

3.3 Processamento das Amostras

As amostras foram processadas no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), após um ou dois dias da data da coleta.

Separou-se 1 ml de sangue total de cada indivíduo para posterior análise de HbA1c e o restante foi centrifugado a 664 g por 5 minutos para separação do plasma. O plasma e as hemácias foram separados e armazenados a -20°C e a 4°C, respectivamente.

3.4 Extração da PpIX

Para extração da PpIX utilizou-se 400 µl de hemácias e acrescentou-se 1200 µl de acetona para análise (PA), numa razão de 1:3. Essa mistura foi agitada em Vortex[®] por 15 segundos e mantida em gelo por 5 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 1699 g por 15 minutos. O sobrenadante foi retirado e armazenado a 4°C em tubo envolto por papel alumínio.

Todas as amostras foram extraídas em duplicata.

3.5 Determinação do AGE-HSA

Para determinação de AGE-HSA, realizou-se adaptação do protocolo descrito por Galler A e colaboradores, 2003, pela diluição de 10 vezes do plasma em PBS seguida de filtração da amostra em filtros de polietileno com diâmetro de 13 mm e poros de 0,22 µm (26).

O procedimento foi realizado em temperatura ambiente e após filtração as amostras também foram envoltas em papel alumínio.

Todas as amostras foram processadas em duplicata.

3.6 Análise espectroscópica das amostras de PpIX e AGE-HSA

As amostras processadas foram analisadas por espectroscopia de fluorescência no Centro de Laser e Aplicações no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, utilizando o equipamento Fluorolog Horiba Jobin Yvon, com lâmpada de xenônio de 150 W. Cubetas de quartzo com caminho óptico de 10 mm foram utilizadas para essas análises.

Para análise da PpIX, a abertura do slit, que compreende a fenda que define a quantidade de luz que atingirá a amostra, utilizada foi de 4 mm. As amostras foram excitadas em 405 nm e o pico máximo de emissão analisado em 632 nm.

Para análise de AGE-HSA, a abertura do slit foi de 5 mm. As amostras foram excitadas em 370 nm e o pico máximo de emissão analisado em 455 nm.

3.7 Obtenção de espectro de fluorescência padrão da PpIX

Para obtenção de espectro de fluorescência padrão da PpIX analisou-se uma solução de PpIX sintética (Sigma) de 100 ng/ml, sob os mesmos parâmetros utilizados para identificação de PpIX nas amostras dos indivíduos.

3.8 Preparação do AGE-BSA

Para obtenção de AGE-BSA, realizou-se modificação do protocolo descrito por Oldfield MD e colaboradores, 2001, onde preparou-se uma indução de glicação pela diluição de 50 mg de BSA (Sigma) e 450 mg de glicose em 5 ml de água Milli Q[®]. Para controle da reação diluiu-se apenas BSA em água Milli Q[®]. Após diluição as amostras foram filtradas em filtros de polietileno com diâmetro de 13 mm e poros de 0,22 µm e mantidas em tubos envoltos com papel alumínio. As amostras foram incubadas a 37°C por 49 dias e após o período de incubação foram dialisadas contra água Milli Q[®] para retirada da glicose livre (58). A análise espectroscópica se deu sob os mesmos parâmetros utilizados para as amostras de AGE-HSA nos indivíduos estudados.

3.9 Preparação de curva padrão da BSA

Para preparação de uma curva padrão de BSA diluiu-se 200 mg de BSA (Sigma) em 4 ml de PBS e a partir desta solução realizou-se uma diluição seriada. Os pontos obtidos nesta diluição foram: 50 mg/ml, 25 mg/ml, 12,5 mg/ml e 6,25 mg/ml.

Após preparação as amostras foram mantidas em tubos envoltos por papel alumínio até o momento da análise, que se deu sob os mesmos parâmetros utilizados para identificação do AGE-HSA nas amostras dos indivíduos.

3.10 Determinação de Hemoglobina Glicada (Hb1Ac)

Para as amostras dos indivíduos diabéticos utilizou-se os valores encontrados nos prontuários médicos dos mesmos, considerando-se valores de no máximo três meses antes da data da coleta.

A determinação dos níveis de HbA1c dos indivíduos controles se deu pela utilização de kit comercial (BioTécnica – Biotecnologia Avançada).

A análise consiste no método turbidimétrico, onde ocorre interação entre antígeno e anticorpo para determinação direta da Hb1Ac, a partir de amostras de sangue total (coeficiente de variação de 1,26%).

3.10.1 Reação

Inicialmente, pipetou-se 1 ml do reagente hemolisante (Azina 0,5 g/L) em tubos de ensaio e acrescentou-se 20 µl de amostras (tanto para indivíduos quanto para calibradores) em seus respectivos tubos. Essa mistura foi mantida em temperatura ambiente por 5 minutos.

Após esse passo inicial, aqueceu-se o reagente 1 (Látex 0,13% e tampão glicina 20 mmol/L) por 3 minutos a 37°C. Pipetou-se em tubo de ensaio, para o branco 700 µl do reagente 1, para os calibradores, 700 µl do reagente 1 e 20 µl das amostras calibradoras hemolisadas, para as amostras dos indivíduos controles 700 µl do reagente 1 e 20 µl das amostras hemolisadas e incubou-se por 5 minutos a 37°C. Logo após, acrescentou-se, em todas as amostras, 250 µl do reagente 2 (tampão glicina 80 mmol/L; anticorpo monoclonal de camundongo anti-HbA1c humana 0,05 mg/ml; anticorpo policlonal de cabra anti-IgG de camundongo 0,08 mg/dl; estabilizantes), homogeneizou-se e incubou-se por 5 minutos a 37°C. Após este procedimento analisou-se a absorbância das amostras no espectrofotômetro Genesys 6 (Thermo Scientific) em 630 nm. As medições foram feitas na seguinte ordem: branco, calibradores em ordem crescente de concentração e amostras dos indivíduos controles.

3.11 Obtenção dos valores de glicemia

Para determinação dos valores de glicemia, tanto para indivíduos diabéticos quanto para controles, utilizou-se os valores encontrados nos prontuários médicos dos mesmos, considerando-se valores de no máximo três meses antes da data da coleta.

3.12 Análises Estatísticas

Para dados com distribuição normal foi utilizado o teste t Student, apresentados como média ± DP. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para as análises não paramétricas com dados expressos como mediana [25% - 75%]. Para as análises não paramétricas, com mais de dois grupos foi utilizado o teste

Student-Newman-Keuls, com dados também expressos como mediana [25% - 75%]. Para análise de correlação entre os sexos foi utilizado o teste de Fisher. Significância foi estabelecida em $P < 0,05$. Os programas Excel 2007 e Sigmastat 1.0 foram utilizados para realização das análises.

4 RESULTADOS

O presente trabalho analisou 151 indivíduos, sendo 93 diabéticos e 58 controles saudáveis. Inicialmente realizou-se análise estatística para comprovação da homogeneidade entre os dois grupos. Na TABELA 4 pode-se observar a similaridade, tanto para idade quanto para distribuição dos sexos nos grupos estudados.

TABELA 4 - Idade média e distribuição dos sexos nos grupos diabético e controle.

	Diabéticos (N=93)	Controles (N=58)	P
Homem/Mulher	30/63	21/37	0,72
Idade (anos) (x ± DP)	56,1± 12,8	56 ± 15	0,96

Sexo = teste de Fisher, *idades* = teste t student.

Posteriormente, compilou-se os dados epidemiológicos dos indivíduos diabéticos. A maior parte dos indivíduos atendidos no período entre Junho e Outubro de 2009, apresentam diabetes tipo 2 (84,5%). A presença de histórico familiar para a doença foi bastante observada entre os indivíduos (84,5%), sendo na maior parte, parentesco em primeiro grau (72,3%). Patologias secundárias decorrentes da hiperglicemia aparecem em 49,5% dos pacientes, sendo representadas por complicações microvasculares, subdivididas em retinopatias, nefropatias e neuropatias, e macrovasculares. A TABELA 5 mostra o resumo dos dados epidemiológicos observados.

TABELA 5 - Dados epidemiológicos dos indivíduos diabéticos.

Parâmetros	Diabéticos
	N (%)
DM tipo 1	15 (16,5)
DM tipo 2	78 (84,5)
Histórico familiar de DM	78 (84,5)
Dieta controle DM	67 (72)
Consumo de bebida alcoólica	8 (8,6)
Uso de tabaco	10 (10,7)
Presença de complicações diabéticas	46 (49,5)
Retinopatias	30 (32,2)
Nefropatias	17 (18,3)
Neuropatias	14 (15)
Macroangiopatias	5 (5,3)
Uso de medicamento para controle hiperglicêmico	92 (99)

Por se tratar dos marcadores bioquímicos mais utilizados para diagnóstico e monitoramento do diabetes, os valores de glicemia e HbA1c dos dois grupos foram analisados comparativamente.

No grupo dos diabéticos, a mediana dos valores glicêmicos encontrada foi de 153 [121,5-198,3] mg/dl, com amplitude de 63 mg/dl a 427 mg/dl. No grupo controle, os valores encontrados foram de 91[86 - 93] mg/dl e amplitude 59 mg/dl a 99 mg/dl. A FIGURA 9 mostra os valores das medianas de glicemia de ambos os grupos, mostrando que há diferença estatística significativa entre eles ($P < 0,0001$).

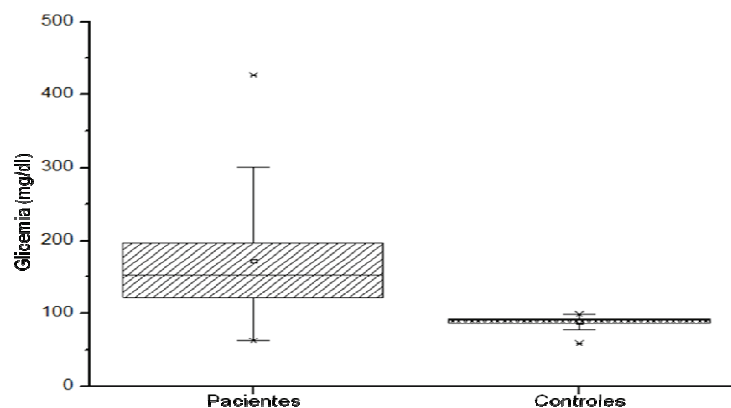


FIGURA 9 - Mediana dos valores de glicemia do grupo diabético e controle. $P < 0,0001$ (Teste de Mann-Whitney).

Os indivíduos diabéticos apresentaram uma concentração de HbA1c mediana de 8[7 - 10,3]%, com amplitude de 5,9% a 16,1%. O valor da mediana de HbA1c dos indivíduos controles encontrado foi de 4,95[4,3 - 6,5]%, com

amplitude de 2,8% a 6,2%. A FIGURA 10 mostra os valores das medianas de HbA1c de ambos os grupos. Os grupos foram estatisticamente diferentes para este marcador ($P < 0,0001$).

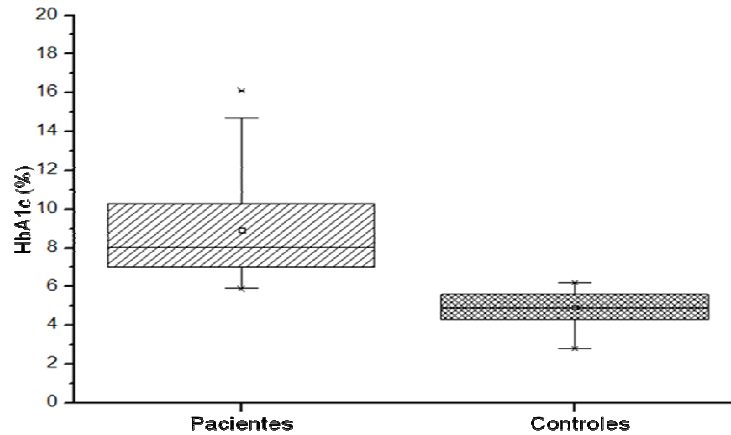


FIGURA 10 - Medianas dos valores de HbA1c do grupo diabético e controle. $P < 0,0001$ (Teste de Mann-Whitney).

Observou-se que 92 indivíduos diabéticos utilizavam algum tipo de medicamento para controle da hiperglicemia, como mostra a TABELA 6.

TABELA 6 - Medicamentos utilizados para controle hiperglicêmico no grupo de indivíduos diabéticos (N=92).

Medicamento	N	(%)
Insulina	30	32,3
Metformina	20	21,5
Outros medicamentos	3	2,8
Medicamentos combinados	39	42,3

Nos casos de terapêutica com utilização de apenas um medicamento, a insulina (32,3%), seguida da metformina (21,5%), droga que atua na diminuição da produção hepática de glicose e aumento da sensibilidade à insulina pelos tecidos periféricos (59), são as drogas mais utilizadas. Glibenclamida, repaglinida e glimeperida, que agem aumentando a secreção de insulina pelas células beta pancreáticas (60), são utilizadas com menor frequência (0,93% dos indivíduos nos três casos). A insulina e metformina são empregadas no tratamento conjugado para 24 indivíduos (22,5%). Combinações entre insulina e glimeperida (3,1%), metformina e glicazida (2,5%), metformina e glimeperida (2,9%), metformina e

glibenclamida (7,5%) e ainda insulina, metformina e glimeperida (1,9%) e insulina, metformina e glibenclamida (1,9%) também foram utilizadas. Observou-se que a terapêutica conjugada é mais freqüente que a monoterapia no grupo estudado.

A utilização de outros medicamentos, além dos utilizados para o controle da hiperglicemia, foi observada em 88 indivíduos no grupo diabético. Medicamentos para controle de hipertensão, controle do colesterol, diuréticos e anticoagulantes apareceram prescritos com maior freqüência, como mostra a TABELA 7.

TABELA 7 - Medicamentos utilizados pelos indivíduos do grupo diabético (N=88).

Tipo de medicamento	N	(%)
Anti-hipertensivo	79	89,7
Controle de colesterol	41	46,6
Diurético	30	34
Anticoagulante	46	52,3

4.1 Análise espectroscópica da PpIX

A PpIX sintética (Sigma), na concentração de 100 ng/ml foi excitada em um comprimento de onda de 405 nm. O espectro de emissão resultante está apresentado na FIGURA 11. O pico principal (632 nm) foi o utilizado para as análises quantitativas.

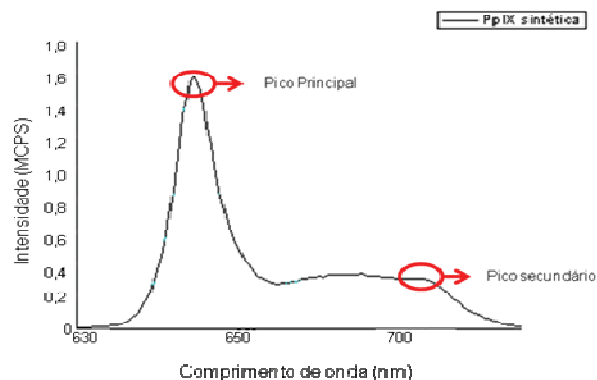


FIGURA 11 - Perfil do espectro de fluorescência de 100 ng/ml de PpIX sintética (Sigma). MCPS: Milhões de contagens de fótons por segundo.

Na população estudada não foi observada distribuição normal dos dados, portanto, realizou-se análise estatística não paramétrica.

Nos indivíduos diabéticos a mediana de intensidade de emissão PpIX foi de 0,180[0,126 - 0,255] MCPS, com amplitude de 0,02 a 0,779 MCPS. No grupo controle, a mediana foi de 0,188[0,128 - 0,230] MCPS com amplitude de 0,067 a 0,907 MCPS. A FIGURA 12 A mostra as medianas de intensidade de emissão da PpIX nos dois grupos e a FIGURA 12 B mostra a representação do espectro de autofluorescência desse indivíduos. Não houve diferença significativa entre os indivíduos diabéticos e controles ($P=0,89$).

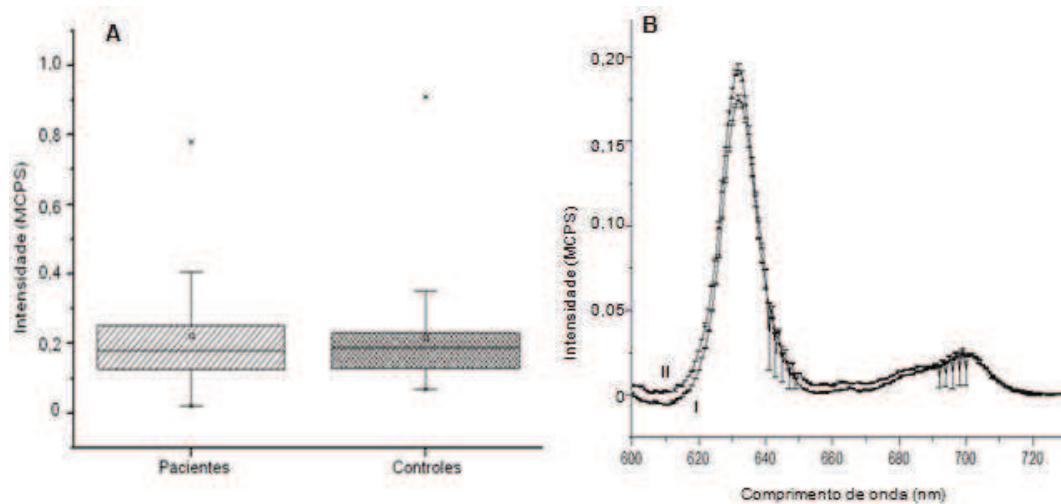


FIGURA 12 – A: Mediana das intensidades de emissão da PpIX no grupo diabético e controle. $P=0,89$ (Teste de Mann-Whitney). B: Espectro de autofluorescência da PpIX no grupo diabético (I) e controle (II). MCPS: milhões de contagens de fótons por segundo.

4.2 Análise espectroscópica do AGE-HSA

A fluorescência do AGE-HSA foi verificada com excitação em 370 nm e pico máximo de emissão analisado em 455 nm.

Preliminarmente, realizou-se testes para confirmar a inexistência de ruídos ou picos de emissão que não correspondiam à molécula de HSA. Para tal, analisou-se os espectros de emissão da lâmpada de xenônio, utilizada como fonte de excitação, como mostra a FIGURA 13 A, e os espectros de emissão da cubeta de quartzo com água Milli Q[®] e com tampão fosfato salino (PBS – do inglês *phosphate buffered saline*), sob excitação em 370 nm, comparando essas duas últimas com o espectro da BSA, como mostra a FIGURA 13 B. Não se observou interferências na fluorescência da BSA, mostrando que os espectros obtidos correspondem apenas a emissão da molécula analisada.

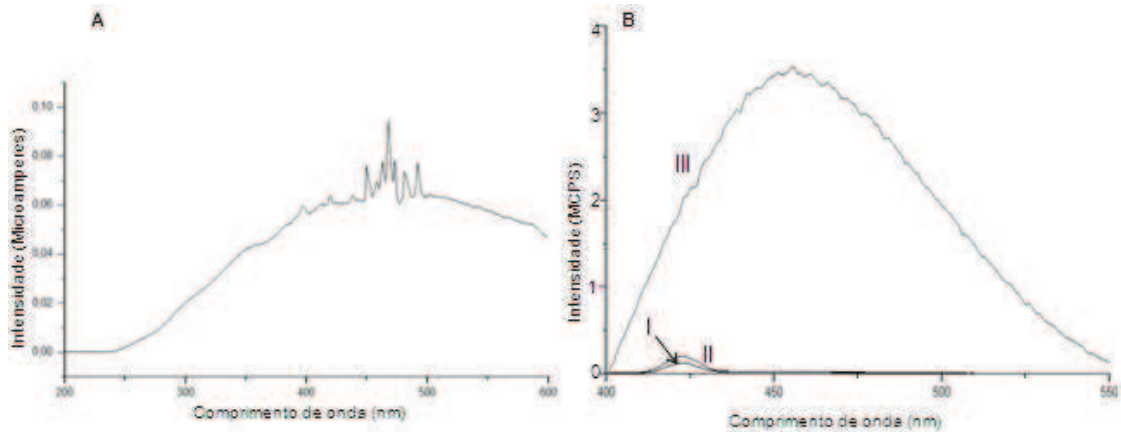


FIGURA 13 - A: Espectro de emissão da lâmpada de xenônio. B: Espectro de emissão da cubeta de quartzo com PBS (I), com água Milli Q[®] (II), e espectro de emissão da BSA (III) em concentração de 50 mg/ml. Amostras analisadas com excitação em 370 nm. MCPS: milhões de contagens de fótons por segundo.

A utilização da BSA em estudo *in vitro* para comparação com a HSA no estudo *in vivo* se deu devido à alta similaridade entre as duas moléculas (38). Além de sua utilização no ensaio para determinação de ruídos, a BSA também foi utilizada para determinação de espectro padrão utilizado na comparação com o estudo *in vivo*. Para tal, realizou-se uma indução de glicação, através da incubação de BSA (Sigma) com glicose por 49 dias, levando a formação de AGE-BSA, sendo o controle da reação a amostra de BSA incubada na ausência de glicose. A intensidade do BSA encontrada foi de $0,99 \pm 0,3$ MCPS e a do AGE-BSA de $3,16 \pm 0,29$ MCPS, sendo, portanto 2,7 vezes maior que a intensidade encontrada para o BSA ($P < 0,001$), como mostra a FIGURA 14.

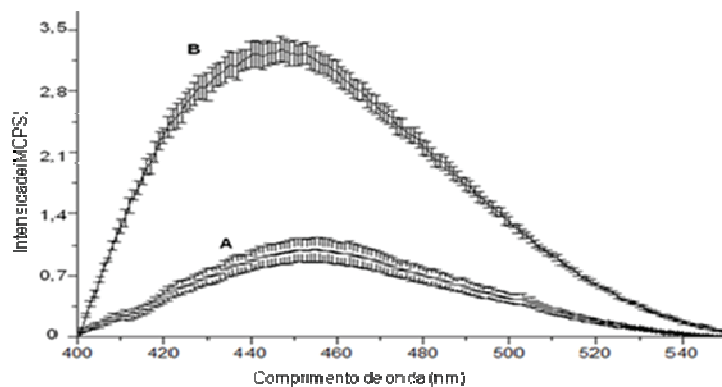


FIGURA 14 - Espectro de fluorescência do BSA (A) e do AGE-BSA (B). Dados de emissão obtidos no comprimento de onda de 455 nm. $P < 0,001$. MCPS: milhões de contagens de fótons por segundo.

Realizou-se também uma curva padrão a partir de BSA (Sigma), como mostra a FIGURA 15, para comprovar a sensibilidade do equipamento em relação a diferentes concentrações.

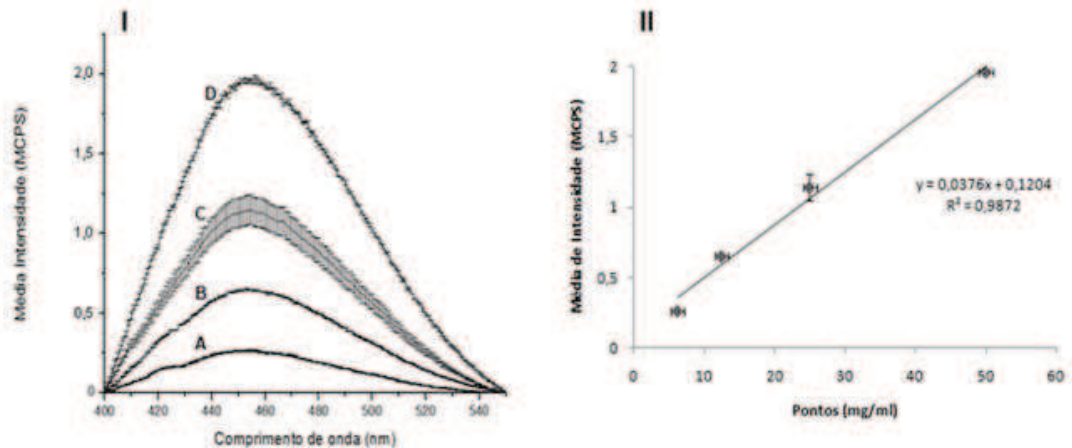


FIGURA 15 - Curva padrão da BSA. I: Espectro de fluorescência da BSA em diferentes concentrações. II: Dados analisados no programa Excel 2007. A: 6,25 mg/ml; B: 12,5 mg/ml; C: 25 mg/ml; D: 50 mg/ml. Dados de emissão obtidos no comprimento de onda de 455 nm. MCPS: milhões de contagens de fótons por segundo.

Como observado com a PpIX, os dados de AGE-HSA não apresentaram distribuição normal, portanto, aplicou-se análise estatística não paramétrica.

A mediana de intensidade de emissão do AGE-HSA nos indivíduos diabéticos foi de 1,62[1,34 – 1,93] MCPS, com amplitude de 0,785 MCPS a 3,846 MCPS. Para o grupo controle a mediana encontrada foi de 1,11[0,97 - 1,46] MCPS, com amplitude de 0,137 MCPS a 2,294 MCPS. Na FIGURA 16 A pode-se observar as medianas de emissão do AGE-HSA nos grupos de indivíduos diabéticos e controles e na FIGURA 16 B a representação do espectro de autofluorescência desses indivíduos.

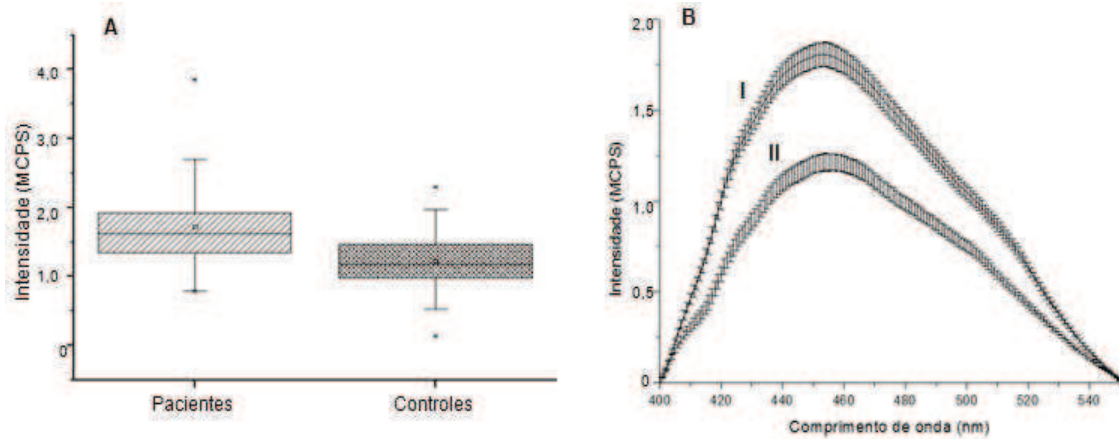


FIGURA 16 – A: Mediana das intensidades de emissão do AGE-HSA no grupo diabético e controle. $P < 0,0001$ (Teste de Mann-Whitney); B: Espectro de autofluorescência do AGE-HSA no grupo diabético (I) e controle (II).

De acordo com os dados observados houve diferenças significativas dos valores de intensidade de emissão de AGE-HSA entre indivíduos diabéticos e controles pelo método utilizado ($P < 0,0001$), sendo este valor 1,45 vezes maior para os indivíduos diabéticos em relação ao grupo controle.

Outra característica observada foi a presença de complicações relacionadas ao diabetes e sua relação com a intensidade de emissão do AGE-HSA. A mediana de intensidade de emissão do AGE-HSA para os indivíduos com complicações ($N=46$) foi de 1,69[1,47 - 2,13] MCPS, com amplitude de 1,109 a 3,846 MCPS. Para os indivíduos sem complicações ($N=47$) a mediana de intensidade de emissão foi de 1,5[1,22 - 1,85] MCPS, com amplitude de 0,785 a 2,925 MCPS, como mostra a FIGURA 17 A.

Observou-se que há diferença estatística significativa entre os indivíduos com e sem complicações diabéticas ($P=0,01$), sendo este valor 1,19 vezes maior para os indivíduos com complicações em relação aos indivíduos sem complicações, mesmo não havendo diferenças significativas entre os valores de HbA1c entre os dois grupos, representados por 8,2[7 - 10,4]% para o grupo com complicações e 8[7 - 10,2]% para o grupo sem complicações ($P=0,81$), como mostra a FIGURA 17 B.

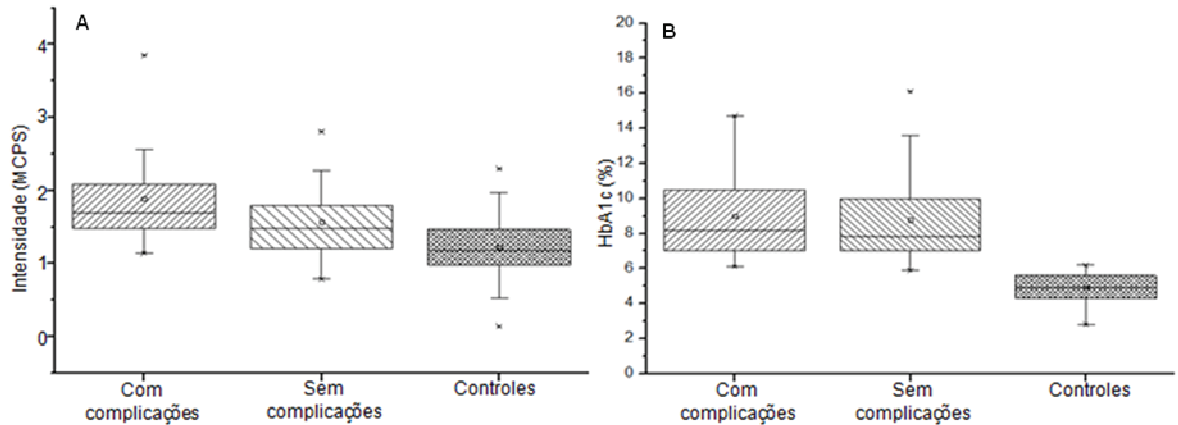


FIGURA 17 - A: Medianas de intensidade de emissão do AGE-HSA dos indivíduos diabéticos com e sem complicações e controles. Controles *versus* diabéticos com complicações ($P < 0.05$); controles *versus* diabéticos sem complicações ($P < 0.05$); diabéticos com complicações *versus* diabéticos sem complicações ($P < 0.05$) (teste Student-Newman-Keuls). (B): Mediana do valor de HbA1c de indivíduos diabéticos com e sem complicações e controles. Controles *versus* diabéticos com complicações ($P < 0.05$); controles *versus* diabéticos sem complicações ($P < 0.05$); diabéticos com complicações *versus* diabéticos sem complicações ($P = 0,81$) (teste Student-Newman-Keuls).

5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos tem-se observado um aumento surpreendente na prevalência de diabetes mellitus (14), sendo que cerca de 90 a 95% dos casos correspondem ao tipo 2, que está associado diretamente ao estilo de vida dos indivíduos, caracterizado por estresse, sedentarismo e dieta hipercalórica e hiper-gordurosa (3, 9). As complicações crônicas decorrentes desta doença estão entre as dez principais causas de morte em todo o mundo (14) e em países desenvolvidos as complicações vasculares são a principal causa de morte (61).

O presente trabalho teve como objetivo verificar a aplicabilidade da espectroscopia de fluorescência na determinação dos níveis de autofluorescência da PpIX eritrocitária e AGE-HSA em indivíduos diabéticos e controles saudáveis e avaliar sua possível correlação com os valores de glicemia e HbA1c, principais marcadores utilizados para diagnóstico e acompanhamento da doença.

O número de indivíduos analisados neste estudo foi de 93 diabéticos e 58 controles. Números semelhantes foram utilizados no estudo de Galler A e colaboradores, 2003, que verificou a diferença de intensidade de autofluorescência de AGEs em 99 indivíduos diabéticos e 60 indivíduos controle (26).

O grupo diabético utilizado neste estudo foi majoritariamente composto por indivíduos acometidos pelo DM tipo 2. O mesmo foi observado em estudo realizado na Republica Tcheca por Kalousová M e colaboradores, 2002, onde 34 dos 52 indivíduos diabéticos estudados (65,4%) eram acometidos pelo DM tipo 2 (62). Esta alta prevalência também pode ser observada em países desenvolvidos como os Estados Unidos da América (EUA), onde o estilo de vida da população (estresse, sedentarismo e dietas inadequadas) favorece o desenvolvimento dessa doença (9).

Apesar de 92 indivíduos no grupo estudado realizarem o controle glicêmico pelo uso de drogas, o grupo, de maneira geral, apresentou valores de glicemia e HbA1c acima dos valores considerados normais, sendo estes 1,68 e 1,61 vezes maior do que os valores encontrados no grupo controle, composto por indivíduos saudáveis. O estudo de Franciosi M e colaboradores, 2011, também mostra a presença de valores de HbA1c superiores aos considerados normais para pacientes com DM tipo 2 sob tratamento com anti-hiperglicemiantes orais. Neste

estudo os indivíduos apresentavam valores de HbA1c entre 7% e 9%, mesmo fazendo uso de metformina ou outras drogas orais para controle da hiperglicemia (63).

O espectro de autofluorescência da PpIX analisado teve amplitude de 600–730 nm com um pico principal em 632 nm, utilizado para as análises quantitativas, e um pico secundário em 690 nm. Parâmetros semelhantes podem ser observados no estudo de Bugaj A e colaboradores, 2004, onde a molécula foi excitada em 408 nm e sua emissão analisada com amplitude de 600 –700 nm, com pico principal em 632 nm (64).

A análise comparativa dos valores de autofluorescência da PpIX entre o grupo diabético e o grupo controle não mostrou diferença significativa entre eles ($P=0,89$). Este resultado difere do encontrado por Doss M e colaboradores, 1981, com cultura de células de fígado aviárias, onde a indução de hiperglicemia levou a diminuição significativa dos níveis de PpIX nessas células (47). Também contradiz os resultados de Fauaz G e colaboradores, 2010, que observaram que a fluorescência da PpIX eritrocitária reduziu em camundongos diabéticos não tratados. Neste modelo, a hiperglicemia constante provocou um desequilíbrio metabólico nos animais, podendo ter afetado a biossíntese do heme (65). Essa discordância entre os resultados experimentais e o observado na população diabética estudada pode ser justificada, pois os pacientes estavam recebendo medicamentos anti-hiperglicemiantes e certamente passaram por períodos de normalidade, impedindo que a biossíntese do heme fosse afetada como observado no estudo com animais. Frente a essas observações, conclui-se que a PpIX não é um bom biomarcador para monitorando de indivíduos diabéticos.

Dando continuidade ao estudo, decidiu-se avaliar a autofluorescência do AGE-HSA para verificar sua aplicabilidade no monitoramento dos pacientes diabéticos.

Atualmente, o monitoramento da glicação é realizado pela dosagem da HbA1c, determinada por ensaios bioquímicos baseados em imunoenaios e ensaios de cromatografia, sendo este último o mais utilizado. Esses ensaios, em especial a cromatografia, têm um custo bastante elevado e são complexos, necessitando de diversos equipamentos e reagentes específicos (22). Neste contexto, a utilização da mensuração dos níveis de AGE-HSA, pela utilização da

técnica de espectroscopia de fluorescência, seria uma opção de baixo custo e rápida execução para o acompanhamento dos indivíduos diabéticos.

A utilização da espectroscopia de fluorescência para o mensuramento dos níveis de AGE-HSA tem sido utilizada em diversos trabalhos. Os comprimentos de onda de excitação e emissão utilizados para tal análise podem ser observados na TABELA 8.

TABELA 8 - Comprimentos de onda de excitação e emissão para moléculas de AGE-BSA e AGE-HSA.

Referência	Molécula	Excitação (nm)	Emissão (nm)
Tupe R, et al, 2010 (37)	AGE-BSA	325	450
De La Maza, et al, 2007 (66)	AGE-BSA	350	430
Rubio-Ruiz ME, et al, 2008 (67)	AGE-BSA	370	440
Oldfield MD, et al, 2001 (58)	AGE-BSA	370	440
Gallicchio MA, et al, 2006 (68)	AGE-BSA	370	440
Neumann A, et al, 1999 (69)	AGE-BSA	370	440
Coussons P, et al, 1997 (70)	AGE-HSA	350	425
Wong RKM, et al, 2002 (71)	AGE-HSA	370	450
Rashid G, et al, 2006 (72)	AGE-HSA	370	440

De acordo com os dados encontrados na literatura, os comprimentos de onda de excitação e emissão utilizados para a identificação do AGE-HSA (também utilizados para o AGE-BSA) podem variar de 325 nm a 370 nm para excitação e de 425 nm a 450 nm para emissão.

Neste trabalho a análise do AGE-HSA se deu pela utilização dos comprimentos de onda de excitação e emissão de 370/455 nm, respectivamente, baseado na observação *in vitro* do AGE-BSA, estando de acordo com o observado em estudos prévios encontrados na literatura, como mostra a TABELA 8.

Os resultados da determinação espectroscópica da autofluorescência do AGE-BSA validaram a análise do AGE-HSA, pois a homologia entre essas moléculas é de aproximadamente 80% (37, 73).

A glicação da BSA promoveu um aumento da intensidade de emissão de fluorescência semelhante ao observado no estudo de Bhatwadekar AD e

colaboradores, 2005, que observaram um aumento de 3,9 vezes na intensidade de emissão da BSA glicada em relação à BSA sem a presença de glicose (74).

Esse resultado mostra a formação do AGE-BSA devido ao tempo de exposição da proteína a alta concentração de glicose, de maneira similar ao que ocorre no organismo com a albumina humana. O tempo de exposição utilizado foi de 49 dias, estando de acordo com o estudo de Sattarahmady N e colaboradores, 2007, que descreve que o tempo necessário para a formação de AGEs *in vitro* está entre 28 e 35 dias, correspondendo a fase tardia da reação de Maillard (31). O aumento da fluorescência observado se deve as alterações causadas à molécula de BSA devido à presença de glicose, visto que quando maior o grau de modificação da molécula, maior será a fluorescência emitida (34).

Nossos dados revelaram diferença significativa na concentração do AGE-HSA entre o grupo diabético e controle ($P < 0,0001$). Esses dados são corroborados pelos de Galler A e colaboradores, 2003, onde se observou diferenças significativas entre a concentração de AGEs ($P < 0,001$), analisado com excitação e emissão em 370/445 nm, respectivamente (26). Essa diferença também foi encontrada no estudo de Kalousová, M e colaboradores, 2002, onde indivíduos com DM tipo 2 apresentavam níveis de fluorescência de AGEs significativamente maiores que os valores encontrados na população saudável ($P < 0,001$) pela utilização da espectroscopia de fluorescência, com excitação e emissão de 350/440 nm, respectivamente (62).

Diversos estudos tem mostrado a relação entre a concentração aumentada dos AGEs e o surgimento de complicações diabéticas tais como retinopatias, catarata, aterosclerose, glomerulosclerose, insuficiência renal e neuropatias (2, 27). O estudo de Vlassara H e colaboradores, 1994, utilizando ratos, mostra que em animais com esclerose glomerular houve acúmulo de AGEs no tecido renal aproximadamente 50% maior que nos animais controles, além de concentrações no plasma 2,8 vezes maior que os animais saudáveis (75).

Estudos mostram que o aumento dos níveis de AGE-HSA pode levar ao desencadeamento de processos inflamatórios devido à ativação de fatores de transcrição pelas espécies reativas de oxigênio geradas (32). Esses processos inflamatórios podem levar ao surgimento de complicações diabéticas, como visto no estudo de Wong RKM e colaboradores, 2002, onde indivíduos com complicações diabéticas microvasculares apresentavam nível de AGE-HSA dez

vezes maior que o nível encontrado para indivíduos com complicações macrovasculares e estes, por sua vez, apresentavam nível três vezes maior que os indivíduos não diabéticos (71).

Nosso estudo confirma essas observações. As complicações decorrentes do diabetes foram encontradas em quase metade dos indivíduos estudados, sendo representadas por retinopatias, nefropatias, neuropatias e macroangiopatias, mesmo com a utilização de medicamentos para prevenção e controle do desenvolvimento de complicações pela maioria dos indivíduos. Este grupo apresentou intensidade de fluorescência maior que o grupo sem complicações ($P=0,01$), mesmo não havendo diferença significativa entre os valores de HbA1c entre os dois grupos.

Frente aos dados observados, pode-se concluir que a mensuração da autofluorescência de AGE-HSA é um método eficiente para o acompanhamento do diabetes, podendo estar relacionado com a progressão da doença e ser mais sensível que a dosagem de HbA1c para este acompanhamento.

O estudo de revisão de Beisswenger PJ, 2010, mostra que está cada vez mais claro que a utilização da HbA1c como marcador para identificação de risco de desenvolvimento de complicações diabéticas possui significantes limitações (76). Isso pode ser visto no estudo Borch-Johnsen K e colaboradores, 1992, onde um subgrupo de indivíduos com DM tipo 1 apresentou desenvolvimento de nefropatias mesmo com os valores de HbA1c dentro dos níveis considerados normais (77).

Essas limitações podem ser explicadas pelo fato de que a HbA1c não mostra informações sobre a amplitude e frequência das oscilações glicêmicas, fazendo com que indivíduos que possuam grandes oscilações nos valores de glicemia apresentem níveis normais de HbA1c, embora estejam expostos aos danos causados pela hiperglicemia (78, 79). O estudo de Peter AL e colaboradores, 1997, mostra que os níveis de HbA1c podem permanecer normais ou minimamente elevados, mesmo com valores de glicemia maiores que 200 mg/dl no período pós-prandial (80). Além disso, a HbA1c se mostra incapaz de identificar produtos do processo de glicação/oxidação responsáveis pelo surgimento dos danos (79, 81).

Os prejuízos causados pelas flutuações glicêmicas podem ser comprovados quando se analisa a frequência do desenvolvimento de

complicações. Sabe-se que indivíduos acometidos pelo DM tipo 1 apresentam flutuações com frequência muito maior que os indivíduos com DM tipo 2, possuindo também uma significativa prevalência no surgimento de complicações (79).

De acordo com Beisswenger PJ, 2010, um bom biomarcador para acompanhamento do diabetes deve ser mensurado de forma minimamente invasiva e de maneira reprodutível, identificar os estágios iniciais da doença, além de ter correlação com a progressão e com a resposta terapêutica empregada (76).

Muitas vezes o diagnóstico do diabetes se dá muitos anos após o surgimento da doença e, mesmo que a partir do seu diagnóstico, o indivíduo mantenha os níveis de HbA1c dentro da normalidade, este pode ter passado por longos períodos de hiperglicemia, estando exposto a seus efeitos nocivos (3).

A utilização da autofluorescência do AGE-HSA para o acompanhamento da progressão do diabetes mostra-se útil, pois pode ser realizada de maneira pouco invasiva, através da coleta de sangue venoso, e possibilita a identificação da dimensão dos efeitos da hiperglicemia, mesmo com a presença de oscilações glicêmicas, propiciando um melhor controle sobre a evolução da doença. Além disso, os AGEs refletem as vias de atividades químicas que levam às complicações (76), que muitas vezes são silenciosas, sendo diagnosticadas quando a doença já está em estágios mais graves. Frente a esta observação, um intenso acompanhamento da progressão do diabetes, desde seu diagnóstico, se mostra imprescindível para evitar maiores danos aos indivíduos acometidos (3).

A utilização da técnica de espectroscopia de fluorescência tem se mostrado bastante útil em diversos segmentos da área biomédica (43). O estudo de Lin Y e colaboradores, 2010, utilizou esta técnica para análise de agregação plaquetária pelo mensuramento da autofluorescência do triptofano, presente nas proteínas estudadas (82). Já o estudo de Parracino A e colaboradores, 2010, utilizou a espectroscopia de fluorescência para a caracterização de nano partículas, utilizadas em diversas aplicações biológicas, como segmentação de drogas, separação celular, terapia contra câncer, biossensores, entre outros (83).

Na medicina, a espectroscopia de fluorescência vem sendo muito utilizada para diagnóstico e acompanhamento de diversos tumores, tanto pela identificação

e dosagem de fluoróforos endógenos encontrados nesses tecidos, quanto pela dosagem de fluoróforos exógenos que se ligam aos mesmos (49, 57).

O estudo com animais de Hariri LP e colaboradores, 2010, utilizou a espectroscopia de fluorescência para identificação de acúmulo de colágeno e NADH/FAD em ovários neoplásicos de ratas (57). Inaguma M e colaboradores, 1999, compararam o espectro de fluorescência da PpIX em tecido de carcinoma oral humano e tecido oral de indivíduos saudáveis, mostrando a presença de acúmulo da PpIX na maioria dos indivíduos do primeiro grupo, tanto em tecidos tumorais viáveis quanto em áreas necróticas, elucidando que esta técnica pode ser eficiente para a identificação de tecido tumoral (84).

A utilização da espectroscopia de fluorescência para o acompanhamento dos indivíduos diabéticos se mostra útil não apenas por ser eficiente na dosagem da autofluorescência de moléculas, mas também por ser uma técnica de fácil execução, ser rápida e de baixo custo.

A TABELA 9 mostra a comparação entre os dois principais métodos utilizados atualmente para o acompanhamento do diabetes com a espectroscopia de fluorescência, quanto ao custo e tempo estimado para realização das técnicas.

TABELA 9 - Tempo e custo estimado para realização de diferentes métodos laboratoriais.

Método	Tempo estimado		Custo estimado
	Reação	Análise	
Imunoensaio	25 minutos	20 segundos	R\$ 42,00
Cromatografia	10 minutos	2 minutos	R\$ 88,00
Espectroscopia de fluorescência	5 minutos	30 segundo	R\$ 10,00

A estimativa para o ensaio de cromatografia foi realizada de acordo com o custo do teste de dosagem de HbA1c realizado em laboratórios de referência. A estimativa para o imunoensaio e para a espectroscopia de fluorescência se deu de acordo com os ensaios realizados em nosso estudo.

Frente a estes dados pode-se concluir que a espectroscopia de fluorescência é uma técnica eficaz, simples, rápida e de baixo custo para o acompanhamento do diabetes, tornando a rotina laboratorial mais simples e limitando os custos.

6 CONCLUSÕES

- A PpIX não se mostrou um marcador eficiente para o acompanhamento do DM pela utilização da espectroscopia de fluorescência na população estudada.
- Os níveis de AGE-HSA plasmáticos foram significativamente superiores nos indivíduos diabéticos em relação aos controles.
- Observou-se correlação entre os níveis do AGE-HSA e a presença de complicações diabéticas, principalmente microvasculares.
- A dosagem de AGE-HSA pode ser mais eficiente para o acompanhamento da progressão do diabetes que a dosagem de HbA1c.
- A espectroscopia de fluorescência é um método analítico eficaz, simples, rápido e de baixo custo, capaz de detectar a autofluorescência da PpIX e do AGE-HSA.
- A espectroscopia de fluorescência é uma ferramenta útil para o monitoramento de pacientes diabéticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Diabetes SBd. Consenso brasileiro sobre diabetes 2002: diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito do tipo 2. In: Diabetes SBd, editor. Rio de Janeiro: Diagraphic; 2003.
2. Brownlee M. The Pathobiology of Diabetic Complications. A Unifying Mechanism. *Diabetes*. 2005;56(6):1615-25.
3. Diabetes SBd. Tratamento e acompanhamento do diabetes mellitus. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. In: Diabetes SBd, editor. Rio de Janeiro: Diagraphic; 2006.
4. Liu E, Eisenbarth G. Type 1A diabetes mellitus associated autoimmunity. *Endocrinology Metabolism Clinics of North America* 2002;31:391-410.
5. Devendra D, Liu E, Eisenbarth G. Type 1 diabetes: recent developments. *British Medical Journal* 2004;328:750-4.
6. Silva M, Mory D, Davini E. Marcadores Genéticos e Auto Imunes do Diabetes Melito Tipo 1: da Teoria para a Prática. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo*. 2008;52(2):166-80.
7. Suzuki L, Poot M, Gerrity R, Bornfeldt K. Diabetes accelerates smooth muscle accumulation in lesions of atherosclerosis: lack of direct growth-promoting effects of high glucose levels. *Diabetes*. 2001;50:851-60.
8. Kim J, Sears D. TLR4 and insulin resistance. . *Journal [serial on the Internet]*. 2010 Date.
9. Guimarães F, Takayanagui A. Orientações recebidas do serviço de saúde por pacientes para o tratamento do portador de diabetes mellitus tipo 2. *Revista de Nutrição de Campinas*. 2002;15(1):37-44.
10. Pinhas-Hamel O, Zeitler P. The global spread of type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *Journal of Pediatrics* 2005;146:693-700.
11. Hanna F, Peters J. Screening for gestational diabetes; past, present and future. *Diabetic Medicine*. 2002;19:351-8.
12. Musso C, Cochran E, Moran S, Skarulis M, Oral E, Taylor S, et al. Clinical course of genetic diseases of the insulin receptor (type A and Rabson-Mendenhall syndromes): a 30-year prospective. *Medicine (Baltimore)*. 2004;83(4):209-22.
13. Oliveira C, Furuzawa G, Reis A. Diabetes Mellitus do Tipo MODY. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo*. 2002;46(2):189-92.
14. Wild S, Bchir M, Roglic G, Green A, Sicree R, King M. Global Prevalence of Diabetes Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004;27:1047-53.
15. Jay D, Hitomi H, Griendling K. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radical Biology & Medicine*. 2006;40:183-92.
16. Ginsberg H. Insulin resistance and cardiovascular disease. *The Journal of Clinical Investigation*. 2000;106(4):453-8.
17. Corrêa-Giannella M, Vieira S. A Predisposição Genética para o Desenvolvimento da Microangiopatia no DM. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo* 2008;55(2):375-68.
18. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. . *Nature*. 2001;414(13):813-20.
19. Association AD. Clinical Practice Recommendations. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*; 2003. p. 5-20.

20. Gross J, Silveiro S, Camargo J, Reichelt A, Azevedo M. Diabetes Mellito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo*. 2002;46(1):16-26.
21. Bry L, Chen P, Sacks B. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assay for glycohemoglobin. *Clinical Chemistry* 2001;47:153-63.
22. Bem A, Kunde J. A importância da determinação da hemoglobina glicada no monitoramento das complicações crônicas do diabetes mellitus. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2006;42(3):185-91.
23. Monnier V. Intervention against the Maillard reaction in vivo. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2003;419(1):1-15.
24. Singh R, Barden A, Mori T, L LB. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*. 2001;44:129-46.
25. Barbosa J, Oliveira S, Seara L. O Papel dos Produtos Finais da Glicação Avançada (AGEs) no Desencadeamento das Complicações Vasculares do Diabetes. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo*. 2008;52(6):940-50.
26. Galler A, Müller G, Schinzel R, Kratzsch J, Kiess W, Münch G. Impact of Metabolic Control and Serum Lipids on the Concentration of Advanced Glycation End Products in the Serum of Children and Adolescents With Type 1 Diabetes, as Determined by Fluorescence Spectroscopy and N_ε-(Carboxymethyl) Lysine ELISA. *Diabetes Care*. 2003;26(9):2609-15.
27. Ahmed N. Advanced glycation endproducts—role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2005;67:3-21.
28. Ulrich P, Cerami A. Protein Glycation, Diabetes, and Aging. *Recent Progress in Hormone Research*. 2001;56:1-21.
29. Goldberg T, Cai W, Peppas M, Dardaine V, Baliga B, Uribarri J, et al. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *Journal of the American Dietetic Association* 2004;104(8):1287-91.
30. Vlassara H, Palace M. Diabetes and advanced glycation endproducts. *Journal of Internal Medicine*. 2002;251:87-101.
31. Sattarahmady N, Moosavi-Movahedi A, Ahmad F, Hakimelahi G, Habibi-Rezaei M, Saboury A, et al. Formation of the molten globule-like state during prolonged glycation of human serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007;1770:933-42.
32. Rondeau P, Bourdon E. The glycation of albumin: Structural and functional impacts. *Journal [serial on the Internet]*. 2010 Date.
33. Sattarahmady N, Moosavi-Movahedi A, Habibi-Rezaei M. A Biophysical comparison of human serum albumin to be glycated in vivo and in vitro. *Journal of Medical Biochemistry* 2011;30:5-10.
34. Schmitt A, Schmitt J, Münch J, Gasic-Milencovica J. Characterization of advanced glycation end products for biochemical studies: side chain modifications and fluorescence characteristics. *Analytical Biochemistry*. 2005;338:201-15.
35. Nakajou K, Watanabe H, Kragh-Hansen U, Maruyama T, Otagiri M. The effect of glycation on the structure, function and biological fate of human serum albumin as revealed by recombinant mutants. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2003;1623:88-97.
36. Zhu P, Yang C, Chen L, Ren M, Lao G, Yan L. Impairment of human keratinocyte mobility and proliferation by advanced glycation end products-modified BSA. *Journal [serial on the Internet]*. 2010 Date.

37. Tupe R, Agte V. Interaction of Zinc, Ascorbic Acid, and Folic Acid in Glycation with Albumin as Protein Model. *Biological Trace Element Research*. 2010;138:346–57.
38. Valencia J, Weldon S, Quinn D, et al. Advanced glycation end product ligands for the receptor for advanced glycation end products: biochemical characterization and formation kinetics. *Analytical Biochemistry* 2004;324:68-78.
39. Monnier V, Sell D, Genuth S. Glycation products as markers and predictors of the progression of diabetic complications. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2005;1043(567-581).
40. Hamza I. Intracellular Trafficking of Porphyrins. *Acs Chemical Biology* 2006;1(10):627-9.
41. Tominaga T. Estudos Espectroscópicos da Porfirina Aniônica Hidrossolúvel Meso-tetrakis (P-fenilsulfonato) em Meio Micelar. *Revista Ciências Exatas e Naturais*. 2007;9(1):9-21.
42. Mussi L. Eficiência fotodinâmica das protoporfirinas IX, de magnésio e zinco [Dissertação]. Campinas: UNICAMP; 2003.
43. Bellini M, Coutinho E, Courrol L, Silva F, Vieira N, Schor N. Correlation between autofluorescence intensity and tumor area in mice bearing renal cell carcinoma. *Journal of Fluorescence*. 2008;18:1163-8.
44. Stedile R. Porfirias e Ictericia. [Seminário]. In press 2004.
45. Vogeser M, Jacob K, Zachoval R. Erythrocyte Protoporphyrins in Hepatitis C Viral Infection. *Clinical Biochemistry*. 2000;33.
46. Labblé R, Vreman H, Stevenson D. Zinc Protoporphyrin: A Metabolite with a Mission. *Clinical Chemistry*. 1999;45(12):2060-72.
47. Doss M, Verspohl F. The "Glucose Effect" in Acute Hepatic Porphyrias and in Experimental Porphyria. *Journal of Molecular Medicine*. 1981;59:727-35.
48. Lakowicz J. Introduction to fluorescence. In: Springer, editor. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3 ed. New York; 2006. p. 1-26.
49. Ramanujam N. Fluorescence spectroscopy in vivo. In: Ltda CJWS, editor. *Encyclopedia of analytical chemistry*; 2000. p. 20-56.
50. Suhling K. Detectors for Fluorescence Imaging [Power Point presentation]. London; 2010.
51. Cavalcante M, Tavoraro C. Uma oficina de física moderna que vise a sua inserção no ensino médio. *Caderno Catarinense de Ensino em Física*. 2001;18(3):297-315.
52. Melchiades F, Boschi A. Cores e Tonalidades em Revestimentos Cerâmicos. *Cerâmica Industrial*. 1999;4:1-6.
53. Filho J. Identificação e quantificação de fotossensibilizador em tecido hepático por espectroscopia de fluorescência e sua importância na terapia fotodinâmica [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2007.
54. Bottiroli G, Croce A. Autofluorescence spectroscopy of cells and tissues as a tool for biomedical diagnosis. In: photobiology ESf, editor. *Laser and Current Optical Techniques in Biology*. UK; 2004. p. 189-210.
55. Lakowicz J. Fluorophores. In: Springer, editor. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3 ed. New York; 2006. p. 63-95.
56. Lakowicz J. Instrumentation for fluorescence spectroscopy. In: Springer, editor. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3 ed. New York; 2006. p. 27-61.
57. Hariri L, Liebmann E, Marion S, Hoyer P, Davis J, Brewer M, et al. Simultaneous optical coherence tomography and laser induced fluorescence

- imaging in rat model of ovarian carcinogenesis. *Cancer Biology & Therapy* 2010;10(5):438-47.
58. Oldfield M, Bach L, Forbes J, Nikolic-Paterson D, McRobert A, Thallas V, et al. Advanced glycation end products cause epithelialmyofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *The Journal of Clinical Investigation*. 2001;108:1853–63.
59. Menéndez S. Panorama de los tratamientos actuales disponibles para los pacientes con diabetes tipo 2. Algoritmo terapéutico de la ADA/EASD. Seguridad y tolerabilidad. *Atención Primaria*. 2010;42(1):24-32.
60. Arnolds S, Dellweg S, Clair J, Dain M, Nauck M, Rave K, et al. Further improvement in postprandial glucose control with addition of exenatide or sitagliptin to combination therapy with insulin glargine and metformin: a proof-of-concept study. *Diabetes Care*. 2010;33(7):1509-15.
61. Zimmet P, Alberti K, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 2001;414:782-7.
62. Kalousová M, Skrha J, Zima T. Advanced Glycation End-Products and Advanced Oxidation Protein Products in Patients with Diabetes Mellitus. *Physiological Research* 2002;51:597-604.
63. Franciosi M, Lucisano G, Pellegrini F, Cantarello A, Consoli A, Cucco L, et al. ROSES: role of self-monitoring of blood glucose and intensive education in patients with Type 2 diabetes not receiving insulin. A pilot randomized clinical trial. *Journal [serial on the Internet]*. 2011 Date.
64. Bugaj A, Morlière P, Santus R, Haigle J, Dyderski S. Phototoxicity of protoporphyrin IX, diarginine diprotoporphyrinate and N,N-diphenylalanyl protoporphyrin toward human fibroblasts and keratinocytes in vitro: effect of 5-methoxypsoralen. *Photochemistry and Photobiology* 2004;80(3):486-91.
65. Fauaz G, Miranda A, Gomes C, Courrol L, Silva F, Rocha F, et al. Erythrocyte Protoporphyrin Fluorescence as a Potential Marker of Diabetes. *Applied Spectroscopy*. 2010;64(4):391-5.
66. Maza DL, Bravo A, Leiva L, Gattás V, Petermann M, Garrido F, et al. Fluorescent serum and urinary advanced glycoxidation end-products in non-diabetic subjects. *Biological Research*. 2007;40:203-12.
67. Rubio-Ruiz M, Díaz-Díaz E, Cárdenas-Léon M, Arguelles-Medina R, Sánchez-Canales P, Larrea-Gallo F, et al. Glycation does not modify bovine serum albumin (BSA)-induced reduction of rat aortic relaxation: The response to glycated and nonglycated BSA is lost in metabolic syndrome. *Glycobiology*. 2008;18 (7):517-25.
68. Gallicchio M, McRobert E, Tikoo A, Cooper M, Bach L. Advanced Glycation End Products Inhibit Tubulogenesis and Migration of Kidney Epithelial Cells in an Ezrin-Dependent Manner. *Journal of the American Society of Nephrology* 2006;17(414-421).
69. Neumann A, Schinzel R, Palm D, Riederer P, Munch G. High molecular weight hyaluronic acid inhibits advanced glycation end-products induced NF-kappaB activation and cytokine expression. *FEBS Letters*. 1999;453:283-7.
70. Coussons P, Jacoby J, Mckay A, Kelly S, Price N, Hunt J. Glucose modification of human serum albumin: a structural study. *Free Radical Biology & Medicine*. 1997;22(7):1217-27.
71. Wong R, Pettit A, Davies J, Ng L. Augmentation of the Neutrophil Respiratory Burst Through the Action of Advanced Glycation End Products. A Potential Contributor to Vas

- cular Oxidant Stress. *Diabetes*. 2002;51:2846-53.
72. Rashid G, Korzets Z, Bernheim J. Advanced Glycation End Products Stimulate Tumor Necrosis Factor- Alpha and Interleukin-1 Beta Secretion by Peritoneal Macrophages in Patients on Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis. *Israel Medical Association Journal* 2006;8:36-9.
73. Szapacs M, Riggins J, Zimmerman L, Liebler D. Covalent adduction of human serum albumin by 4-hydroxy-2-nonenal: kinetic analysis of competing alkylation reactions *Biochemistry* 2006;45:10521-8.
74. Bhatwadekar A, Ghole V. Rapid Method for the Preparation of an AGE-BSA Standard Calibrator Using Thermal Glycation. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 2005;19:11-5.
75. Vlassara H, Strikert LJ, Teichberg S, Fuh H, Li YM, Steffe M. Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1994;91:11704 - 8.
76. Beisswenger P. Glycation and biomarkers of vascular complications of diabetes. *Journal [serial on the Internet]*. 2010 Date.
77. Borch-Johnsen K, Norgaard K, Hommel E, Mathiesen E, Jensen J, Deckert T, et al. Is diabetic nephropathy an inherited complication? *Kidney International*. 1992;41(4):719-22.
78. Ceriello A, Hanefeld M, Leiter L, Monnier L, Moses A, Owens D, et al. Postprandial glucose regulation and diabetic complications. *Archives of Internal Medicine*. 2004;164(19):2090–5
79. Beisswenger P, Howell S, O'Dell R, Wood M, Touchette A, Szwegold B. Alpha dicarbonyls increase in the postprandial period and reflect the degree of hyperglycemia. *Diabetes Care* 2001;24(726–732).
80. Peters A, Davidson M, Schriger D, Hasselblad V. A clinical approach for the diagnosis of diabetes mellitus: an analysis using glycosylated hemoglobin levels: Meta-analysis Research Group on the Diagnosis of Diabetes Using Glycated Hemoglobin Levels *Journal of the American Medical Association*. 1997;276:1246-52.
81. Monnier L, Colette C. Contributions of fasting and postprandial glucose to hemoglobin a1c. *Endocrine Practice* 2006;1:42-6.
82. Lin Y, McDonough S, Sharma Y, Chang Y. Leptospira immunoglobulin-like protein B (LigB) binding to the C-terminal fibrinogen aC domain inhibits fibrin clot formation, platelet adhesion and aggregation. *Journal [serial on the Internet]*. 2010 Date.
83. Parracino A, Gajula G, Gennaro A, Neves-Petersen M, Rafaelsen J, Petersen S. Towards Nanoscale Biomedical Devices in Medicine: Biofunctional and Spectroscopic Characterization of Superparamagnetic Nanoparticles. *Journal of fluorescence*. 2010.
84. Inaguma M, Hashimoto K. Porphyrin-Like Fluorescence in Oral Cancer. *Cancer*. 1999;86(11):2201-11.