

Efeito do diabetes mellitus gestacional sobre a estabilidade de eritrócitos humanos

Effect of gestational diabetes mellitus on the stability of human erythrocytes

Júnia Marise Ramos¹; Cleide Chagas da Cunha Faria²

Cleine Chagas da Cunha³

1. Graduada em Fisioterapia pelo Centro Universitário de Patos de Minas
2. Enfermeira, Mestre em Promoção da Saúde pela Universidade de Franca. Docente no Centro Universitário de Patos de Minas.
3. Fisioterapeuta, Mestre em Bioquímica pela Universidade Federal de Uberlândia. Docente no Centro Universitário de Patos de Minas. e-mail: cleinec@hotmail.com

Resumo: *Objetivo:* Verificar os efeitos do Diabetes Mellitus Gestacional (DGM) e de variáveis bioquímicas sobre a estabilidade de membrana de eritrócitos humanos (H_{50}). *Metodologia:* Participaram do estudo 12 gestantes com idade gestacional mínima de 24 semanas, sendo 4 portadoras de DMG e 8 normais para essa condição. Os valores de H_{50} e das variáveis bioquímicas foram comparados entre os grupos por análise de variância (ANOVA). *Resultados:* Não houve diferença significativa entre os grupos nos valores de H_{50} . O grupo com DMG apresentou valores aumentados de glicemia pós-dextrose e de plaquetas em relação ao grupo controle ($P < 0,05$). Não ocorreram diferenças nos valores das demais variáveis bioquímicas. Apesar de apresentar maiores valores de glicemia pós-dextrose, o grupo DMG não apresentou glicemia de jejum alterada. Não houve correlação dos valores de H_{50} com as variáveis bioquímicas. *Conclusão:* H_{50} não constitui um marcador importante no diagnóstico de DMG. Estudos maiores são necessários.

Palavras-chave: DMG. Estabilidade de membranas. Eritrócitos.

Abstract: *Objective:* To investigate the effects of Gestational Diabetes Mellitus (GDM) and biochemical variables on the stability of the membrane of human erythrocytes (H_{50}). *Methodology:* The study included 12 pregnant women with gestational age less than 24 weeks, being 4 who carry GDM and 8 normal for this condition. The values of H_{50} and biochemical variables were compared between groups by analysis of variance (ANOVA). *Results:* No significant difference between groups in the amounts of H_{50} . The GDM group has increased values of blood glucose after dextrose and platelets in the control group ($P < 0.05$). There were no differences in the values of other biochemical variables. Despite showing higher values of blood glucose after the dextrose, group GDM did not show impaired fasting glucose. There was no correlation of the values of H_{50} with the biochemical variables. *Conclusion:* H_{50} is not an important marker in the diagnosis of GDM. Larger studies are needed.

Keywords: GDM. Stability of membranes. Erythrocytes

Introdução

No período de gestação a função endócrina é alterada, sendo a causadora da maioria das doenças mais devastadoras da gravidez. Dentre as doenças causadas por disfunções endócrinas que afetam gestantes, a mais comum é o Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) (STEPHENSON, 2004).

O DGM é definido como qualquer grau de intolerância à glicose com início ou primeiro reconhecimento durante a gravidez. É caracterizado por uma resistência à insulina com um aumento compensatório das células beta do pâncreas e hiperinsulinemia devido aos hormônios liberados pela placenta (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION - ADA, 2009).

O aumento na incidência e prevalência do DMG é um fenômeno mundial. A prevalência pode variar de 1% a 14% das gestações, dependendo da população estudada; nos EUA é responsável por aproximadamente 135.000 casos anualmente (ADA, 2009).

Todas as mulheres estão sujeitas a desenvolver DMG, apesar de vários fatores estarem associados, como ter história de diabetes na família, obesidade ou ganho excessivo de peso durante a gravidez. É considerada uma gravidez de alto risco, pois pode repercutir em várias disfunções tanto para a mãe quanto para o bebê (GAMBA *et al.*, 2005).

Seu diagnóstico se dá por volta da 24^a à 28^a semana de gestação, por ser um período em que a liberação dos hormônios lactogênio, placentário, cortisol, estrógenos e insulinas placentárias estão aumentados, favorecendo o estado diabetogênico (HALBE, 1982).

O diabetes gestacional é reversível, porém essas pacientes tendem a apresentar uma maior incidência de intolerância à glicose em gestações subsequentes ou com o passar dos anos (SMITH, 2005).

Nos últimos anos há um aumento crescente no número de programas e opções terapêuticas para o acompanhamento e tratamento dessas gestantes com a finalidade de melhorar o controle diabético, diminuindo complicações clínicas e obstétricas tanto para a mãe quanto para o bebê, que pode vir a ter complicações endócrino-metabólicas adquiridas durante a gestação.

Assim, compreender os mecanismos das doenças é de vital importância para empregar a terapêutica correta. Dessa forma, o estabelecimento de um estudo dos efeitos do DMG sobre as membranas biológicas pode contribuir significativamente para o desenvolvimento de práticas terapêuticas medicamentosas e nutricionais que poderão resultar na minimização das complicações do diabetes e na melhora da qualidade de vida desses pacientes.

Esse trabalho teve como objetivo verificar os efeitos do DMG sobre a estabilidade de membrana de eritrócitos humanos, comparando marcadores da estabilidade de membrana entre gestantes diabéticas e não-diabéticas, correlacionando parâmetros bioquímicos, marcadores da estabilidade, dados antropométricos e indicadores biológicos.

Materiais e métodos

Ética em pesquisa

O presente estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa

do UNIPAM (Protocolo 70/09) e as 12 voluntárias participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Sujeitos – Casuística

Trata-se de um estudo descritivo analítico transversal. A amostra foi recrutada dentre as gestantes que fizeram o acompanhamento na rede pública e particular. Ela foi constituída de 4 mulheres portadoras de DMG e 8 gestantes sem DMG. As voluntárias foram recrutadas de acordo com preenchimento de requisitos para um dos seguintes grupos:

Grupo I, Gestantes: gestantes com idade entre 15 e 40 anos, sem nenhuma patologia, escolhidas aleatoriamente, de acordo com a ordem de aparecimento e a necessária concordância em participar da pesquisa, com base apenas no diagnóstico.

Grupo II, Gestantes com Diabetes Mellitus Gestacional: gestantes que desenvolveram diabetes durante a gestação atual, escolhidas aleatoriamente e a necessária concordância em participar da pesquisa, com base apenas no diagnóstico.

Cada gestante respondeu um questionário sobre seu estado de saúde e foi submetida a uma avaliação física para coleta de dados antropométricos e coletas de sangue por punção venosa no Laboratório de Análises Clínicas do UNIPAM, em dois momentos diferentes, um após jejum de 8 a 14 horas e outro após uma refeição.

Determinação da fragilidade osmótica de eritrócitos humanos em NaCl

O sangue foi coletado, por punção venosa, em tubos evacuados (5 mL), contendo o anticoagulante K₄EDTA a 1 g.dL⁻¹. O procedimento da coleta ocorreu no Laboratório de Análises Clínicas do UNIPAM após jejum noturno de 8 a 14 horas.

A cada microtubo de uma bateria contendo 1 mL de soluções com concentrações entre 0 a 0,9% de NaCl, pré-incubados a 37 °C por 10 minutos, foram adicionados 10 µL de sangue. Após homogeneização e incubação dos tubos por 20 minutos a 37°C, eles foram centrifugados a 3400 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. Os sobrenadantes, então, foram avaliados quanto à densidade óptica em 540 nm (*A*₅₄₀) em espectrofotômetro. Os experimentos foram conduzidos com cada tubo em duplicata. A estabilidade foi determinada após ajuste da dependência da absorvância com a concentração de NaCl a uma linha de regressão sigmoidal dada pela equação de Boltzmann,

$$A_{540} = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(H-H_{50})/dH}} + A_2$$

onde *A*₁ e *A*₂ representam os valores nos platôs máximo ou mínimo de hemólise, *H* é a concentração de NaCl, *H*₅₀ representa a concentração de NaCl que causa 50% de hemólise, e *dH* é a amplitude de transição sigmoidal entre *A*₁ e *A*₂ (**figura 1**). Assim, para cada voluntária foi gerado um *H*₅₀ que fora posteriormente analisado. Os dados foram editados e analisados no aplicativo Origin 7.5 (Microcal).

Determinação de variáveis hematológicas e bioquímicas

Estas análises foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas do UNIPAM. As variáveis hematológicas são decorrentes de hemograma completo e as variáveis

bioquímicas são constituídas das dosagens séricas de colesterol total e frações, triglicérides, glicemia de jejum, glicemia uma hora pós-dextrose e albumina.

Reagentes e equipamentos

O reagente (NaCl) utilizado foi da marca Synth e a pureza foi devidamente corrigida no preparo das soluções. As medidas de volume foram realizadas em pipetas graduadas de vidro refratário e pipetas automáticas da marca Labsystems, modelo Finnpiquette Digital. As medidas de massa foram feitas em uma balança digital da marca AND, modelo 870. As incubações foram feitas em banho termostático Marconi, modelo MA 184. As medidas de massa foram feitas em uma balança digital de precisão (AND, modelo 870). O NaCl utilizado para os experimentos foi adquirido da Synth (São Paulo, Brasil) com grau de pureza de 99,5%, o qual foi devidamente corrigido no preparo das soluções. As determinações de volume foram feitas em buretas de vidro refratário ou pipetas automáticas (Labsystems). As incubações foram feitas em banho termostático (Marconi, MA 184). A centrifugação foi realizada em centrífuga da marca Hitachi Koki (modelo CF15RXII). As leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro Shimadzu modelo UV1650TC.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa ORIGIN 7.5 (Microcal). Os valores de H_{50} , de variáveis hematológicas e de variáveis bioquímicas foram comparados entre os grupos por análise de variância (ANOVA), considerando $p < 0,05$ como diferença estatisticamente significativa.

Também se estudaram as possíveis dependências entre variáveis hematológicas e bioquímicas e a estabilidade de membranas através de correlações e regressões lineares. As dependências foram consideradas significantes quando os valores de p foram menores do que 0,05.

Resultados

A **tabela 1** mostra a média e o desvio padrão dos valores de H_{50} , dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de gestantes com DMG e sem DMG. A ocorrência de diferenças significativas entre as variáveis de ambos os grupos também é apresentada na tabela. Houve diferença significativa quando comparadas as plaquetas das gestantes com DMG e sem DMG e quando comparada a glicemia pós-dextrose dos dois grupos. A contagem de plaquetas e a glicemia pós-dextrose foram maiores no grupo DMG. Não ocorreu diferença significativa em nenhum outro parâmetro estudado. Assim, o DMG não alterou a estabilidade das membranas. Os grupos eram similares em relação à idade ($p=0,06$), sendo as idades médias de $26,0 \pm 5,2$ anos e $25,6 \pm 5,4$ anos, respectivamente, do grupo controle e grupo DMG.

Discussão

A variável H_{50} , considerada neste estudo, representa a concentração de NaCl necessária para promover 50% de lise dos eritrócitos diante de um gradiente decrescente de tonicidade. Ela constitui, portanto, uma estimativa direta da fragilidade osmótica dos eritrócitos ou uma estimativa indireta da estabilidade de eritrócitos contra hipoto-

nicidade. Assim, quanto menores os valores de H_{50} menos frágeis ou mais estáveis devem ser os eritrócitos contra choque hipotônico.

Como as propriedades e funções de uma membrana são dependentes do seu grau de fluidez, que é afetada pela sua composição (DELICONSTANTINOS, 1987), mudanças estruturais associadas à condição patológica das pacientes poderiam afetar a estabilidade de membranas. Porém, não houve diferença significativa dos valores de H_{50} entre os grupos. Fatores ambientais, como pressão e temperatura (CUNHA et al., 2007; PENHA-SILVA et al., 2008) não devem ter interferido nos resultados porque foram devidamente controladas em nossos experimentos.

O diabetes leva a alterações na membrana que levam a complicações crônicas. Nesse aspecto, uma vez modificada a composição fosfolipídica da membrana, assume-se que a estabilidade da membrana também esteja alterada, tornando-se mais rígida ou fluida.

Uma vez que a insulina tem papel importante no metabolismo lipídico pode-se deduzir as implicações da deficiência de sua produção ou utilização. O diabetes leva a um aumento de síntese de triglicérides pelo fígado com consequente elevação do seu nível e de VLDL-colesterol na circulação. A insulina influencia também a ação da enzima lipase lipoproteica, diminuindo a velocidade de remoção plasmática de VLDL e quilomicrons e acúmulo destas partículas e seus componentes (principalmente triglicérides). A glicação de LDL e HDL também influencia o seu metabolismo com maior acúmulo do primeiro e remoção mais rápida do último (NELSON e COX, 2005).

Porém, a análise dos dados mostra ausência de diferença em variáveis que poderiam interferir na composição das membranas como colesterol total e frações, triglicérides e proteínas. Nesse contexto, é relevante ressaltar que os perfis analisados nesse estudo são de pacientes com assistência médica e que, de certo modo, tiveram acesso aos cuidados com a saúde, bem como assistência familiar. Essas condições podem favorecer o controle da doença e anular a diferença entre grupos. Outro fator é que o grupo controle é constituído por gestantes que também tendem a ter esses valores alterados. E, ainda, deve-se considerar o peso de amostra tão reduzida.

Houve diferença significativa nos valores de plaquetas entre os grupos. O grupo DMG apresentou valores maiores de plaquetas que o grupo controle. A literatura suporta esse resultado. Lima, Góis e Nóbrega (2005) apontam o aumento plaquetário como mais um fator responsável pelas complicações cardiovasculares de diabéticos. Os valores das demais variáveis hemodinâmicas estão reduzidos nos dois grupos e não há diferença entre eles. Tal redução está associada à anemia fisiológica da gestação. Existe relato de anemia relacionada a nefropatia em consequência do diabetes do tipo 1 (THOMAS et al., 2004). Porém, não existe associação na literatura com DMG.

Verifica-se a não-ocorrência de diferença significativa nos valores da glicemia de jejum entre os dois grupos. Entretanto, a glicemia pós-dextrose encontra-se aumentada no grupo DMG. A diferença dos valores glicêmicos pós-sobrecarga com dextrose era esperada. Tal fato é o que caracteriza a presença de DMG. Maganha e Zugaib (2005) afirmam que a glicemia de jejum é um método pobre para o diagnóstico de Diabetes Mellitus Gestacional, já que a hiperglicemia é um evento pós-sobrecarga.

Os valores de H_{50} determinados nesse estudo não apresentaram correlação com a idade. Em um estudo anterior, Penha-Silva et al. (2007) mostraram que a estabilidade de membrana de eritrócitos aumentou discretamente com o aumento da idade em uma população exclusivamente feminina constituída por 67 indivíduos com idades entre 20 e 94 anos, em que o critério de exclusão se baseava na presença de doença degenerativa. No presente trabalho a dimensão da população foi menor e a faixa etária foi mais curta.

Não houve correlação de H_{50} com nenhuma variável bioquímica. Tal resultado confronta relatos na literatura de que níveis aumentados de lipídios alteram a fluidez da membrana e, conseqüentemente, sua estabilidade. A ausência de correlação pode ser devida ao fato de que as dosagens desses parâmetros são séricas e não retratam necessariamente a constituição das membranas. Outra ocorrência pode ser a alteração na funcionalidade e não na estabilidade das membranas. As membranas precisam congrega estabilidade e fluidez para desempenhar com eficiência as designações exigidas pelo exercício de funções complexas, como a transdução de sinais hormonais para moléculas no interior da célula, onde elas vão regular funções celulares relacionadas com o metabolismo, a diferenciação e a proliferação (SINENSKY, 1974).

As alterações nas variáveis hemoquímicas também não se correlacionaram com a estabilidade de membrana. Fator decisivo pode ser o fato dos resultados serem apresentados em porcentagem de hemólise e não em valor absoluto.

Assim, pesquisas maiores e que utilizem protocolos mais específicos são necessárias para entender melhor as alterações específicas que levam ao DMG.

Conclusão

O determinante de estabilidade de membrana (H_{50}) não constitui um marcador importante no diagnóstico de DMG. Estudos maiores e com modelos que explorem principalmente a função das membranas são necessários na busca de práticas terapêuticas medicamentosas e nutricionais que poderão resultar na minimização das complicações do diabetes e na melhora da qualidade de vida desses pacientes.

Referências

ADA. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes 2009. *Diabetes Care*, v. 32, (Supl. 1), p. 13-61, 2009.

CUNHA, C.C.; ARVELOS, L.R.; COSTA, J.O.; PENHA-SILVA, N. Effects of glycerol on the thermal dependence of the stability of human erythrocytes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v. 39, p. 341-347, 2007.

DELICONSTANTINOS, G. Physiological aspects of membrane lipid fluidity in malignancy. *Anticancer Research*, v. 7, p. 1011-1021, 1987.

HALBE, Hans Wolfgang. *Ginecologia Endócrina*. São Paulo: Livraria Roca, 1982.

LIMA, J. G.; GÓIS, L. T.; NÓBREGA, L. H. C. Diabetes mellitus: uso de ácido acetilsalicílico (AAS). *Revista da Associação Médica Brasileira*. São Paulo, v. 51, n. 4. jul/ago, 2005.

MAGANHA, C. A.; ZUGAIB, M. *Diabetes Mellitus e Gravidez*, in: REZENDE, J. Obstetrícia. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 426-434, 2005.

NELSON, D.L.; COX, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th ed. New York, 2005, p. 1216.

PENHA-SILVA, N.; ARVELOS, L.R.; CUNHA, C.C.; AVERSI-FERREIRA, T.A.; GOVÊA-E-SILVA, L.F.; GARROTE-FILHO, M.S.; FINOTTI, C.J.; BERNARDINO-NETO, M.; DE FREITAS REIS, F.G.

Effects of glycerol and sorbitol on the thermal dependence of the lysis of human erythrocytes by ethanol. *Bioelectrochemistry*. Amsterdam, v. 73, p. 23-29, 2008.

PENHA-SILVA, N.; FIRMINO, C.B.; DE FREITAS REIS, F.G.; DA COSTA HUSS, J. C.; DE SOUZA, T. M. T.; DE FREITAS, M. V.; NETTO, R. C. M. Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. *Mechanisms of ageing and development*. Ireland, v. 128, p. 444-449, 2007.

SINENSKY, M. Homeoviscous adaptation. A homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Washington, v. 71, p. 522-525, 1974.

SMITH, R. P. *Ginecologia e Obstetrícia de Netter*. São Paulo: Editora Artmed, 2005.

STEPHENSON, R. G.; O'CONNOR, L. J. *Fisioterapia aplicada à ginecologia e obstetrícia*. Barueri: Manole, 2004.

THOMAS, M.C.; MACISAAC, R. J.; TSALAMANDRIS, C.; MOLYNEAUX, L.; GOUBINA, I.; FULCHER, G.; YUE, D.; JERUMS, George. Anemia in Patients with Type 1 Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Illinois, v. 89, n. 9, p. 4359-4363, 2004.

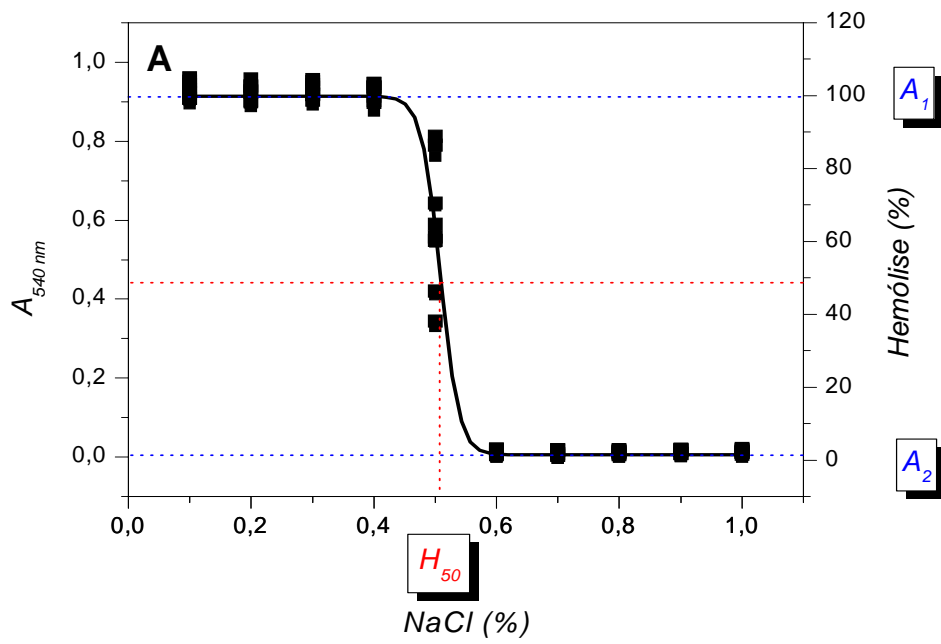


FIGURA 1. Lise de eritrócitos humanos por choque hipotônico.

TABELA 1. Efeito do DMG sobre os valores de H₅₀ e sobre parâmetros bioquímicos

	Gestantes com DMG	Gestantes sem DMG	P
H ₅₀	0,45±0,02 (n=4)	0,46±0,02 (n=8)	
Idade	26,3±7,3 (n=4)	28,1±6,6 (n=8)	
Hemácias	3,9±0,5 (n=4)	3,9±0,5 (n=8)	
Hemoglobina	11,6±1,0 (n=4)	11,9±1,0 (n=8)	
Hematócrito	35,5±3,2 (n=4)	35,8±3,1 (n=8)	
Leucócitos	6575±1309,9 (n=4)	8967,5±1443,6 (n=8)	
Plaquetas	207000±77730,3 (n=4)	202714,3±42683,8 (n=7)	*
Glicemia jejum	82,3±4,4 (n=4)	78,6±7,5 (n=8)	
Glicemia pós dextrosol	160,5±22,3 (n=4)	109,3±16,7 (n=8)	*
CT	251,8±65,08 (n=4)	253,5±33,5 (n=8)	
HDL	63,8±14,4 (n=4)	60±15,5 (n=8)	
Relação	4,1±1,4 (n=4)	4,6±1,7 (n=8)	
VLDL	33,3±7,3 (n=4)	46,2±16,6 (n=8)	
LDL	154,7±65,9 (n=4)	145,9±31,3 (n=8)	
Triglicérides	166,5±36,4 (n=4)	230,9±83,4 (n=8)	
Albumina	34,8±1,7 (n=4)	35±1,6 (n=7)	

*P<0,05 indicando diferenças estatisticamente significativas (Teste de Tukey)