

Efeito da gestação sobre a estabilidade de membrana de eritrócitos humanos

Effect of pregnancy on the stability of membrane of human erythrocytes

Marcela Caixeta¹; Cleide Chagas da Cunha Faria²
Cleine Chagas da Cunha³

1. Graduada em Fisioterapia pelo Centro Universitário de Patos de Minas - UNIPAM
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 o efeito da gestação sobre a estabilidade de membrana de eritrócitos humanos (H_{50}) e sobre variáveis bioquímicas. *Metodologia:* A amostra foi constituída por 8 mulheres gestantes e 8 não-gestantes. A estabilidade de eritrócitos (H_{50}) foi dada pela concentração de NaCl capaz de promover 50% de hemólise. As dosagens bioquímicas foram realizadas em laboratório especializado. *Resultados:* Não houve diferença estatística significativa entre os valores de H_{50} , idade, HDL, LDL e glicemia pós-dextrose de mulheres gestantes e não-gestantes. Os valores de hemácias, hematócrito, hemoglobina e glicemia de jejum foram significativamente maiores no grupo controle. Valores de colesterol total, VLDL, triglicérides, albumina e leucócitos foram significativamente maiores no grupo das gestantes (ANOVA). Não houve correlação entre os valores de H_{50} e de variáveis bioquímicas. *Conclusão:* É provável que as alterações produzidas nas membranas pela gestação estejam mais relacionadas com a função do que com a estabilidade das mesmas.

Palavras-chave: gestação, estabilidade de membranas, eritrócitos humanos.

Abstract: *Objective:* To investigate the effect of pregnancy on the stability of the membrane of human erythrocytes (H_{50}) and biochemical variables. *Methods:* The sample consisted of eight pregnant and eight non-pregnant women. The stability of erythrocytes (H_{50}) was given by the concentration of NaCl able to promote 50% hemolysis. The biochemical determinations were carried out in specialized laboratory. *Results:* No statistically significant differences between the values of H_{50} , age, HDL, LDL and glucose levels after dextrose of pregnant and non-pregnant. The values of red blood cells, hematocrit, hemoglobin and fasting glucose were significantly higher in the control group. Total cholesterol, VLDL, triglycerides, albumin and leukocytes were significantly higher in pregnant women (ANOVA). There was no correlation between the values of H_{50} and biochemical variables. *Conclusion:* It is likely that the changes in membranes produced by pregnancy are more related to function than with their stability.

Keywords: pregnancy, stability of membranes, human erythrocytes.

Introdução

A gravidez gera uma série de alterações anatômicas, fisiológicas e bioquímicas no organismo materno, que resultam em sinais e sintomas próprios. Provavelmente, em nenhuma outra fase da vida ocorram tantas modificações e mudanças no funcionamento e na forma do corpo humano em tão curto espaço de tempo (SOUZA, 1999). Os sistemas iniciam as mudanças desde as primeiras semanas de gestação e vão sofrendo modificações até o fim da mesma (ZIEGEL, 1985).

A grande maioria das gestações corre seu curso normalmente sem apresentar variações ou anormalidades. Apesar disso, há uma parcela de gestantes que, por terem características específicas ou por sofrerem algum agravo, apresentam maiores probabilidades de evolução desfavorável (BRASIL, 2001).

O presente estudo teve por objetivo verificar o efeito da gestação sobre a estabilidade de membrana de eritrócitos humanos (H_{50}) e sobre variáveis bioquímicas. As membranas biológicas desempenham inúmeras funções e qualquer alteração comprometedora de sua estabilidade e funcionalidade também afetará a estabilidade e funcionalidade da célula e, conseqüentemente, do organismo.

Compreender as alterações celulares decorrentes da gestação pode ser um passo importante para prevenção e/ou tratamento de patologias que possam acometer a gestante.

Materiais e métodos

Trata-se de um estudo descritivo analítico do tipo transversal.

Sujeitos da Pesquisa - Casuística

Fizeram parte da pesquisa 16 voluntárias, sendo 8 gestantes e 8 não-gestantes, incluídas de acordo com o preenchimento de requisitos para um dos tais grupos:

Grupo I: gestantes com idade gestacional maior do que 20 semanas.

Grupo II: mulheres não-gestantes e não-portadoras de patologias como diabetes mellitus, hipertensão arterial e doenças cardiovasculares.

As voluntárias foram recrutadas em diferentes situações: pessoas conhecidas, indicação de médicos da rede particular e pessoas que, sabendo da pesquisa, manifestaram o desejo de participar, desde que se enquadrassem nos pré-requisitos de um dos dois grupos a serem estudados.

A pesquisa foi realizada após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário de Patos de Minas, sob protocolo 70/09. As doadoras voluntárias das amostras de sangue foram informadas do projeto de pesquisa e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido em sinal de sua concordância com a participação no projeto.

Condições estudadas

- 1) Determinação da estabilidade de eritrócitos humanos conforme protocolo experimental no Laboratório de Bioquímica do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM).
- 2) Dosagens bioquímicas realizadas pelo Laboratório de Análises Clínicas do UNIPAM: hemograma completo, glicemia de jejum e uma hora pós 100g de dextrose, colesterol total e frações, triglicérides e albumina.

Coleta das amostras de sangue

As amostras de sangue foram coletadas pelo Laboratório de Análises Clínicas do UNIPAM por punção endovenosa, após jejum de 8 a 14 horas e após uma hora da ingestão de 100 g de dextrose, em tubos evacuados (Vacuntainer®). Para as dosagens bioquímicas foram coletadas amostras de sangue em tubos evacuados (Vacuntainer®) com anticoagulantes específicos para cada teste. Para estudo da estabilidade das membranas de eritrócitos humanos, foram utilizados tubos contendo 50 µL de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) 1g/100mL, como anticoagulante.

Reagentes e Equipamentos

O reagentes (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 termostaticado Marconi, modelo MA 184. A centrifugação foi realizada em centrífuga da marca Hitachi Koki (modelo CF15RXII). As leituras de absorvância foram feitas em espectrofotômetro Shimadzu modelo UV1650TC.

Protocolo experimental

Tubos de polietileno (Eppendorff®) recebiam 1,5 mL de solução com concentrações diferentes a cada duplicata. Após 10 minutos de pré-incubação nas temperaturas desejadas, eram acrescentados 10 µL de sangue aos tubos que eram fechados, homogeneizados, incubados por mais 20 minutos na referida temperatura e centrifugados a 3400 rpm por 10 minutos. Alíquotas de 1 mL de sobrenadante eram retiradas dos tubos e suas absorvâncias lidas a 540 nm.

Determinação da Lise

Os dados foram editados e analisados no aplicativo Origin 7.5 (Microcal). A dependência da absorvância com a concentração de NaCl foi ajustada a uma linha de regressão sigmoideal 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 sigmoideal entre A_1 e A_2 (**figura 1**). Assim, para cada voluntário foi gerado um H_{50} que fora posteriormente analisado.

Análise estatística

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

Estudaram-se também as possíveis correlações entre variáveis bioquímicas e a estabilidade de membranas através de regressões lineares, utilizando o coeficiente de Pearson como marcador das correlações, com $p < 0,05$ indicando correlação significativa.

Resultados

Diferença de parâmetros entre grupos

A **tabela 1** apresenta os valores médios de H_{50} de ambos os grupos bem como dos resultados das análises bioquímicas. Não houve diferença estatística significativa entre os valores de H_{50} , idade, HDL, LDL e glicemia pós-dextrose de mulheres gestantes e não-gestantes. Os valores de hemácias, hematócrito, hemoglobina e glicemia de jejum foram significativamente maiores no grupo controle. Já os valores de colesterol total, VLDL, triglicérides, albumina e leucócitos foram significativamente maiores no grupo das gestantes (ANOVA). Não houve correlação entre os valores de H_{50} e de variáveis bioquímicas.

Discussão

Os eritrócitos são considerados bons modelos de estudos de estabilidade de membranas biológicas, por serem de fácil obtenção e uma vez que sua lise permite a liberação de hemoglobina, que pode ser quantificada pela leitura espectrofotométrica de absorvância em 540nm (NELSON; COX, 2005).

Não houve diferença significativa dos valores de H_{50} entre os grupos. Assim H_{50} não parece um bom marcador para gravidez. A ausência de diferença entre os valores de H_{50} de ambos os grupos pode ter ocorrido pela baixa sensibilidade do protocolo proposto, pelo número restrito de participantes ou por ausência real de alterações na estabilidade das membranas das células. Um fator relevante é que essas gestantes não apresentavam condições desfavoráveis de saúde como diabetes, hipertensão ou cardiopatias. Isto reforça a ausência de comprometimento nas membranas. Alterações nas membranas poderiam levar a essas disfunções. Outra possibilidade é que as alterações da gestação estejam mais relacionadas com as funções das células do que com sua estabilidade de membrana. Assim, um protocolo que contemple funcionalidade da membrana poderia ser de mais valia.

A ausência de diferença na idade entre os dois grupos reforça a validade do estudo. Os dois grupos eram similares em relação à idade. Penha-Silva *et al.* (2007) relatam correlação entre idade e valores de H_{50} . Dessa forma, os resultados não foram influenciados pelo fator idade.

Os valores de colesterol total, VLDL, triglicérides foram significativamente maiores no grupo das gestantes. Este resultado é condizente com a literatura. Desoye *et al.* (1987) relatam que, durante a gestação, mulheres normais apresentam um aumento dos níveis de triglicerídeos plasmáticos, ocorrendo o seu pico máximo na metade do terceiro trimestre, chegando a valores até cinco vezes maiores do que os valores basais. Isso se deve ao aumento dos níveis de estrogênio e prolactina, que acarretariam maior produção hepática de lipoproteínas ricas em triglicerídeos (VLDL) e ao efeito lipolítico do hormônio lactogênico placentário sobre o tecido adiposo (WATTS *et al.*, 1992 e DESOYE *et al.*, 1987).

Houve também aumento do número de leucócitos no grupo das gestantes. Este dado também corrobora com a literatura. Segundo Ziegel (1985), a gravidez está asso-

ciada à supressão da função imunológica, devido à necessidade do organismo materno de acomodar um corpo "estranho". Por esse motivo, neste período, o número de leucócitos aumenta consideravelmente de 5.000 a 16.000 por mm^3 , especialmente no segundo e terceiro trimestre.

O aumento significativo na albuminemia também é relatado na literatura. A taxa de excreção de albumina é elevada em grávidas normais no terceiro trimestre de gravidez em relação aos dois primeiros trimestres, e também em comparação ao estado não gravídico (SANCHEZ *et al.*, 2003).

Os valores de hemácia, hematócrito e hemoglobina estão diminuídos no grupo de gestantes. É sabido que a gestação aumenta todos esses parâmetros. Na gestação, há uma elevação do volume sanguíneo total em cerca de 40 a 50%, como decorrência do aumento tanto do volume plasmático quanto da massa total de eritrócitos e leucócitos na circulação. No entanto, a elevação do volume plasmático e da massa eritrocitária não é proporcional e é controlada por diferentes mecanismos (SOUZA; FILHO; FERREIRA, 2002). Desse modo, indicadores hematológicos, tais como contagem de células vermelhas, níveis de hemoglobina e hematócrito reduzem-se drasticamente a partir do segundo trimestre da gestação. Essa hemodiluição leva a uma anemia conhecida como "fisiológica", sendo mais observada na segunda metade da gestação (SOUZA; FILHO; FERREIRA, 2002). Segundo Valadares e Dias (2007), as doenças hematológicas têm sido responsáveis por mais de 50% das complicações clínicas no período gestacional, com uma estreita relação com os níveis fisiológicos mantidos baixos de hemácias, plaquetas e proteínas.

A glicemia de jejum também foi menor no grupo de gestantes. Segundo Halbe, (1982) durante o estado de jejum a glicemia é significativamente baixa em relação a mulheres não-grávidas, pois há uma captação continuada de glicose pela placenta.

Não houve diferença significativa entre os grupos nos níveis de glicose pós-dextrose. Tal resultado é esperado uma vez que aumento das taxas glicêmicas pós-sobrecarga caracteriza diabetes mellitus gestacional que fora critério de exclusão na pesquisa. Porém, muito provavelmente, os níveis de insulina no grupo de gestantes encontram-se aumentados em detrimento do aumento da resistência à ação da insulina gerado pela ação hormonal e pelo aumento de peso. Em razão da resistência à insulina, a gestação é caracterizada pelo nível elevado de insulina circulante, uma vez que o pâncreas, em mulheres não-diabéticas, compensa a demanda periférica aumentada, mantendo as glicemias em níveis normais (GOLBERT e CAMPOS, 2008).

Dessa forma, na gestante há a tendência, após as refeições, de aumento nos níveis de glicose e insulina, e o armazenamento de lipídeos é estimulado. Durante o jejum, porém, os níveis de glicose diminuem e a lipólise é estimulada. Essas alterações provavelmente ocorrem para assegurar suprimento nutritivo adequado para a mãe e o feto.

O estudo também apresentou ausência de correlação dos valores de H_{50} com as variáveis bioquímicas. Era esperado que alterações nos níveis de colesterol e triglicérides alterassem a estabilidade de membrana, pois os lipídeos são importantes constituintes das membranas. A ausência de correlação pode ser devido ao fato de que as dosagens desses parâmetros são séricas e não retratam necessariamente a constituição das membranas. As alterações nas variáveis hemoquímicas também não se correlacionaram com a estabilidade de membrana. Fator decisivo pode ser o fato de os 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 da gestação. Pouco se conhece sobre tais aspectos, pois a literatura é bastante escassa e dificulta até mesmo a interpretação e discussão dos resultados.

Conclusão

Na população estudada a gestação não alterou H_{50} . É provável que as alterações produzidas pela gestação nas membranas estejam mais relacionadas com a função do que com a estabilidade das mesmas. Estudos maiores e que usam modelos relacionados à função das membranas são necessários para elucidar melhor os efeitos da gestação sobre as propriedades das membranas.

Referências

- BRASIL. Ministério da Saúde. *Gestante de alto risco: Sistemas estaduais de referência hospitalar à gestante de alto risco*. Ministério da Saúde, Secretaria Executiva p. 32, 2001.
- DESOYE, G.; SCHWEDITSCH, M.O.; PREIFFER, K.P.; ZECHNER, R.; KOSTNER, G.M. Correlation of hormones with lipid and lipoprotein levels during normal pregnancy and postpartum. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Baltimore, v. 12, n. 64, p. 704-12, 1987.
- 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.
- GOLBERT, A.; CAMPOS, M.A.A. Type 1 diabetes mellitus and pregnancy. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. São Paulo, v. 52, n. 2, p. 307-14, mar, 2008.
- HALBE, H.W. *Ginecologia Endócrina*. São Paulo: Livraria Roca, 1982.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th ed. New York: Worth, 2005, p. 1216.
- SANCHEZ, V.H.S.; BERTINI, A.M.; TABORDA, W.; BARROS, R.A.A.; HAGEMANN, C.C. Uso da microalbuminúria em amostras urinárias aleatórias para o rastreamento de pré-eclâmpsia em grávidas diabéticas. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. São Paulo, v. 25, n. 4, mai, 2003.
- SOUZA, A.I.; FILHO, M.B.; FERREIRA, L.O.C. Alterações hematológicas e gravidez. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. São Paulo, v. 24, n. 1, p. 29-36, mar, 2002.
- SOUZA, E.L.B.L. *Fisioterapia em obstetrícia & aspectos de neonatologia, uma visão multidisciplinar*. 2. ed. Belo Horizonte: Health, 1999.
- VALADARES, J.D.; DIAS, R.C. *Adaptações Fisiológicas da Gestação*, in: BARACHO, E. *Fisioterapia Aplicada à Obstetrícia, Uroginecologia e Aspectos de Mastologia*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 2, p. 17-34, 2007.
- ZIEGEL, E.E. *Enfermagem Obstétrica*. 2. ed. Rio de Janeiro: Discos CBS, 1985.
- WATTS, G.F.; MORTON, K; JACKSON, P; LEWIS, B; Management of patients with severe hypertriglyceridaemia during pregnancy: report of two cases with familial lipoprotein

lipase deficiency. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*. London, v. 99, n. 6, p. 163-6, Feb., 1992.

Tabela 1. Efeito da gestação sobre os valores de H_{50} e sobre parâmetros bioquímicos. * $P < 0,05$ indicando diferenças estatisticamente significativas (ANOVA)

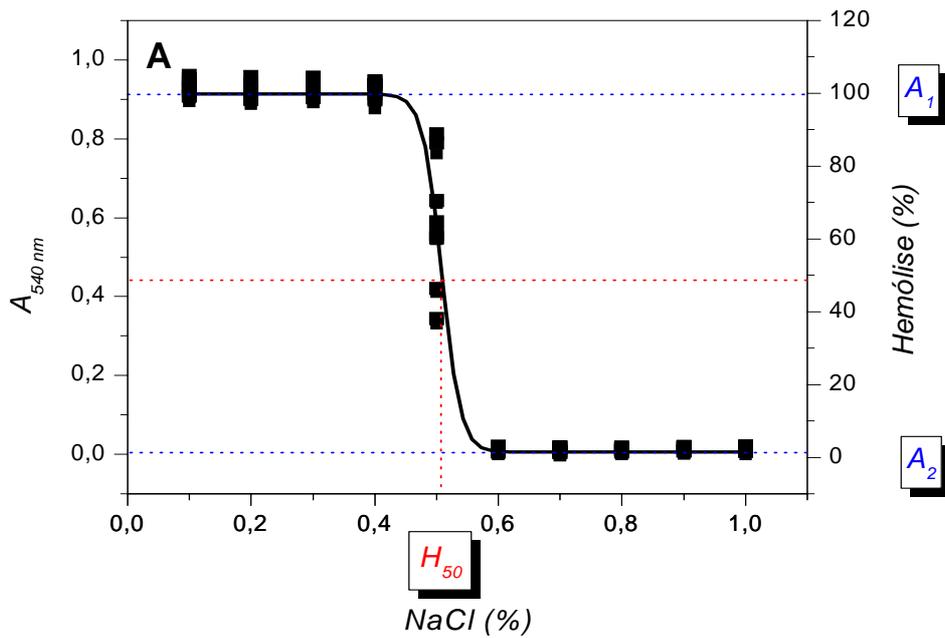


Figura 1- Curva típica da lise de eritrócitos humanos por choque hipotônico.