

GLUTATIÃO REDUZIDO E OXIDADO DA PLACENTA NA GRAVIDEZ COMPLICADA COM PREECLAMPSIA

J. NEVES, A. S. CRUZ, I. AZEVEDO, A. C. VAZ, P. VASCO, P. J. SANTOS E M. P. BICHO
Serviço de Obstetria e Ginecologia. Hospital de Santa Maria. Laboratório de Genética. Faculdade de Medicina de Lisboa. Lisboa

RESUMO

Sabe-se que os radicais livres de oxigénio tem um papel importante na patogenia da doença hipertensiva da gravidez, nomeadamente na variante preeclâmpsia. Ultimamente têm-se realizados vários estudos demonstrativos que a placenta, muito provavelmente, constitui uma importante fonte geradora dos radicais livres de oxigénio. O glutatião (GSH) é uma molécula que actua na protecção da lesão celular estando presente como cofactor de vários enzimas, nomeadamente a peroxidase do glutatião na placenta; este enzima previne a formação dos lipoperóxidos e a sua actividade está diminuída nos homogenatos de placenta de grávidas com preeclâmpsia. Estudamos por fluorometria, a molécula de glutatião nas suas duas formas, reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) em homogenatos de placenta obtidas imediatamente após o parto, de mulheres grávidas cuja gravidez decorreu sem intercorrências em oposição a mulheres com gravidez complicada com preeclâmpsia. Os resultados mostram que, as concentrações do GSH e do GSSG nas placentas de grávidas normais, são significativamente inferiores ás concentrações das mesmas moléculas nas placentas das grávidas com preeclâmpsia. A concentração aumentada das duas formas do glutatião nas placentas das grávidas com patologia, poderá resultar duma menor utilização do GSH quer pela peroxidase do glutatião quer por outros mecanismos protectores da lesão celular.

SUMMARY

Reduced and oxidated glutathione in placental homogenates of pregnant women with preeclampsia

Significative enhancement of free radical formation (FRO) in vivo is an important feature of hypertensive disorders of pregnancy (HDP), namely preeclampsia (PIH). The latest investigations about the pathology of HDP, showed the contribution of placental circulation to the development and evolution of such disease. The placental bed can be a potential source of FRO or activation of cells that can produce FRO. Glutathione, is an important molecule for cellular protection against damage, is a cofactor of many enzymes, in particular, for the glutathione peroxidase of the placental tissue; this enzyme in the placenta bed prevent the production of Thromboxan and Lipoperoxides; the latter are potentially damaging to the endothelium cells and can cause vasoconstriction, the most important feature of PIH. The activity of that enzyme is deficient in PIH. We studied, by fluorometric assay, the concentrations of the two states of glutathione in placental homogenates (PLH) from pregnant women without pathology (PWN) and from pregnant women with PIH (PWPIH). The data showed significant low concentrations in the PLH of the two states of glutathione in the PWN against high concentrations of this molecule in the PLH from PWPIH. This feature can result from a deficient user of the glutathione by the cellular mechanism for prevention against oxidative factors. In addition, our study shows a biochemical marker that is suggestive that the placental bed is a potential source of FRO production in PIH.

INTRODUÇÃO

A doença hipertensiva induzida pela gravidez (DHIG) é a complicação médica mais comum nas grávidas, ocorrendo em 7% das primíparas; é a causa mais frequente de atraso de crescimento intrauterino-ACIU¹.

A preeclâmpsia, uma das variantes da DHIG, é exclusiva na gravidez da espécie humana; ocorre em cerca de 5% das mulheres grávidas e pode causar graves consequências maternas ou fetais. O diagnóstico depende da presença de hipertensão, associada a edemas e/ou proteiúria².

A produção endógena de radicais livres de oxigénio (RLO) está aumentada na gravidez sem intercorrências, sendo este aumento de produção, significativamente superior na gravidez complicada com preeclâmpsia³.

Actualmente, está comprovada a presença dos RLO na fisiopatologia da preeclâmpsia, nomeadamente no que diz respeito à lesão vascular proporcionando o aparecimento do fenómeno mais conhecido nesta patologia da gravidez, a **vasoconstrição**, sobretudo ao nível da microcirculação. A preeclâmpsia associa-se a vasospasmo, com lesões em múltiplos órgãos, incluindo o leito vascular utero-placentar⁴.

Para além de provocar a lesão vascular, os RLO podem bloquear a acção dos mais importantes factores vasodilatadores, como o factor relaxante do endotélio (EDRF) e duma variante dos prostanóides, a Prostaciclina⁴.

Ultimamente e duma forma progressiva, estão a ser descritos marcadores bioquímicos que indicam a placenta como uma das potenciais fontes geradora de RLO na preeclâmpsia; clinicamente, o controle desta patologia, é favorecido pela dequitação.

Num estudo realizado, recentemente foi demonstrada a deficiência da actividade da peroxidase do glutatião nos homogenatos de placenta, na preeclâmpsia. A peroxidase do glutatião da placenta previne a formação dos lipoperóxidos (LPO) a partir do ácido araquidónico (AA), por acção da lipoxigenase, uma vez que ao diminuir a formação dos peróxidos evita assim, que a biotransformação do AA siga preferencialmente, a via dos tromboxanos e dos LPO⁵.

Os LPO são potencialmente trombogénicos em virtude de serem promotores da lesão endotelial e interferirem com o sistema de coagulação através do consumo das plaquetas e do aumento da fibrinólise³.

Os efeitos dos LPO, são potenciados pelos efeitos do radical anião superóxido (O₂⁻), um RLO com um importante papel na patogenia da preeclâmpsia que, por sua vez, provoca um desequilíbrio entre a síntese de Tromboxano A₂ e da Prostaciclina favorecendo o primeiro e actuando assim como potencial vasoconstrictor. O superóxido, também aumenta a agregação plaquetária e induz a formação dos LPO a partir dos ácidos gordos das membranas particularmente do grupo 3-oméga⁶.

Outro aspecto que põe em evidência a importância da placenta na preeclâmpsia, são os **neutrófilos**. Estas células estão implicadas na fisiopatologia da preeclâmpsia quer por fenómenos imunológicos, via os leucotrienos, quer pela libertação de produtos biologicamente activos

e sabe-se que os neutrófilos, são parcialmente activados na placenta^{4,6}.

O **glutatião**, é um tripéptido descoberto em 1898; a sua composição química foi descrita em 1929 por Hopkins; é constituído por ácido glutâmico, cisteína e glicina⁷. Possui funções relevantes na acção enzimática, no transporte celular de oligoelementos e pequenas moléculas, em aspectos relacionados com a farmacologia, endocrinologia e microbiologia, na biologia das radiações, nas respostas à terapêutica oncológica e na acção de agentes tóxicos⁸.

É uma molécula protectora da lesão celular; actua como um importante agente redutor celular e dos líquidos biológicos; duas moléculas do GSH (glutatião reduzido) cedem dois prótons e electrões para originar o GSSG (glutatião oxidado)⁷.

O glutatião, também é um depurador dos radicais hidroxilo (OH) e do superóxido; as reacções químicas de inactivação dos radicais atrás referidos dependem da acção de enzimas S-transferases; seja por acção destes enzimas ou pela catalase originam-se produtos da dismutação do O₂⁻. É por esta via bioquímica, que o glutatião participa na destruição do RLO.

O glutatião pode reactivar enzimas que bloqueiam a acumulação de oxigénio em altas concentrações; é o cofactor de vários enzimas, nomeadamente, a peroxidase do glutatião da placenta (*vide figura 1*). A sua forma oxidada GSSG quando se deposita, em elevadas concentrações, no meio celular pode actuar como inibidor da síntese proteica⁸.

OBJECTIVO

Tendo em conta os aspectos acima referidos, o objectivo deste estudo foi de determinar as concentrações dos grupos sulfidrílicos da molécula de glutatião nas suas duas formas – GSH e GSSG – em homogenatos de placentas, na gravidez complicada com preeclâmpsia e comparar com determinações semelhantes em homogenatos de placenta na gravidez sem patologia hipertensiva, como controlo.

MATERIAL E MÉTODOS

Constituíram-se duas amostragens de grávidas: uma em que a gravidez decorreu sem intercorrências e outra, na qual foi diagnosticada doença hipertensiva induzida pela gravidez baseando-se nos critérios universalmente aceites; ao primeiro grupo passaremos a designar de grávidas normais (GNT) e ao segundo grupo, grávidas patológicas (GHTA).

Fez-se a colheita aleatória dum fragmento de placenta, imediatamente após o parto: as amostras de placenta com igual peso foram conservadas em azoto líquido até a preparação de homogenatos com ácido metafosfórico a 25% e tampão fosfato com EDTA com pH 8.

Os homogenatos são submetidos a ultracentrifugação durante 30 minutos e a 10 000 RPM a temperatura mínima de 4 graus, numa ultracentrífuga *Beckman*.

Fez-se a colheita de sobrenadante para doseamento da concentração de proteínas segundo o *método de Lowry*⁹ e

para o doseamento por fluimetria do GSH e GSSG¹⁰. A concentração das proteínas foi expressa por gr de proteínas/100ml e as concentrações do GSH e GSSG foram definidas nas seguintes unidades : micromoles/gr de proteínas.

Os resultados foram submetidos a análise estatística baseada nos seguintes métodos : análise simples de variância, teste *t* de Student, teste do qui-quadrado, correlação simples, e teste de significância do *r* de Pearson; foram considerados como significativos todos os valores de $p < 0.05$ ¹¹.

RESULTADOS

Foram estudadas nove grávidas do grupo GHTA e dezassete grávidas do grupo GNT. Existia uma predominância de primíparas (52%) no grupo das GNT em relação às GHTA (33%), assim como a média das idades era menor nas GNT (27.9 anos) que nas GHTA (30.4), o que tem consequência lógica em relação à paridade. A duração média do tempo de gestação não difere significativamente nos dois grupos avaliados. No entanto, não se constatou em relação ao peso dos recém-nascidos, que apresentavam menor índice ponderal nas GHTA (quadro I).

Quadro I

	Grávidas Normais	Grávidas Patológicas
Número de casos	17	9
Idade	27.9 ± 4.8	30.4 ± 6.3
Semanas de Gestação	36.1 ± 1.4	36.9 ± 2
Peso fetal	3300 ± 476.3	2649 ± 612*
Primíparas	52%	33%
Múltiparas	48%	66%

* $p = 0.000$ (t de Student)

Verificou-se que 33 % das grávidas patológicas tinham antecedentes familiares de 1º grau com HTA essencial.

Os resultados encontrados nos doseamentos do glutatião nas suas duas formas, reduzido-GSH e oxidado-GSSG, foram os seguintes: nas grávidas normais, as concentrações de GSH foram de 31.62 ± 14.87 e nas grávidas patológicas de 52.43 ± 23.46 ; quanto ao GSSG, utilizando a mesma sequência, as concentrações foram de 20.11 ± 10.33 e 31.4 ± 15.83 (quadro II).

Quadro II

	Grávidas Normais	Grávidas Patológicas
GSH	31.62 ± 14.87	52.43 ± 23.46
GSSG	20.11 ± 10.33	31.4 ± 15.83

Unidades: Micromoles/Mg de Proteínas

Utilizando os testes estatísticos acima mencionados, os resultados apresentaram os seguintes níveis de significância (valores do *p*-quadro III).

Quadro III

Teste	GSH	GSSG
t de Student	0.011	0.064
A. de variância	0.011	0.064
Qui-quadrado	0.087	0.06
Correlação simples	0.7	
r de Pearson	< 0.01	

COMENTÁRIOS

Nos homogenatos de placenta das grávidas patológicas, as concentrações do GSH (forma reduzida) e do GSSG (forma oxidada), estão significativamente aumentadas em relação aos homogenatos das grávidas normais.

Os radicais livres ao terem a capacidade de oxidar os grupos sulfidrílicos dos centros activos enzimáticos do enzima glutatião peroxidase interferem na interacção com o cofactor glutatião Daí que se possa postular que o aumento das duas formas do glutatião nos homogenatos das grávidas patológicas poderá resultar de dois mecanismos:

– Deficiente ou incapacidade na utilização do glutatião como cofactor da glutatião peroxidase e como consequência, a produção exagerada de elementos biologicamente activos e potenciais promotores directos ou indirectos de lesão celular.

Aumento da síntese do glutatião; a actividade do enzima responsável pela biosíntese do glutatião, a cistationina sintase, pode ser alterada na presença de stress oxidativo.

Os resultados deste estudo, põe em evidência um marcador bioquímico – o glutatião celular – que actuando como antioxidante, previne assim a génese de radicais de oxigénio; os resultados obtidos sugerem, que a placenta é uma potencial fonte geradora de radicais na doença hipertensiva da gravidez, quer na sua forma induzida como na forma agravada pela gestação.

Tais resultados levam a admitir a hipótese de que, muito provavelmente, a prevenção da DHIG também passará pela inclusão dietética no decurso da gestação e a partir das 20 semanas (*altura em que se considera que a implantação do trofoblasto está completa*), de compostos que protejam os grupos sulfidrílicos das moléculas, tais como as vitaminas A, C, E e o selénio.

AGRADECIMENTOS

Agradece-se à D. Crismélia Lopes, a colaboração que prestou na execução da técnica fluorimétrica e no doseamento das proteínas.

BIBLIOGRAFIA

1. WILLIAM F. O' BRIEN: The prediction of preeclampsia. Clin. Obst. Gynec. 1992; Vol. 35 N 2; 351-364.
2. EASTERLING TR: The maternal hemodynamics of preeclampsia. Clin. Obst. Gynec. 1992; Vol. 35 N 2; 375-386.

3. ERSKINE KJ, IVERSEN SA, DAVIES R: An altered ratio of 18:2 (9.11) to 18:2 (9.12) linoleic acid in plasma phospholipids as possible predictor of preeclampsia. *Lancet*; Vol. 1; 554 1985.
4. ZEEMAN GG, DEKKER GA: Pathogenesis of preeclampsia; a hypothesis. *Clin. Obst. Gynec.* 1992; Vol.35 N 2; 317-337.
5. SCOTT W. WALSH: Lipid Peroxidation in Pregnancy; Hypertension in Pregnancy 1994; Vol. 13 (1); 1-32
6. FEHER J. and al: The chemistry of free radical reactions. In *Free radical reactions in Medicine* 1987; Springer Verlag N 2.
7. MANSO C: Glutatião e outros péptidos de stress oxidativo. *Arquivos Portugueses de Ciências Biológicas* 1991; Tomo XXV; 109-117.
8. MEISTER A.: Selective modification of glutathione metabolism. *Science* 1993; Vol. 220; 472-477.
9. DAWSON MR and al. : *Data For Biochemical Research* 3th Edition 1986; Oxford Science Publications.
10. HISSIN PJ, HILF R: *Analytical Biochemistry* 1976 ;Vol. 74; 214-226.
11. STANTON A. GLANTZ: *Primer of biostatistics* 2nd Edition 1987; McGraw Hill International Editions.
12. HALLIWEL B, GUTTERIDGE JMC: *Free radicals in Biology and Medicine* 2nd Edition 1993; Clarendon Oxford.