

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Fabiane Rodrigues

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO
DIABETES MELLITUS GESTACIONAL**

Santa Maria, RS
2016

Fabiane Rodrigues

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO
DIABETES MELLITUS GESTACIONAL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Thissiane de Lima Gonçalves Bernasconi

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Rodrigues, Fabiane

Avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo em gestantes com diabetes mellitus gestacional / Fabiane Rodrigues.- 2016.

64 p.; 30 cm

Orientadora: Thissiane de Lima Gonçalves Bernasconi
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2016

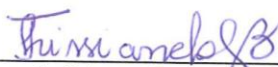
1. Diabetes mellitus gestacional 2. Enzima delta-aminolevulinato desidratase 3. Estresse oxidativo 4. Mulheres gestantes I. Bernasconi, Thissiane de Lima Gonçalves II. Título.

Fabiane Rodrigues

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO
DIABETES MELLITUS GESTACIONAL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

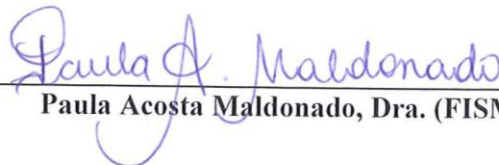
Aprovado em 15 de Julho de 2016:



Thissiane de Lima Gonçalves Bernasconi, Dra. (UFSM)
(Presidente /Orientador)



Natália Brucker, Dra. (UFSM)



Paula Acosta Maldonado, Dra. (FISMA)

Santa Maria, RS
2016

Dedico esta dissertação aos meus amados pais, por serem meu referencial de vida, esteio e fonte de amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser minha fonte de esperança e força, pelas oportunidades e alegrias proporcionadas.

Aos meus pais, amigos e familiares pelo amor, carinho, amparo e incentivo em todos os momentos dessa etapa.

À minha querida orientadora Prof^a Dr^a Thissiane de Lima Gonçalves Bernasconi pela oportunidade de aprendizado, pelas palavras de apoio e incentivo e pela amizade.

As colegas de laboratório Leidiane, Letícia e Bárbara pela ajuda nos experimentos, amizade, companheirismo e momentos compartilhados. Em especial a Leidiane, pelos ensinamentos quando iniciei na pesquisa.

Aos membros da banca examinadora desta dissertação, professoras Natália Brucker e Paula Acosta Maldonado pela disponibilidade em avaliar este trabalho.

A UFSM e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade. A secretária do PPGCF, Rosalíra, pela atenção e paciência com que realiza seu trabalho.

A CAPES, pela bolsa concedida.

Ao HUSM, em especial ao Dr. Walter Santos Neme e a equipe do ambulatório de diabetes do pré-natal de alto risco, pela disponibilidade e auxílio.

Ao Núcleo de Educação Permanente em Saúde (NEPeS) de Santa Maria pela oportunidade e aos funcionários da UBS Wilson Paulo Noal pela receptividade e atenção dispensadas.

Aos funcionários do DACT pela amizade, suporte e colaboração para a realização deste trabalho.

As gestantes e voluntárias que participaram deste estudo, pelo carinho e atenção. Muito obrigada, foi gratificante cada momento.

Aos professores do PPG em Ciências Farmacêuticas pela aprendizagem e incentivo a pesquisa.

As colegas da pós-graduação, Angelita, Ju, Joce e Camila pelos momentos de descontração, conversas, apoio e amizade.

E a todos aqueles que se envolveram direta ou indiretamente com a realização deste trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

AValiação de Biomarcadores de Estresse Oxidativo no Diabetes Mellitus Gestacional

AUTORA: Fabiane Rodrigues

ORIENTADORA: Thissiane de Lima Gonçalves Bernasconi

O Diabetes mellitus gestacional (DMG) é uma intolerância à glicose com início durante a gestação. É um distúrbio frequente e sua incidência está crescendo entre as gestantes. A hiperglicemia resultante do DMG está associada à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em excesso, as quais são capazes de aumentar o estresse oxidativo e prejudicar a saúde tanto materna quanto fetal. A enzima δ -Aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) é sensível a situações oxidativas, como a hiperglicemia. O objetivo deste trabalho foi avaliar biomarcadores de estresse oxidativo em gestantes com DMG e sua relação com a atividade da δ -ALA-D, a fim de analisar o perfil oxidativo dessas gestantes no transcurso desta doença. A avaliação foi realizada em 48 gestantes com DMG e 30 gestantes saudáveis (controles), ambos os grupos estavam no terceiro trimestre gestacional. A atividade da δ -ALA-D foi mensurada em amostra de sangue total. A peroxidação lipídica foi avaliada através da quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma e em eritrócitos. Já para a análise do perfil antioxidante foram quantificados os níveis de vitamina C (VIT C) no plasma, da enzima catalase (CAT) em eritrócitos, e dos grupos tióis protéicos (P-SH) em plasma e não-protéicos (NP-SH) em eritrócitos. Os resultados demonstraram uma redução da atividade da δ -ALA-D, assim como um aumento de seu índice de reativação nas gestantes com DMG quando comparadas as controles ($p < 0,05$). Além disso, houve aumento dos níveis de TBARS no grupo DMG ($p < 0,05$). Os antioxidantes avaliados nas gestantes com DMG apresentaram níveis reduzidos quando comparados as controles ($p < 0,05$). Além disso, houve correlações significativas entre δ -ALA-D e os níveis de NP-SH, índice de reativação e TBARS de eritrócitos; este último também foi correlacionado com os níveis de glicose de jejum em mulheres com diabetes gestacional. Portanto, houve um aumento do estresse oxidativo em mulheres com DMG, diferente do estresse de uma gestação normoglicêmica. Em paralelo ao aumento do estresse oxidativo foi observada uma redução da atividade da δ -ALA-D, a qual demonstrou ser sensível ao ambiente hiperglicêmico que surgiu durante a gestação. Assim, a utilização de δ -ALA-D em conjunto com outros marcadores de estresse oxidativo pode ser importante para avaliar processos metabólicos que estão debilitados, como no DMG.

Palavras-chave: Gestantes. Diabetes Gestacional. δ -ALA-D. Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

EVALUATION OF OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS IN GESTATIONAL DIABETES MELLITUS

AUTHOR: Fabiane Rodrigues

ADVISER: Thissiane de Lima Gonçalves Bernasconi

Gestational diabetes mellitus (GDM) is a glucose intolerance beginning during pregnancy. It is a common disorder and its incidence is increasing among pregnant women. Hyperglycemia derived from GDM is associated with the formation of reactive oxygen species (ROS) in excess, which are capable of increasing oxidative stress and damage the health of both mother and fetus. The δ -aminolevulinate dehydratase enzyme (δ -ALA-D) is sensitive to oxidative conditions such as hyperglycemia. The aim of this study was to evaluate oxidative stress biomarkers in pregnant women with GDM and their relation to the activity of δ -ALA-D in order to analyze the oxidative profile of these pregnant women in the course of this disease. The evaluation was performed in 48 pregnant women with GDM and 30 healthy pregnant women (controls), both groups were in the third trimester. The activity of δ -ALA-D was measured in whole blood sample. Lipid peroxidation was evaluated by measuring thiobarbituric reactive substances (TBARS) in plasma and erythrocytes. Already for the analysis of antioxidant status were quantified levels of vitamin C (VIT C) in plasma, catalase (CAT) enzyme in erythrocytes, and the protein thiol groups (P-SH) in plasma and non-protein (NP-SH) in erythrocytes. The results showed a reduction of the δ -ALA-D activity, as well as an increase in its reactivation index in pregnant women with GDM compared to controls. Furthermore, there was an increase in TBARS levels in the GDM group ($p < 0.05$). Antioxidants evaluated in pregnant women with GDM exhibited reduced levels compared to controls ($p < 0.05$). In addition, there were significant correlations between δ -ALA-D and levels of NP-SH, reactivation index and erythrocyte TBARS; the latter was also correlated with fasting glucose levels in women with GDM. Therefore, there was an increase of oxidative stress in women with GDM, unlike what happens in a normoglycemic pregnancy. In parallel with increased oxidative stress was observed a reduction of the δ -ALA-D activity, which was shown to be sensitive to the hyperglycemic environment that emerged during pregnancy. Thus, the use of δ -ALA-D together with other markers of oxidative stress may be important to assess metabolic processes that are debilitated, as in GDM.

Keywords: Pregnant Women. Gestational Diabetes. δ -ALA-D. Oxidative Stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 – Formação de radicais livres a partir do oxigênio molecular	21
Figura 2 – Etapas do processo de peroxidação lipídica.....	22
Figura 3 – Glutathione: <i>γ-glutamyl-L-cisteinil-glicina</i>	25
Figura 4 – Mecanismo de oxidação do Ascorbato	26
Figura 6 – Síntese do porfobilinogênio catalisada pela enzima δ -ALA-D.....	27

MANUSCRITO

Figure 1 – A. Activity of δ -ALA-D enzyme in women with GDM and controls.	48
B. Reactivation index of δ -ALA-D enzyme in women with GDM and controls ...	48
Figure 2 – A. Correlation between δ -ALA-D activity and the reactivation index.	
B. Correlation between δ -ALA-D activity and NP-SH levels.	
C. Correlation between δ -ALA-D activity and TBARS levels in erythrocytes.	
D. Correlation between TBARS levels in erythrocytes and fasting glucose levels in women with GDM.....	49

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Table 1. Demographic, clinical and laboratory parameters of the studied groups.....	47
Table 2. Biomarkers of oxidative stress in women with GDM and controls.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	American Diabetes Association
ALA	Ácido 5-aminolevulínico
δ -ALA-D	Delta-Aminolevulinato desidratase
CAT	Catalase
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMG	Diabetes mellitus gestacional
DTNB	5'5' - ditiobis -(2-ácido nitrobenzóico)
DTT	Ditiotreitol
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GSH	Glutationa Reduzida
GPX	Glutationa Peroxidase
HbA1c	Hemoglobina glicada
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HUSM	Hospital Universitário de Santa Maria
MDA	Malondealdeído
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
-SH	Grupamento Tiol
SOD	Superóxido Dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A — Comprovante de submissão do manuscrito à revista <i>Clinical Biochemistry</i> ...	61
ANEXO B — Questionário aplicado às gestantes	62
ANEXO C — Termo de consentimento livre e esclarecido	63
ANEXO D — Produção bibliográfica	64

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 DIABETES MELLITUS GESTACIONAL	17
3.1.1 Definição e Epidemiologia	17
3.1.2 Fisiopatologia	18
3.1.3 Complicações materno-fetais associadas ao DMG	18
3.1.4 Rastreamento e Diagnóstico	19
3.1.5 Tratamento	19
3.2 ESTRESSE OXIDATIVO.....	20
3.2.1 Radicais Livres e Espécies reativas	20
3.2.2 Antioxidantes	23
3.2.2.1 <i>Antioxidantes enzimáticos</i>	23
3.2.2.2 <i>Antioxidantes não-enzimáticos</i>	24
3.3 δ-Aminolevulinato desidratase	27
3.4 ESTRESSE OXIDATIVO E DIABETES MELLITUS GESTACIONAL	29
4 MÉTODOS E RESULTADOS	31
4.1 MANUSCRITO.....	31
5 CONCLUSÃO	50
PERSPECTIVAS	51
REFERÊNCIAS	52
ANEXOS	61

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação foi escrita sob a forma de manuscrito, estruturado de acordo com as normas da revista *Clinical Biochemistry*, na qual foi submetido para publicação.

Os itens “Materiais e Métodos”, “Resultados”, “Discussão” e “Referências” encontram-se no próprio manuscrito que representa este estudo na íntegra.

A seção “CONCLUSÃO” apresenta interpretações gerais sobre o manuscrito contido nesta dissertação. Logo após, a seção “Perspectivas” menciona os estudos a serem realizados futuramente.

As REFERÊNCIAS remetem somente às citações que aparecem nas seções “INTRODUÇÃO” e “REVISÃO BIBLIOGRÁFICA” desta dissertação.

Por fim, a seção “ANEXOS ” contém o comprovante de submissão do manuscrito, o questionário aplicado às gestantes, o termo de consentimento livre e esclarecido e a produção bibliográfica realizada no período de concretização desta dissertação.

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes mellitus (DM) é um conjunto de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia crônica e distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, resultante da incapacidade de secreção ou ação da insulina (ADA, 2014; DIAO et al., 2014). A classificação atual do diabetes inclui quatro grupos clínicos, conforme a etiologia: Diabetes mellitus tipo 1 (DM1), Diabetes mellitus tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de DM e Diabetes mellitus gestacional (DMG) (ADA, 2015). Todos os tipos de diabetes quando descompensados estão sujeitos ao aparecimento das complicações secundárias, dentre elas nefropatia, neuropatia, retinopatia, cardiopatia, insuficiência renal, entre outras (PASQUALOTTO; ALBERTON; FRIGERI, 2012; ADA, 2014).

O DMG é definido como uma intolerância a carboidratos, que resulta em hiperglicemia de níveis variados e que ocorre ou é reconhecida pela primeira vez durante a gestação, podendo ou não persistir após o parto (AKTÜN et al., 2015). É uma das desordens metabólicas mais comuns no período gestacional, tendo elevada incidência em diversas populações e grupos étnicos (RUDGE et al., 2013). Quando não controlado, o DMG pode prejudicar a saúde materno-fetal, levando a uma maior incidência de complicações como: hipertensão, pré-eclampsia, parto pré-termo e macrosomia fetal (METZGER et al., 2008).

Em relação aos mecanismos fisiopatológicos, a resistência à insulina e a disfunção das células beta-pancreáticas estão entre os principais fatores para o desencadeamento do DMG (ZHOU et al., 2015). Além disso, tem sido proposto que o estresse oxidativo tenha um papel agravante no DMG (LAPPAS et al., 2011).

O estresse oxidativo é um estado de desequilíbrio entre pró-oxidantes e a capacidade antioxidante do organismo. Esta relação pode estar alterada devido ao aumento dos níveis das espécies reativas, principalmente as de oxigênio (EROs), ou uma diminuição dos mecanismos de defesa antioxidante (BURTON; JAUNIAUX, 2011). Sabe-se que durante a gestação, de forma fisiológica, há um aumento do estresse oxidativo, devido às adaptações que ocorrem no corpo da mulher nesse período (AGARWAL et al., 2012). Entretanto, em condições patológicas, como no DMG, há uma exacerbação das EROs, o que pode estar associado a desfechos adversos (RUDGE et al., 2013; SHANG et al., 2015).

Uma enzima que vem mostrando ter atividade sensível frente a agentes oxidantes é a δ -Aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D). Esta possui grupamentos sulfidrílicos (-SH) na sua constituição, sendo eles os principais responsáveis por conferirem essa sensibilidade

enzimática (VALENTINI et al., 2007; ROCHA et al., 2012, ZANINI et al., 2014). A δ -ALA-D também desempenha um papel fundamental na maioria dos organismos aeróbios, participando da biosíntese de compostos tetrapirrólicos (SASSA, 1998).

Em conjunto com outros marcadores, a δ -ALA-D é capaz de servir como um parâmetro de estresse oxidativo em processos metabólicos debilitados (BRITO et al., 2011). A diminuição da atividade da δ -ALA-D, bem como seu índice de reativação já foram relacionadas ao DM2 (BONFANTI et al., 2011), entretanto no DMG, ainda não há relatos.

Neste sentido, conhecer a atividade da δ -ALA-D e o estado redox dessas gestantes é necessário para melhor compreender alguns aspectos do processo de desenvolvimento desta patologia surgida na gestação. Por exemplo, como a hiperglicemia aguda afeta o equilíbrio redox e a magnitude em relação a uma gestante normoglicêmica. Além disso, é relevante investigar essa condição, que representa um desafio para o sistema público de saúde, já que pode acarretar em muitas complicações obstétricas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve por objetivo avaliar a enzima delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) e alguns parâmetros indicadores de estresse oxidativo em gestantes com Diabetes mellitus gestacional.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Nas gestantes com Diabetes mellitus gestacional e nas gestantes controles, objetiva-se:

- Avaliar a atividade da enzima delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), bem como seu índice de reativação em sangue total;
- Avaliar a peroxidação lipídica, através da mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), no plasma e em eritrócitos;
- Determinar a atividade da enzima catalase (CAT) em eritrócitos;
- Verificar os níveis de antioxidantes não enzimáticos como a vitamina C no plasma, os grupamentos tióis protéicos (P-SH) no plasma e não-protéicos (NP-SH) em eritrócitos;
- Verificar a existência de correlações entre os parâmetros hematológicos (eritrograma e contagem de plaquetas), glicêmicos (glicemia de jejum, hemoglobina glicada) e de estresse oxidativo nos grupos estudados.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 DIABETES MELLITUS GESTACIONAL

3.1.1 Definição e Epidemiologia

O DMG é definido como intolerância à glicose, em variados graus de intensidade, que é diagnosticado pela primeira vez durante a gestação, a partir do segundo ou terceiro trimestre, podendo ou não persistir após o parto (DETSCH et al., 2011; ADA, 2015). Mulheres com DMG compartilham muitas das características metabólicas do DM2, como à resistência à insulina e a disfunção das células β - pancreáticas (KAUTZKY-WILLER et al., 1997).

Além disso, é atualmente o distúrbio metabólico mais frequentemente diagnosticado em mulheres grávidas e sua incidência está crescendo (AKTÜN et al., 2015), podendo variar de 3 a 25% de todas as gestações, dependendo do grupo étnico, da população e do critério diagnóstico utilizado (SBD, 2016). No Brasil, cerca de 7% das gestações são complicadas pela hiperglicemia gestacional (SBD, 2016).

Após 4 a 6 semanas do parto, as pacientes com DMG são reclassificadas como apresentando DM, glicemia de jejum alterada, tolerância à glicose diminuída ou normoglicemia. Na maioria dos casos, há reversão para a tolerância normal após a gravidez, porém há risco de 10 a 63% de desenvolvimento de DM2 dentro de 5 a 16 anos após o parto (SBD, 2016).

Alguns fatores são considerados de risco para o DMG, são eles: história de diabetes em familiar de primeiro grau, obesidade, idade superior a 35 anos, hipertensão arterial sistêmica, antecedentes obstétricos de morte fetal ou neonatal, história de macrossomia fetal ou diabetes gestacional prévios, abortos de repetição, além de malformações congênitas fetais, macrossomia, polidrâmnio e ganho de peso excessivo na gestação em curso (LENG et al., 2015; WANG et al., 2015). Também já foram descritos como fatores de risco a baixa estatura da gestante (≤ 151 cm) e a síndrome dos ovários policísticos (DETSCH et al., 2011; SBD, 2016).

3.1.2 Fisiopatologia

A gestação normal é usualmente associada com uma resistência insulínica progressiva, que se inicia por volta de sua metade e progride até o terceiro trimestre em níveis que se assemelham aos encontrados no diabetes tipo 2. Contudo, essa resistência insulínica é resultado de uma adaptação fisiológica, que é mediada pelo aumento da adiposidade materna e pela produção de hormônios placentários, os quais garantem o aporte adequado de glicose ao feto (BUCHANAN et al., 2007). Esses hormônios, chamados de diabetogênicos ou anti-insulínicos (progesterona, cortisol, prolactina e o hormônio lactogênico placentário) acabam por bloquear a ação da insulina. Entretanto, as células beta-pancreáticas normalmente aumentam a secreção de insulina para compensar essa resistência. Com isso, ocorre uma regulação normal de glicose durante a gestação por estas células (BUCHANAN et al., 2007).

Já na gestação complicada por DMG, ocorre uma falha nos mecanismos de resposta contra-regulatória das células beta-pancreáticas. Os níveis de insulina produzidos são insuficientes, caracterizando uma disfunção das células beta-pancreáticas, devido à resistência prolongada à insulina (KAAJA; RÖNNEMAA, 2008).

3.1.3 Complicações materno-fetais associadas ao DMG

A hiperglicemia materna não controlada é o fator principal para as complicações adversas do DMG. Dentre as complicações que podem atingir o feto estão: macrossomia, hipoglicemia, hiperbilirrubinemia, hipocalcemia, distocia de ombro, síndrome do desconforto respiratório e morte perinatal (METZGER et al., 2008). Além disso, segundo um estudo de revisão realizado por Ornoy e colaboradores (2015), os filhos de mães com DMG ou com diabetes pré-existente podem ter o desenvolvimento neurológico comprometido, apresentando alterações motoras finas, de atenção, hiperatividade ou dificuldades de aprendizagem.

Para a gestante, o mau controle metabólico está implicado em maiores índices de abortos espontâneos, infecções, pré-eclampsia, hipertensão arterial, doença hipertensiva específica da gravidez (DHEG), partos pré-termo e cesáreas (METZGER et al. 2008; KIM, 2010).

3.1.4 Rastreamento e Diagnóstico

Para o diagnóstico do DMG a ADA (2015) recomenda a investigação do diabetes pré-existente, e não diagnosticado (overt diabetes), no início do pré-natal, pelos seguintes métodos: (i) hemoglobina glicada (HbA1c) $\geq 6,5\%$ ou (ii) glicemia de jejum (≥ 126 mg/dL) ou (iii) TOTG 75g com glicemia de 2h ≥ 200 mg/dL ou (iv) glicemia ocasional, na presença de sintomas de hiperglicemia (≥ 200 mg/dL).

Descartado o overt diabetes, todas as gestantes deverão realizar TOTG 75g, entre a 24^a e a 28^a semana gestacional, para o diagnóstico do DMG. Os pontos de corte recomendados são: 92, 180 e 153 mg/dL, respectivamente, para as glicemias plasmáticas de jejum, 1 e 2 horas, após a sobrecarga de glicose. O diagnóstico de DMG será confirmado por apenas um valor igual ou superior aos limites pré-definidos. A Sociedade Brasileira de Diabetes segue a recomendação da ADA para fazer o diagnóstico de diabetes gestacional (SBD, 2016). De acordo com a ADA (2015), estas gestantes deverão ser incluídas no protocolo de tratamento, para prevenir os desfechos maternos e perinatais adversos, decorrentes da hiperglicemia não controlada.

3.1.5 Tratamento

O tratamento do DMG preconiza inicialmente a orientação nutricional e a prática de exercícios físicos de baixo impacto, na ausência de contraindicações médicas. Essa terapia evita o ganho excessivo de peso pelas gestantes, além de gerar menores índices de macrosomia fetal e de complicações perinatais (READER, 2007; SBD, 2016). Caso os níveis glicêmicos da gestante continuarem elevados após 2 semanas de modificação no estilo de vida, ou quando a análise da ecografia obstétrica indicar crescimento fetal exagerado, deve-se iniciar o tratamento farmacológico, com hipoglicemiantes orais e/ou terapia com insulina (SBD, 2016). Entre os agentes orais, destacam-se a metformina e a glibenclamida, contudo, por apresentarem efeitos adversos (náusea, desconforto gastrointestinal e hipoglicemia) e ultrapassarem a barreira placentária, a recomendação de uso é mais criteriosa e cautelosa na prática clínica (SBD, 2016). Já a insulino-terapia é o tratamento de primeira escolha por ser eficaz no controle glicêmico e seguro para o feto, pois devido ao seu elevado peso molecular, não ultrapassa a barreira placentária. Juntamente com a terapia, a monitorização metabólica e obstétrica deve ser continuada, a fim de reduzir o risco de complicações e melhorar os resultados maternos e neonatais (KIM, 2010; SBD, 2016).

3.2 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, acarretando em danos ao organismo. Esta relação pode ser alterada por um aumento dos níveis das espécies oxidantes, ou uma diminuição nos mecanismos de defesa antioxidante (AL-GUBORY; FOWLER; GARREL, 2010). Sabe-se que quantidades fisiológicas dessas espécies são necessárias para a progressão de funções celulares normais, desde que após oxidação, cada molécula volte ao seu estado reduzido. Porém, a produção excessiva de oxidantes, pode dominar o sistema de defesa antioxidante natural do corpo, criando complicações adversas a componentes celulares, tais como proteínas, lipídios e DNA (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; BURTON; JAUNIAUX, 2011). Devido a isso, o estresse oxidativo contribui para muitas condições patológicas, como DM, doenças cardiovasculares e desordens neurológicas, já que em tais patologias há um acentuado aumento de pró-oxidantes em relação aos antioxidantes (BAYNES, 1991; SAYRE; SMITH; PERRY, 2001; VALKO et al., 2007).

3.2.1 Radicais Livres e Espécies reativas

Os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem pelo menos um elétron desemparelhado em seu orbital externo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Isso os torna muito instáveis e reativos, tendo uma enorme capacidade para combinar-se inespecificamente com diversas moléculas integrantes da estrutura celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Os radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), respectivamente (VISIOLI, 2000).

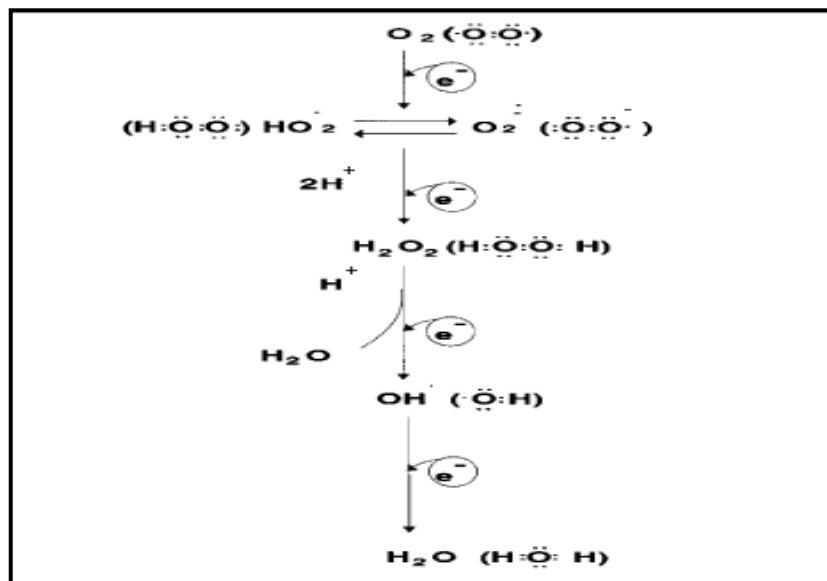
As principais EROs distribuem-se em dois grupos, as radicalares: hidroxila ($\text{HO}\cdot$), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peroxila ($\text{ROO}\cdot$) e alcoxila ($\text{RO}\cdot$) e as não radicalares: oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HClO). Dentre as ERNs incluem-se o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

No organismo, a geração de espécies reativas em níveis adequados é fundamental na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular, neurotransmissão, vasodilatação e síntese de substâncias biológicas importantes, como proteínas e enzimas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; SOHAL; ORR, 2012). No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de

membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana celular, sendo que seus alvos, as proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA estão relacionados com o sítio de formação (YU; ANDERSON, 1997). Entretanto, o principal sítio celular de formação de EROs é a via respiratória mitocondrial, pois as mitocôndrias consomem mais de 90% do oxigênio (O_2) disponível no organismo, que sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água. No entanto cerca de 2 a 3% do oxigênio molecular escapam da redução à água na via respiratória e se transformam principalmente em ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (VALKO et al., 2007) (Figura 1).

Figura 1— Formação de EROs a partir do oxigênio molecular.



Fonte: (FERREIRA; MATSUBARA, 1997)

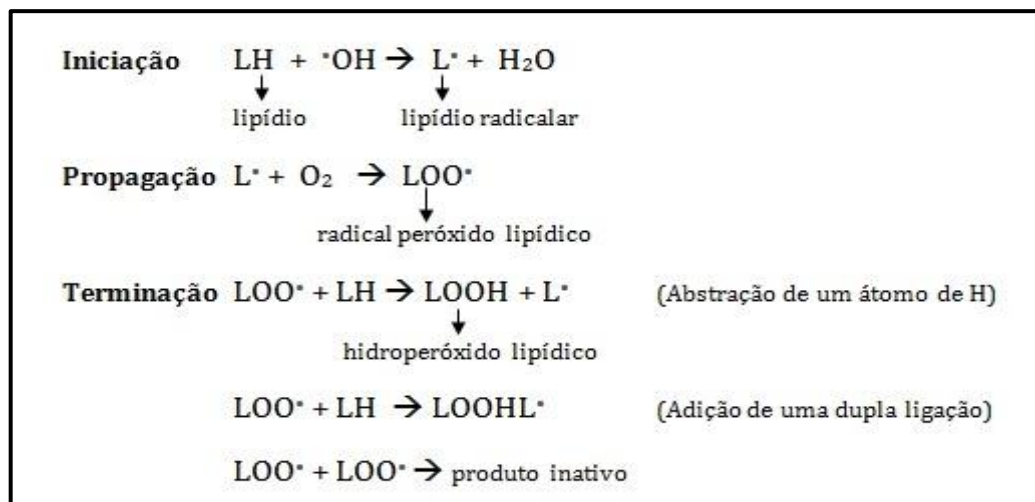
Peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) é o termo utilizado para identificar as reações oxidativas em cadeia, geradas pelas EROs e ERNs com lipídios polinsaturados presentes nas membranas celulares. Este processo geralmente altera a fluidez, a permeabilidade e a seletividade das membranas, favorecendo o trânsito indiscriminado de metabólitos e detritos celulares, que podem ocasionar ruptura e lise da membrana. Além disso, a LPO pode causar danos às proteínas inseridas nesta bicamada lipídica, como enzimas e receptores (VALKO et al., 2007).

A peroxidação lipídica é constituída de 3 etapas (Figura 2): iniciação, propagação e terminação. A iniciação consiste quando uma espécie reativa, geralmente o radical $\cdot\text{OH}$, retira um hidrogênio de um grupo metileno ($-\text{CH}_2$) do ácido graxo polinsaturado. Isso dará origem a um radical de lipídeo ($\text{L}\cdot$). Esse $\text{L}\cdot$ reage com o O_2 , formando o radical peroxila ($\text{LOO}\cdot$), que retira hidrogênios de cadeias adjacentes, originando assim um peróxido lipídico (LOOH) e um novo $\text{L}\cdot$, dando propagação à reação. O término dessas reações se dará devido à ação de antioxidantes lipídicos ou pela ausência de mais reagentes. Esta etapa consiste na formação de produtos estáveis e não radicalares. Entretanto, também podem ocorrer reações que formam aldeídos, a partir de radicais alcóxila e peroxila (GRIFFITHS et al., 2002; VALKO et al., 2007). Entre os aldeídos observados está o malondialdeído (MDA), um reconhecido marcador utilizado para avaliar os processos de LPO (PILZ; MEINEKE; GLEITER, 2000). De diferentes métodos de análise estabelecidos, a reação de MDA com ácido tiobarbitúrico (TBA) é a mais utilizada, por que mostra que a maioria das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) são oriundas da LPO (LEFEVRE et al., 1998).

Em eritrócitos, a peroxidação lipídica é estudada como um modelo de dano oxidativo à biomembranas e tem sido descrito que radicais livres atacam a membrana eritrocitária, causando hemólise (KONDO; TAKAHASHI; NIKI, 1997).

De fato, a determinação do MDA é muito importante em estados de estresse oxidativo, uma vez que indivíduos afetados por diversas doenças têm os níveis de MDA aumentados (GROTTO, et al. 2009).

Figura 2 — Etapas do processo de peroxidação lipídica.



3.2.2 Antioxidantes

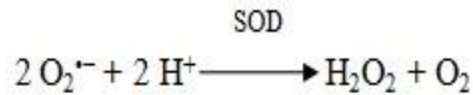
Na ordem de proteger as biomoléculas dos efeitos deletérios provocados pelas espécies reativas, principalmente as EROs, o organismo desenvolveu várias linhas de defesa, que são mediadas por antioxidantes, os quais são definidos como qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, tem capacidade de regenerar o substrato ou prevenir significativamente a oxidação do mesmo (HALLIWELL, 2007). Conforme a sua classificação, os antioxidantes podem ser enzimáticos ou não enzimáticos (BIRBEN, 2012). Já em relação ao seu mecanismo de atuação, podem ser detoxificadores do agente oxidante, antes que este consiga promover danos celulares, ou agir como reparadores de uma lesão resultante da oxidação. A exemplo dos detoxificadores tem-se a glutatona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e vitamina E. Os constituintes dos antioxidantes reparadores são ácido ascórbico, glutatona-redutase (GSH-Rd), glutatona peroxidase (GPx), entre outros (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Em síntese, os antioxidantes são responsáveis por remover ou inibir a formação de EROs, controlando dessa maneira os níveis dessas espécies e permitindo que estas desempenhem seu papel dentro do metabolismo normal do organismo. Contudo, não são totalmente efetivos, visto que dependem da produção endógena e dos constituintes da dieta (HALLIWELL, 2007).

3.2.2.1 Antioxidantes enzimáticos

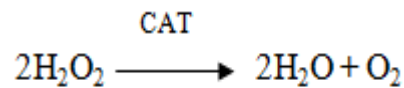
Entre as principais enzimas responsáveis pela defesa antioxidante do organismo destacam-se a SOD (E.C. 1.15.1.1), CAT (E.C. 1.11.1.6) e GPx (E.C.1.11.1.9), que constituem a primeira linha de defesa endógena de detoxificação das EROs, atuando com sincronia e de forma cooperativa. Tais enzimas reduzem as quantidades do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e de H_2O_2 , para que não reajam entre si, evitando assim, a formação do radical hidroxila ($HO\cdot$), que é extremamente reativo e danoso às células, mesmo com uma meia-vida curta e em concentração reduzida (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

A etapa inicial do mecanismo de defesa contra as EROs ocorre a partir da dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em O_2 e H_2O_2 . A SOD, uma metaloenzima com diferentes isoformas (Cu, Zn-SOD, Mn-SOD) e abundante nos organismos aeróbicos é a responsável por catalisar esta reação (McCORD; FRIDOVICH, 1969), que está representada logo abaixo:



O H_2O_2 gerado possui uma baixa reatividade, entretanto é capaz de atravessar membranas plasmáticas, bem como reagir com a membrana eritrocitária e proteínas ligadas ao Fe^{2+} . Em excesso o H_2O_2 causa oxidação da hemoglobina e diminuição da concentração de oxigênio celular, podendo dessa maneira estar envolvido no desencadeamento de várias patologias (WIEACKER et al., 1980; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A fim de evitar danos oxidativos e o acúmulo de metahemoglobina, enzimas como a CAT degradam o H_2O_2 , acelerando sua redução em H_2O e O_2 (FERREIRA; MATSUBARA, 1997), conforme a reação:



A CAT é uma enzima citoplasmática situada no interior do peroxissomo, que é a principal organela responsável pela desintoxicação celular e pela β -oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, que são geradores de peróxidos orgânicos (VASCONCELLOS et al., 2007). Sua atividade enzimática varia de acordo com o órgão ou tecido em que se localiza, sendo mais elevada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado e mais baixa no cérebro, coração e músculo esquelético, pois estes apresentam poucos peroxissomos em suas células (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2000).

Esta enzima possui massa molecular de 240 KDa e é tetramérica. Suas subunidades são idênticas, contendo 60 KDa e um grupamento ferroprotoporfirina ligado ao seu sítio ativo, que a caracteriza como uma hemoproteína (WIEACKER et al., 1980).

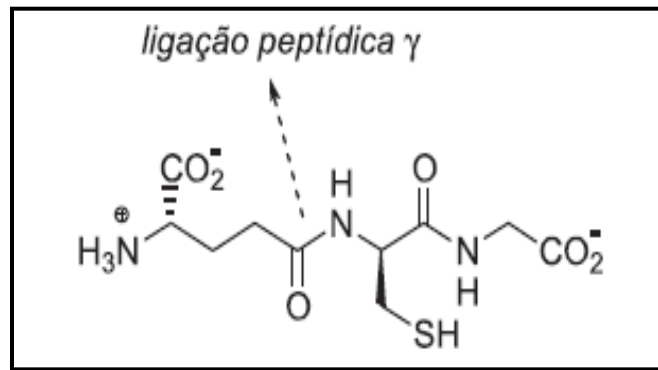
3.2.2.2 Antioxidantes não-enzimáticos

Os antioxidantes não-enzimáticos podem ser de origem endógena ou exógena. Dentre os antioxidantes endógenos destacam-se a ubiquinona (Coenzima Q10) e os compostos tiólicos, onde o maior representante é a glutatona reduzida (GSH). Já os de origem exógena, são aqueles obtidos principalmente através da dieta, como as vitamina C (ácido ascórbico) e E (α -tocoferol), β -caroteno, compostos fenólicos, dentre outros (VALKO et al., 2007; BIRBEN, 2012).

Os compostos tiólicos são aqueles que possuem grupos sulfidríla (-SH) na sua estrutura, sendo o átomo de enxofre o responsável por evitar a oxidação, já que acomoda facilmente à perda de elétrons. Os tióis no sistema biológico podem ser divididos em dois grandes grupos: tióis protéicos e tióis não-protéicos (YANG; GUAN, 2015).

A glutathiona reduzida (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina), mais comumente conhecida por GSH é o tiol não-protéico mais abundante no meio intracelular (Figura 3). A GSH é um tripeptídeo de baixo peso molecular, formado pelos aminoácidos glutamato, glicina e cisteína (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento (-SH), presente na cisteína (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Figura 3— Glutathiona: γ -glutamil-L-cisteinil-glicina



Fonte: (HUBER; ALMEIDA; FATIMA, 2008)

A GSH é considerada o maior tampão redox intracelular, pois participa do sequestro de EROs e ERNs e da neutralização de lipoperóxidos e H_2O_2 como co-fator da GPx (VALKO et al., 2006; HUBER; ALMEIDA; FATIMA, 2008). Além disso, reduz a forma oxidada da vitamina C, mantendo assim a vitamina E na sua forma reduzida e funcional, bem como protege as células contra a radiação e luz ultravioleta, participa da detoxificação de agentes químicos e ainda é requerida para a síntese de DNA, de proteínas e de algumas prostaglandinas (JORDÃO et al., 1998; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

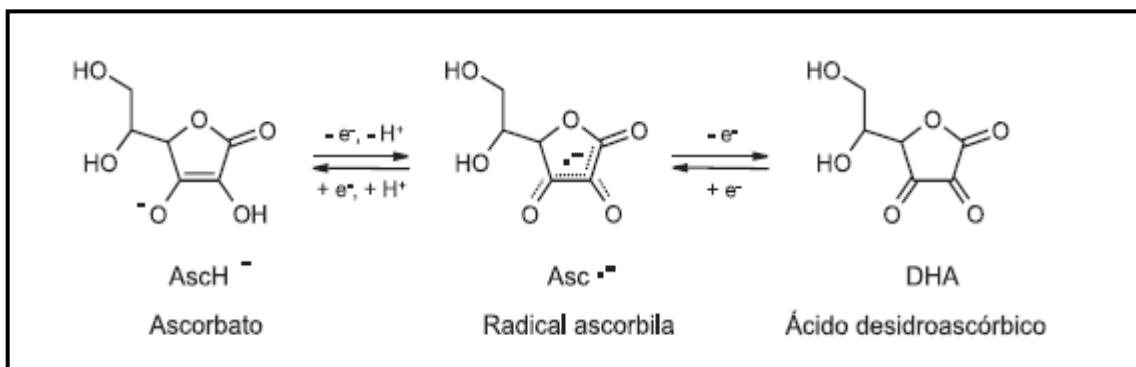
A glutathiona existe no organismo nas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). Entretanto pelo nível de glutathiona no interior de eritrócitos estar principalmente em sua forma reduzida (99,5%), os métodos analíticos utilizados são para medir a concentração da GSH, que é mais específico (SCHOTT et al., 2007). O ácido 5',5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico), ou simplesmente, DTNB, ou reagente de Ellman é bastante utilizado nas determinações de GSH. O grupo (-SH) da glutathiona quebra a ligação dissulfeto do DTNB, liberando o ácido 5-

mercapto-2-nitrobenzóico (TBN) (HUBER; ALMEIDA; FATIMA, 2008). Já quando os tióis protéicos são quantificados no plasma, este reflete o estado geral de proteínas que contém grupamentos (-SH) (YANG; GUAN, 2015).

Em relação aos antioxidantes vitamínicos, deve-se destacar a vitamina C, também conhecida por ácido ascórbico (AsCH_2). Ela é uma vitamina hidrossolúvel obtida através do consumo de frutas e vegetais e localizada nos compartimentos aquosos dos tecidos orgânicos (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). É considerada essencial para o organismo humano, pois participa de diversos processos metabólicos e fisiológicos, como formação do colágeno, biossíntese de carnitina, de corticosteróides, conversão do neurotransmissor dopamina a norepinefrina, no metabolismo da tirosina e na absorção do ferro dietético (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

No meio fisiológico, a vitamina C encontra-se na forma de ascorbato (AsCH^-) e é um potente agente redutor, capaz de neutralizar a maioria das EROs ($\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , HO^\bullet) doando um elétron, antes que elas consigam atingir a membrana lipídica. Os produtos da oxidação do AsCH^- por um e por dois elétrons são, respectivamente, radical ascorbila e ácido desidroascórbico (Figura 4). O radical ascorbila ($\text{Asc}^{\bullet-}$) tem baixa reatividade e isso torna o AsCH^- um eficiente antioxidante (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; VASCONCELOS, 2007).

Figura 4 — Mecanismo de oxidação do Ascorbato.



Fonte: (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007)

Além de eliminar diretamente as espécies reativas na fase aquosa do plasma, o AsCH^- regenera a vitamina E (α -tocoferol), um antioxidante lipossolúvel que evita a lipoperoxidação e a ação danosa dos radicais livres sobre as proteínas e as bases nitrogenadas do DNA (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BIRBEN et al., 2012). Uma vez que a concentração de

AsCH[•] estiver esgotada, outros compostos antioxidantes, como GSH podem reduzir o radical α -tocoferil a α -tocoferol, entretanto de forma menos eficiente (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007). Contudo, isso representa a atuação mútua dos antioxidantes não-enzimáticos, em especial da vitamina C e GSH, na defesa contra as espécies reativas e seus conquentes danos.

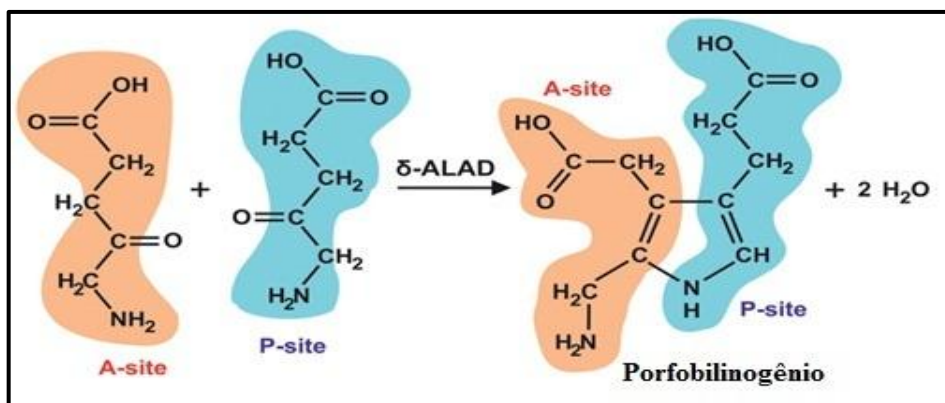
3.3 δ -Aminolevulinato desidratase

A δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) (E.C. 4.2.1.24), também conhecida como porfobilinogênio sintase (PBG-sintase) é uma metaloenzima citosólica de natureza sulfidrídica. Para a sua atividade catalítica, ela necessita de grupamentos sulfidrílicos e um metal bivalente na sua constituição, sendo este metal o Zn^{2+} em tecidos de mamíferos e procaríotos (JAFFE, 1995; SHOOLINGIN-JORDAN, 2002; YANG; WU; SUN, 2012).

Evidências sugerem que o sítio ativo da δ -ALA-D de origem animal seja composto por um resíduo de histidina, um resíduo de lisina e alguns resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, além de dois átomos de zinco e resíduos de cisteína (TSUKAMOTO et al., 1979; JAFFE et al., 1995). Esses resíduos de cisteína são altamente reativos e estão envolvidos na união do zinco no centro metálico, devendo estar reduzidos para que a δ -ALA-D tenha a sua atividade catalítica máxima. (DENT et al., 1990; SPENCER E JORDAN, 1994).

A δ -ALA-D é essencial para os organismos aeróbicos, pois é ela que catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas de ácido 5-aminolevulínico (δ -ALA), com perda de 2 moléculas de água, para formar o composto monopirrólico porfobilinogênio (PBG) (Figura 5) (JAFFE et al., 1995; SASSA, 1998).

Figura 5— Síntese do porfobilinogênio catalisada pela enzima δ -ALA-D



Na reação de formação do PBG, um resíduo lisil do sítio ativo da enzima δ -ALA-D forma uma base de Schiff (ligação carbono-nitrogênio) com a primeira molécula do substrato δ -ALA, originando a cadeia lateral P (cadeia propiônica), e posteriormente uma segunda molécula do δ -ALA dá origem à cadeia lateral A (acética) do PBG, onde o nitrogênio do grupo amino desta porção permanece livre (JAFPE, 2004). A união da primeira molécula do substrato δ -ALA não requer zinco ou grupamentos sulfidrílicos reduzidos. No entanto, para a união da segunda molécula de δ -ALA, a qual originará a cadeia lateral A (acética) do PBG, são necessários zinco e/ou grupamentos sulfidrílicos (JAFPE et al., 1995).

O PBG então formado sofre sucessivas transformações para gerar compostos tetrapirrólicos, como o heme, que constitui os grupos prostéticos de proteínas fisiologicamente importantes tais como a hemoglobina, catalase, peroxidases e os citocromos (JAFPE et al., 1995; SASSA, 1998). Assim, atuando em uma etapa limitante da biossíntese do heme, a δ -ALA-D tem grande influência no transporte de oxigênio celular, na proteção contra peróxidos e na biotransformação de xenobióticos (JAFPE et al., 1995).

Contudo, a atividade da δ -ALA-D pode ser reduzida por agentes pró-oxidantes, que atacam seus grupos sulfidrílicos (-SH), como por exemplo: N-etilmaleimida, iodoacetato, monoiodoacetamida e DTNB (BATLLE et al., 1967; BARNARD et al., 1977), além de metais pesados, tais como cobre, chumbo e mercúrio (NELSON et al., 1981; GROVER et al., 2010; FAVERO et al., 2014). A δ -ALA-D tem uma maior afinidade por esses metais, que oxidam os grupos (-SH), levando à inativação parcial da enzima com concomitante perda do zinco (TSUKAMOTO et al., 1979). Em mamíferos, a δ -ALA-D também é inibida por quelantes como EDTA e 1,10-fenantrolina, (SOMMER; BEYERSMANN, 1984), entretanto é revertida pela adição de zinco (BEVAN et al., 1980).

Com a inibição da δ -ALA-D, a biossíntese do heme fica comprometida, propiciando dessa maneira o surgimento de patologias como anemia, dentre outras (SASSA et al., 1989). Além das consequências resultantes da redução da produção de compostos tetrapirrólicos, pode haver acúmulo do substrato δ -ALA no sangue, já que a δ -ALA-D fará a condensação de forma parcial. Este substrato é um composto alfa-aminocarbonílico, o que significa que ele apresenta um grande potencial pró-oxidante, pois sofre reação de enolização e subsequente oxidação, com formação de EROs ($O_2^{\cdot-}$, $HO\cdot$). As EROs formadas podem afetar várias biomoléculas de diferentes órgãos através de reações induzidas pelo δ -ALA, sendo portanto este substrato potencialmente citotóxico, genotóxico e neurotóxico. Neste último caso, quando formado na medula óssea, o δ -ALA pode atravessar a barreira hemato-encefálica (DEMASI et al., 1996; ROCHA et al., 2003).

É possível reverter à oxidação da δ -ALA-D produzida por agentes pró-oxidantes e consequentemente aumentar a atividade enzimática utilizando-se ativadores tiólicos, como o ditioneitol (DTT), também conhecido por reagente de Cleland, que é capaz de prevenir ou reverter à oxidação dos grupos (-SH) da enzima, mantendo-os reduzidos para obtenção da atividade catalítica máxima (VALENTINI et al., 2007). A partir da reativação induzida pelo DTT, calcula-se o índice de reativação enzimático, que serve para verificar quanto da δ -ALA-D oxidada foi possível reverter com a adição do agente redutor e o envolvimento dos grupos (-SH). Avaliar o índice de reativação da δ -ALA-D parece ser um parâmetro eficiente para verificar o grau de inibição desta enzima e de estresse oxidativo, visto que ela é altamente sensível a situações pró-oxidantes. Diversos estudos já demonstraram uma redução da atividade da δ -ALA-D em condições de aumento de estresse oxidativo, como hipotireoidismo (SOUZA et al., 2007), câncer (GONÇALVES et al., 2009; ZANINI et al., 2014), diabetes (BONFANTI et al., 2011) e exposição a múltiplos metais (NASCIMENTO et al., 2015).

3.4 ESTRESSE OXIDATIVO E DIABETES MELLITUS GESTACIONAL

A gravidez por si só é uma condição associada com o estresse oxidativo devido à alta demanda metabólica, bem como a necessidade aumentada de oxigênio. Esses níveis de oxigênio contribuem para o aumento da produção de EROs na placenta, sendo esta uma das principais fontes de radicais livres no início da gravidez e durante o parto. No entanto, essa condição é equilibrada por níveis de antioxidantes adequados (AGARWAL et al., 2012), diferentemente no que ocorre no DMG, onde há um excesso da produção de radicais livres e os mecanismos de defesa antioxidantes na maioria das vezes estão prejudicados (TOESCU et al., 2004).

Evidências de estudos clínicos (TOESCU et al., 2004) e experimentais (IESSI et al., 2010) sugerem que esse desequilíbrio redox resultante da hiperglicemia é um dos fatores patológicos associados ao DMG, visto que pode levar ao desenvolvimento das complicações materno-fetais (SHANG et al., 2015). Contudo, a exata relação entre DMG e o balanço oxidante/antioxidantes ainda não foi totalmente esclarecida (LÓPEZ-TINOCO et al. 2013).

Pesquisas realizadas por HARSEM (2008) e GUOSHENG (2009) demonstraram que no DMG, um dos mecanismos desencadeadores do excesso de EROs pode ser a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs, *advanced glycation end products*), decorrente do ambiente hiperglicêmico gestacional. Esses AGEs agravam o estado redox da gestante com DMG e consequentemente danificam biomoléculas.

O estresse oxidativo em mulheres com DMG já foi observado em alguns estudos através do aumento da peroxidação lipídica (TOESCU et al., 2004; RAJDL et al., 2005; SHANG et al., 2015), bem como a redução de antioxidantes enzimáticos como a catalase (BIRI et al., 2006; LÓPEZ-TINOCO et al. 2013) e não enzimáticos, como a vitamina C (SUHAIL et al., 2010) e GSH (RAJDL et al., 2005).

No entanto, em relação à δ -ALA-D, ainda não há relatos da atividade desta enzima em gestantes diabéticas. Estudos em pacientes com DM2 demonstram uma inibição e um maior índice de reativação enzimática, sugerindo seu envolvimento com o estresse oxidativo causado por esta patologia (SOUZA et al., 2007; BONFANTI et al., 2011). Contudo o real mecanismo oxidativo que ocasiona a inativação enzimática da δ -ALA-D não está totalmente elucidado. Sugere-se que possa ser causado tanto pela glicação não enzimática do sítio ativo do resíduo de lisina envolvido na formação da base de Schiff com os resíduos de cisteína da δ -ALA-D ou pela oxidação dos grupamentos sulfidrílicos (-SH), em virtude das EROs geradas pela hiperglicemia (FERNÁNDEZ-CUARTERO et al., 1999; SCHMATZ et al., 2012).

A redução da δ -ALA-D, segundo pesquisas não é dependente do tipo de diabetes e sim das taxas glicêmicas do paciente diabético (SOUZA et al., 2007; BONFANTI et al., 2011). Assim, sugere-se que a atividade da δ -ALA-D eritrocitária, quando parcialmente inibida no DMG, possa ser um parâmetro usual na avaliação do metabolismo alterado dos carboidratos, bem como de estresse oxidativo, já que o DMG demonstra a predisposição da mulher para os demais tipos de diabetes, sendo o DM2 o mais comum (BAZ; RIVELINE; GAUTIER, 2016).

4 MÉTODOS E RESULTADOS

A metodologia e os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito, que foi submetido para avaliação na revista *Clinical Biochemistry*. Os itens: Materiais e Métodos, Resultados e Discussão e Referências encontram-se no manuscrito segundo as normas da respectiva revista.

4.1 MANUSCRITO

Influence of gestational diabetes on the activity of δ -aminolevulinate dehydratase and oxidative stress biomarkers

Manuscrito submetido para avaliação na revista *Clinical Biochemistry*

Fabiane Rodrigues¹, Leidiane de Lucca¹, Walter S. Neme², Thissiane de Lima Gonçalves^{1*}

Influence of gestational diabetes on the activity of δ -aminolevulinatase dehydratase and oxidative stress biomarkers

Fabiane Rodrigues ¹, Leidiane de Lucca¹, Walter S. Neme², Thissiane de Lima Gonçalves ^{1*}

¹ Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences,
Department of Clinical and Toxicology Analysis,
Center of Healthy Sciences,
Federal University of Santa Maria (UFSM)
97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

² Department of Obstetrics and Gynecology,
Federal University of Santa Maria (UFSM)

***Corresponding author at:**

Thissiane de Lima Gonçalves
Department of Clinical and Toxicology Analysis,
Center of Healthy Sciences,
Federal University of Santa Maria (UFSM),
97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.
E-mail address: thissianegoncalves@yahoo.com.br

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate the influence of gestational diabetes mellitus (GDM) on the activity of δ -aminolevulinate dehydratase (δ -ALA-D) and oxidative stress biomarkers in women with GDM, due to the important role of oxidative stress during pregnancy.

Design and Methods: The activity and reactivation index of δ -ALA-D, levels of protein thiol (P-SH) and non-protein thiol groups (NP-SH), catalase activity (CAT), levels of vitamin C and lipid peroxidation (TBARS) were measured in 48 women with GDM and 30 healthy pregnant women, who constituted the control group. All pregnant women were in the third trimester of pregnancy.

Results: Women with GDM exhibited reduced δ -ALA-D activity and a higher reactivation index, as well as an elevated level of oxidative stress when compared to control subjects ($p<0.05$). In addition, there were significant correlations between δ -ALA-D and levels of NP-SH, reactivation index and erythrocyte TBARS; the latter was also correlated with fasting glucose levels in pregnant women with GDM ($p<0.05$).

Conclusions: There was an increase of oxidative stress in women with GDM, different from the physiological stress of a normal pregnancy. With this increase in oxidative stress, there was a decrease in δ -ALA-D activity, which was shown to be sensitive to the hyperglycemic environment that emerged during pregnancy. Thus, the use of δ -ALA-D together with other markers of oxidative stress may be important to assess metabolic processes that are debilitated, as in GDM.

Keywords: Pregnant women; Gestational diabetes; δ -ALA-D; Oxidative stress.

1. Introduction

Gestational diabetes mellitus (GDM) is defined as glucose intolerance, to varying degrees of intensity, which is usually diagnosed in the second or third trimester of pregnancy [1]. This period of pregnancy is physiologically characterized by peripheral resistance to insulin action, mainly due to increased maternal adiposity and the production of diabetogenic hormones by the placenta [2]. In normal pregnancy, the pancreatic β -cells increase insulin secretion to compensate this resistance, thereby regulating the glycemic levels [3]. However, in GDM there is a failure to cope with the high insulin demand, primarily due to dysfunction of pancreatic beta cells and insulin resistance, indicating that GDM operates similarly to type 2 diabetes (T2DM) and that hormonal changes of pregnancy may indicate a woman's increased susceptibility to T2DM [4,5].

Maternal hyperglycemia during pregnancy may result in complications for the baby, such as macrosomia, malformations, neonatal hypoglycemia and increased fetal mortality [6]. For pregnant women there is greater risks of having high blood pressure, infections and, cesarean delivery, and of developing DM2 after pregnancy [7].

The development of GDM is not fully understood, but there is evidence that maternal hyperglycemia is associated with increased oxidative stress [8], which may also be involved in the pathophysiology and maternal and fetal complications of GDM [9]. Oxidative stress occurs when the production of reactive species, particularly reactive oxygen species (ROS), exceed the capacity of the antioxidant defense system. This process can cause damage and change the functions of biomolecules, such as lipids, proteins and DNA [10].

In order to protect the organism from the deleterious effects of ROS, the antioxidant system is divided into enzymatic and non-enzymatic antioxidants. Enzymatic antioxidants are mainly comprised of superoxide dismutase (SOD), which converts the superoxide radical (O_2^-) into hydrogen peroxide (H_2O_2), and glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT), both of which degrade H_2O_2 [10,11]. Non-enzymatic antioxidants can be endogenous, such as reduced glutathione (GSH), the main representative of the thiols (-SH), which are responsible for the detoxification of oxygen radicals [12], or exogenous, such as vitamins, minerals and phenolic compounds [13]. Vitamin C is an important water-soluble antioxidant, which donates electrons to break the chain reaction of lipid peroxidation and regenerates vitamin E in order to protect cell membranes from oxidative damage [11].

Another important enzyme involved in oxidative stress is δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) [14]. It is an essential enzyme for aerobic organisms, because it

participates in heme biosynthesis, catalyzing the condensation of two δ -aminolevulinic acid molecules (δ -ALA) to form porphobilinogen (PBG) [15]. δ -ALA-D contains thiol groups, which are required for its activity, since in pro-oxidant conditions such as hyperglycemia, these groups are oxidized and the enzyme is inhibited [16]. When inhibited, δ -ALA-D affects heme synthesis and consequently hemoproteins, such as hemoglobin, catalase and peroxidases [17]. Another consequence is the accumulation of δ -ALA substrate, a precursor of reactive oxygen species [14]. Due to this behavior, δ -ALA-D has been suggested as a biomarker of oxidative stress in diseases such as T2DM [18,19].

Previous studies have demonstrated an increase in lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) in the maternal circulation of women with GDM, as well as a decrease in the levels of antioxidants CAT, GSH and vitamin C [20–22]. However, the number of studies assessing oxidative/antioxidant status in women with GDM is still relatively limited. Similarly, there are no reports in the literature about δ -ALA-D activity in these pregnant women. Therefore, the aim of this study was to evaluate the activity of δ -ALA-D, due to its high sensitivity to oxidative situations, and its relation to biomarkers of oxidative stress in women with GDM.

2. Materials and methods

2.1 Study population

The present investigation was conducted between August 2014 and April 2016 in Santa Maria, Rio Grande Sul (RS), Brazil. This study included 48 women with GDM and receiving high-risk prenatal care at the University Hospital of Santa Maria. The control group consisted of 30 healthy women with low-risk pregnancies receiving care at the basic health unit (BHU) Wilson Paulo Noal. All pregnant women were in their third trimester and were taking iron supplements to prevent or treat iron deficiency anemia (IDA), common in that period. The individual doses were concentrations between 40-120 mg/day, according to medical guidance. Diabetic pregnant women were controlling diabetes only with diet.

All the pregnant women underwent oral glucose tolerance test (75g OGTT) screening between 24 and 28 weeks of pregnancy. In all cases, GDM was diagnosed according to the American Diabetes Association (ADA) criteria published in the pregnancy guidelines in the Standards of Medical Care in Diabetes, 2014 [23]. The diagnosis of GDM is made when any

of the following plasma glucose values are exceeded: Fasting: ≥ 92 mg/dL, 1 h: ≥ 180 mg/dL and 2 h: ≥ 153 mg/dL.

Exclusion criteria for all participants included chronic systemic diseases, pre-existing diabetes (type 1 or type 2), treatment with insulin or hypoglycemics, preeclampsia, multiple pregnancy, smoking, alcoholism and use of drugs or supplements, except ferrous sulfate.

The study was approved by the committee of ethics in research of the Federal University of Santa Maria – RS and informed consent was required from all participants, according to the guidelines of the local ethics committee (No. 33665314.4.0000.5346) and was in accordance with the Declaration of Helsinki (2000). All participants provided written informed consent after being informed about the study.

2.2 *Sample collection and preparation*

Blood samples (16 mL) were collected from all pregnant women after a 8-hour fasting period. The collection was made by venipuncture in into Vacutainer® tubes (BD Diagnostics, Plymouth, UK) containing anticoagulants. The EDTA blood tube (4 mL) was used for hemogram and measurement of the glycated hemoglobin. Fasting glucose was measured in a tube containing sodium fluoride (4 mL). Two tubes containing heparin (4 mL) were used to obtain whole blood, plasma and erythrocytes for determination of oxidative stress parameters.

The activity of δ -ALA-D was measured in a whole blood aliquot, the remainder was centrifuged at 3000 rpm for 10 min to obtain the plasma, which was used to determine the levels of protein thiols, TBARS and Vitamin C. After removal of the plasma, the erythrocytes were washed three times with 0.9% NaCl and used to assess the levels of non-protein thiols, erythrocyte TBARS and catalase.

2.3 *Laboratory parameters*

Analysis of the hemogram was determined in Sysmex® XE-5000 (Sysmex, Kobe, Japan). Plasma glucose was measured by hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase method (Glucose - Dimension®RxLMax® - Siemens/USA). The glycated hemoglobin A1c (HbA1c) was analyzed only in diabetic pregnant women using the cation-exchange HPLC method with a D-10 analyzer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Body mass index (BMI) was calculated as weight by height squared (kg/m^2). In addition, systolic and diastolic blood pressures were measured by a calibrated mercury sphygmomanometer.

2.4 *δ-ALA-D activity and reactivation index*

δ -ALA-D activity was assessed in whole blood with heparin by the method of Berlin and Schaller [24]. The enzyme reaction was started after 10 min preincubation of blood by the addition of δ -aminolevulinic acid (δ -ALA, 4 mM) in phosphate-buffered solution at pH 6.8. Incubation was carried out for 1h at 37 °C and the reaction was stopped by addition of 250 μ L of 10% trichloroacetic acid containing 10 mM HgCl₂. For both measurements of δ -ALA-D activity, in the presence and absence of the reducing reagent dithiothreitol (DTT, 2mM), a modified Ehrlich's reagent was used to react with porphobilinogen (PBG), the final product of the reaction, measured at 555 nm. Results were expressed in U/L (PBG nmol/h/mg Hb). The δ -ALA-D reactivation index was estimated using the equation: $A-B/A*100$, where A= absorbance of δ -ALA-D with DTT and B= absorbance of δ -ALA-D without DTT.

2.5 *Thiobarbituric acid reactive substances*

Lipid peroxidation was estimated in plasma and in erythrocytes by measuring thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) according to the method of Lapenna et al. [25]. The reaction products were measured spectrophotometrically at 532 nm and the results were expressed in nmol TBARS/mL of plasma and in nmol TBARS/mL of erythrocytes.

2.6 *Determination of protein and non-protein thiol groups*

The concentration of protein thiol groups (P-SH) was determined with reduced glutathione (GSH) and quantified in plasma by the method of Boyne & Ellman [26] modified by Jacques Silva et al. [27], which consists of reducing 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB or Ellman's reagent) in phosphate buffer (0.3M and pH 7.0). The yellow color developed was measured at 412 nm. The results were expressed as nmol of P-SH/mL plasma.

Levels of non-protein thiol groups (NP-SH) were determined by spectrophotometry at 412 nm, as described by Boyne & Ellman [26] modified by Jacques Silva et al. [27]. The erythrocytes were hemolyzed with 10% solution of triton and after 10 min were precipitated with 20% trichloroacetic acid, followed by centrifugation to obtain the supernatant. The colorimetric assay was performed in phosphate buffer (1M and pH 7.4). The NP-SH levels were expressed as nmol of NP-SH/mL erythrocytes.

2.7 *Catalase enzyme activity*

Catalase (CAT) activity was quantified spectrophotometrically in erythrocytes by the method of Aebi [28], which consists of monitoring the decomposition of H₂O₂ at 240 nm. The enzymatic activity was expressed as K/mg·Hb.

2.8 *Determination of Vitamin C*

Vitamin C (VIT C) levels in plasma were determined according to Galley et al. [29] with some modifications by Jacques-Silva et al. [27]. In this method an orange-red chromogen is produced when 65% sulfuric acid is added after incubation of ascorbic acid with 2, 4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) for 3 h at 37 ° C. The VIT C levels were measured at 520 nm and expressed as µg vit C/mL plasma.

2.9 *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software, version 6.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). The Shapiro-Wilk test was used to assess the normality of all study variables. Variables with normal distribution were compared using the Student t test and the results represented as mean ± standard deviation (SD). The Mann-Whitney test was used for variables with abnormal distribution and the results expressed as median (interquartile range). Correlations between parameters of diabetic pregnant women were assessed using Spearman rank correlation coefficient. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1 *Demographic, clinical and laboratory parameters of the studied groups.*

Demographic, clinical and laboratory parameters of women with GDM and controls are shown in **Table 1**. Significantly higher fasting glucose levels were found in women with GDM when compared to controls ($p < 0.0001$). The other parameters analyzed showed no significant differences among pregnant women ($p > 0.05$).

3.2 *δ -ALA-D activity and reactivation index*

δ -ALA-D activity and its reactivation index are presented in **Fig. 1A-B**. There was a decrease of δ -ALA-D activity in women with GDM, in the presence or absence of DTT reducing agent, when compared to the control group (**Fig. A**) ($p < 0.05$). Furthermore, the reactivation index of δ -ALA-D was significantly higher in women with GDM than in the control group (**Fig. B**).

3.3 *Measures of oxidative stress biomarkers.*

Biomarkers of oxidative stress are shown in **Table 2**. As can be observed, the TBARS levels of both plasma and erythrocytes were significantly higher in women with GDM than in the control group ($p < 0.0001$). In relation to the antioxidants, the levels of P-SH and NP-SH were lower in GDM than in the control group ($p < 0.001$). Similarly, vitamin C levels ($p < 0.01$) and catalase activity ($p < 0.05$) were lower in GDM.

3.4 *Correlations between analyzed parameters*

Significant correlations between the parameters analyzed in women with GDM are shown in **Fig. 2** (A-D). We observed a negative correlation between δ -ALA-D activity and the reactivation index (**Fig. 2A**), a positive correlation between δ -ALA-D activity and NP-SH levels (**Fig. 2B**) and a negative correlation between δ -ALA-D activity and TBARS levels in erythrocytes (**Fig. 2C**). Furthermore, TBARS levels in erythrocytes were also positively correlated with fasting glucose levels (**Fig. 2D**).

4. Discussion

Pregnancy is a physiological period with increased susceptibility to insulin resistance and increased oxidative stress, because the placenta acts in the production of diabetogenic hormones and contributes to the generation of ROS, creating an environment rich in mitochondria with high oxygen pressure [2,30]. In normal pregnancy, the ROS production rate is compensated by an increased synthesis of antioxidants [31]. However, when the pregnancy is complicated by diabetes, excessive production of ROS overpowers antioxidant defenses, leading to increased oxidative stress [9,22].

As expected, women with GDM showed a significant increase in fasting glucose levels when compared to controls (**Table 1**). This result may be due to an inadequate secretion of insulin or reduced sensitivity to insulin, similar to typical T2DM abnormalities [4]. There is also evidence that women with GDM form advanced glycation end-products (AGEs) [32,33]. These AGEs are generally formed in chronic processes of hyperglycemia, as in T2DM and may generate an increased ROS and oxidative stress [33]. Based on these metabolic characteristics of T2DM present in GDM, δ -ALA-D may behave similarly in these two types of diabetes, since it is sensitive to oxidative conditions such as hyperglycemia [16].

The results of this study have shown for the first time in the literature that δ -ALA-D activity in women with GDM was significantly reduced when compared to controls (**Fig. 1A**). This reduction may be associated with physiological changes imposed by pregnancy [30], as well as the disproportionate glycemic levels of these women. This finding corroborates the fact that δ -ALA-D is sensitive to hyperglycemic conditions, as in T2DM [18,19]. In the control group, its activity was similar to previous studies that have shown that in normal pregnant women, δ -ALA-D is reduced when compared to non-pregnant women due to the physiological oxidative stress of pregnancy [34,35].

In order to verify whether δ -ALA-D was inhibited by oxidation of thiol groups, we evaluated the reactivation index, through a reaction with dithiothreitol (DTT) [36]. In women with GDM, the reactivation index was significantly higher when compared to the controls (**Fig. 1B**), in addition to being negatively correlated with δ -ALA-D activity (**Fig. 2A**). This indicates that the thiol groups were more oxidized in GDM, resulting in reduced δ -ALA-D activity, since these groups (-SH) are vital components for its functioning [36]. Furthermore, inhibition of δ -ALA-D leads to the accumulation of its δ -ALA substrate, which further increases the amount of ROS and is associated with the oxidation of lipid membranes and

antioxidant depletion [37], also contributing to increased oxidative stress in women with GDM.

Regarding the analysis of protein thiol (P-SH) and non-protein (NP-SH) groups, both were decreased in diabetic pregnant women when compared to controls (**Table 2**). This result is in agreement with Rajdl et al. [20] who attributed the reduced glutathione (GSH) to oxidative stress of GDM. A negative correlation between δ -ALA-D activity and NP-SH was also observed in these pregnant women (**Fig. 2B**), suggesting that non-protein thiols, main constituents of GSH [12], are easily oxidized in conditions of oxidative stress. Furthermore, GSH may be related to the reduced δ -ALA-D activity, as it is dependent on thiol groups, which may reduce or even inhibit its activity when they are oxidized.

In order to analyze lipid damage, MDA was assessed using a TBARS assay and a significant increase of lipid peroxidation was observed in women with GDM when compared to controls (**Table 2**). Previous studies showed similar results in women with GDM [20,22]. Moreover, δ -ALA-D activity was negatively correlated with TBARS levels in erythrocytes (**Fig. 2C**). This suggests that ROS produced in GDM, besides damaging the lipid membrane [8], may be responsible for oxidation of δ -ALA-D thiol groups, resulting in inhibition of this enzyme and in an increase of the total load of ROS in the organism [35].

Some studies suggest that the increase in ROS in GDM is due to hyperglycemia, which in different pathways leads to oxidative stress [21,38]. In fact, our results corroborate with this argument, because a positive correlation between TBARS in erythrocytes and fasting glucose levels in women with GDM was observed (**Fig. 2D**). In addition, antioxidants such as catalase and vitamin C were reduced in women with GDM when compared to controls (**Table 2**). The reduction of catalase may reflect an adaptive and protective response of the antioxidant system to oxidative stress [9,21]. Furthermore, catalase may be reduced due to it being a hemoprotein [17] and since δ -ALA-D enzyme was reduced, this may have affected the synthesis of heme and its hemoproteins, such as catalase. The reduction of vitamin C observed in women with GDM is in agreement with other studies [22,39], suggesting that this antioxidant is consumed during oxidative reactions, since it is the first line of defense in aqueous solution.

The results of this study demonstrate that GDM can influence δ -ALA-D activity, as well as its reactivation index. Moreover, this enzyme was associated with increased oxidative stress in GDM.

5. Conclusion

In summary this study demonstrated that there was a greater oxidative stress in women with GDM, different from the physiological stress of a normal pregnancy. The data indicate the increased in oxidative stress accompanied by decreased in δ -ALA-D activity, which was shown to be sensitive to the hyperglycemic environment that emerged during pregnancy. Thus, the use of δ -ALA-D together with other markers of oxidative stress may be important to assess metabolic processes that are debilitated, as in GDM.

Acknowledgments

The authors thank all the pregnant women who contributed to this study. We also thank the Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Núcleo de Educação Permanente em Saúde (NEPeS), Programa de Iniciação Científica Para o Hospital Universitário de Santa Maria (PROIC-HUSM), University Hospital of Santa Maria (HUSM) and the Federal University of Santa Maria (UFSM) for support in this study.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] American Diabetes Association, Classification and diagnosis of diabetes, *Diabetes Care*. 39 (2016) 13–22. doi:10.2337/dc15-S005.
- [2] P.C. Padilha, A.B. Sena, J.L. Nogueira, R.P. da Silva Araújo, P.D. Alves, E. Accioly, et al., Nutritional therapy in gestational diabetes, *Rev. Nutr.* 23 (2010) 95–105. doi:10.1590/S1415-52732010000100011.
- [3] L. Salzer, K. Tenenbaum-Gavish, M. Hod, Metabolic disorder of pregnancy (understanding pathophysiology of diabetes and preeclampsia), *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 29 (2015) 328–338. doi:10.1016/j.bpobgyn.2014.09.008.
- [4] B. Baz, J.-P. Riveline, J.-F. Gautier, Endocrinology of pregnancy: Gestational diabetes mellitus - Definition, aetiological and clinical aspects, *Eur. J. Endocrinol.* 174 (2016) 43–51. doi:10.1530/EJE-15-0378.

- [5] T.A. Buchanan, A. Xiang, S.L. Kjos, R. Watanabe, What is gestational diabetes?, *Diabetes Care*. 30 (2007) 105–111. doi:10.2337/dc07-s201.
- [6] M. Wójcik, M. Chmielewska-Kassassir, K. Grzywnowicz, L. Woźniak, K. Cypryk, The relationship between adipose tissue-derived hormones and gestational diabetes mellitus (GDM), *Endokrynol. Pol.* 65 (2014) 132–142. doi:10.5603/EP.
- [7] L. Bellamy, J.-P. Casas, A.D. Hingorani, D. Williams, Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis., *Lancet*. 373 (2009) 1773–1779. doi:10.1016/S0140-6736(09)60731-5.
- [8] Ö. Karacay, A. Sepici-Dincel, D. Karcaaltincaba, D. Sahin, S. Yalvaç, M. Akyol, et al., A quantitative evaluation of total antioxidant status and oxidative stress markers in preeclampsia and gestational diabetic patients in 24-36 weeks of gestation, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 89 (2010) 231–238. doi:10.1016/j.diabres.2010.04.015.
- [9] C. López-Tinoco, M. Roca, A. García-Valero, M. Murri, F.J. Tinahones, Carmen Segundo, et al., Oxidative stress and antioxidant status in patients with late-onset gestational diabetes mellitus, *Acta Diabetol.* 50 (2013) 201–208. doi:10.1007/s00592-011-0264-2.
- [10] E. Birben, U.M. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum, O. Kalayci, Oxidative stress and antioxidant defense., *World Allergy Organ. J.* 5 (2012) 9–19. doi:10.1097/WOX.0b013e3182439613.
- [11] S.B. Nimse, D. Pal, Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms, *RSC Adv.* 5 (2015) 27986–28006. doi:10.1039/C4RA13315C.
- [12] Y. Yang, X. Guan, Rapid and thiol-specific high-throughput assay for simultaneous relative quantification of total thiols, protein thiols, and nonprotein thiols in cells, *Anal. Chem.* 87 (2015) 649–655. doi:10.1021/ac503411p.
- [13] K.B.F. Barbosa, N.M.B. Costa, R. de Cássia Gonçalves Alfenas, S.O. De Paula, V.P.R. Minim, J. Bressan, Oxidative stress: concept, implications and modulating factors, *Rev. Nutr.* 23 (2010) 629–643. doi:10.1590/S1415-52732010000400013.
- [14] J.B.T. Rocha, R.A. Saraiva, S.C. Garcia, F.S. Gravina, C.W. Nogueira, Aminolevulinatase dehydratase (δ -ALA-D) as marker protein of intoxication with metals and other pro-oxidant situations, *Toxicol. Res. (Camb)*. 1 (2012) 85–102. doi:10.1039/C2TX20014G.
- [15] Z. Kayaaltı, S. Sert, D. Kaya-Akyüzlü, E. Söylemez, T. Söylemezoğlu, Association between delta-aminolevulinic acid dehydratase polymorphism and placental lead levels, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 41 (2016) 147–151.

- doi:10.1016/j.etap.2015.11.017.
- [16] R. Schmatz, L.B. Perreira, N. Stefanello, C. Mazzanti, R. Spanevello, Jessié Gutierrez, et al., Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats, *Biochimie*. 94 (2012) 374–383. doi:10.1016/j.biochi.2011.08.005.
- [17] I.U. Heinemann, M. Jahn, D. Jahn, The biochemistry of heme biosynthesis, *Arch. Biochem. Biophys.* 474 (2008) 238–251. doi:10.1016/j.abb.2008.02.015.
- [18] G. Bonfanti, R.B. Ceolin, T. Valcorte, K.S. De Bona, L. de Lucca, T.L. Gonçalves, et al., δ -Aminolevulinic acid dehydratase activity in type 2 diabetic patients and its association with lipid profile and oxidative stress, *Clin. Biochem.* 44 (2011) 1105–1109. doi:10.1016/j.clinbiochem.2011.06.980.
- [19] J.B. Souza, J.B.T. Rocha, C.W. Nogueira, V.C. Borges, R.R. Kaizer, V. M. Morsch, et al., Delta-aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) activity in diabetes and hypothyroidism, *Clin. Biochem.* 40 (2007) 321–325. doi:10.1016/j.clinbiochem.2006.11.016.
- [20] D. Rajdl, J. Racek, A. Steinerová, Z. Novotný, F. Stozický, L. Trefil, et al., Markers of oxidative stress in diabetic mothers and their infants during delivery., *Physiol. Res.* 54 (2005) 429–436. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15588143>.
- [21] A. Biri, A. Onan, E. Devrim, F. Babacan, M. Kavutcu, I. Durak, Oxidant status in maternal and cord plasma and placental tissue in gestational diabetes, *Placenta*. 27 (2006) 327–332. doi:10.1016/j.placenta.2005.01.002.
- [22] M. Shang, J. Zhao, L. Yang, L. Lin, Oxidative stress and antioxidant status in women with gestational diabetes mellitus diagnosed by IADPSG criteria, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 109 (2015) 404–410. doi:10.1016/j.diabres.2015.05.010.
- [23] American Diabetes Association, Standards of medical care in diabetes, *Diabetes Care*. 37 (2014) 14–80. doi:10.2337/dc14-S014.
- [24] A. Berlin, K.H. Schaller, European standardized method for the determination of delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in blood, *Z Klin Chem Klin Biochem.* 12 (1974) 389–390. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4428852>.
- [25] D. Lapenna, G. Ciofani, S.D. Pierdomenico, M.A. Giamberardino, F. Cuccurullo, Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid peroxides in human plasma, *Free Radic. Biol. Med.* 31 (2001) 331–335. doi:10.1016/S0891-5849(01)00584-6.
- [26] A.F. Boyne, G.L. Ellman, A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components,

- Anal. Biochem. 46 (1972) 639–653. doi:10.1016/0003-2697(72)90335-1.
- [27] M.C. Jacques-Silva, C.W. Nogueira, L.C. Broch, E.M. Flores, J.B. Rocha, Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice, *Pharmacol. Toxicol.* 88 (2001) 119–125. doi:10.1034/j.1600-0773.2001.d01-92.x.
- [28] H. Aebi, Catalase in vitro, *Meth Enzym.* 105 (1984) 121–126. doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
- [29] H.F. Galley, M.J. Davies, N.R. Webster, Ascorbyl radical formation in patients with sepsis: Effect of ascorbate loading, *Free Radic. Biol. Med.* 20 (1996) 139–143. doi:10.1016/0891-5849(95)02022-5.
- [30] A. Agarwal, A. Aponte-Mellado, B.J. Premkumar, A. Shaman, S. Gupta, The effects of oxidative stress on female reproduction: a review, *Reprod. Biol. Endocrinol.* 10 (2012) 1. doi:10.1186/1477-7827-10-49.
- [31] C.A.M. Leal, M.R.C. Schetinger, D.B.R. Leal, V.M. Morsch, A.S. da Silva, J.F.P. Rezer, et al., Oxidative stress and antioxidant defenses in pregnant women, *Redox Rep.* 16 (2011) 230–236. doi:10.1179/2301351000211Y.0000000013.
- [32] N.K. Harsem, K. Braekke, T. Torjussen, K. Hanssen, A.C. Staff, Advanced glycation end products in pregnancies complicated with diabetes mellitus or preeclampsia., *Hypertens. Pregnancy.* 27 (2008) 374–386. doi:10.1080/10641950802000968.
- [33] L. Guosheng, S. Hongmei, N. Chuan, L. Haiying, Z. Xiaopeng, L. Xianqiong, The relationship of serum AGE levels in diabetic mothers with adverse fetal outcome., *J. Perinatol.* 29 (2009) 483–488. doi:10.1038/jp.2009.12.
- [34] L. De Lucca, F. Rodrigues, L.B. Jantsch, W.S. Neme, F.M.P. Gallarreta, T.L. Gonçalves, Oxidative profile and δ -aminolevulinate dehydratase activity in healthy pregnant women with iron supplementation, *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 13 (2016) 463. doi:10.3390/ijerph13050463.
- [35] O. Ademuyiwa, O.L. Odusoga, O.O. Adebawo, R. Ugbaja, Endogenous antioxidant defences in plasma and erythrocytes of pregnant women during different trimesters of pregnancy., *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 86 (2007) 1175–1182. doi:10.1080/00016340701515357.
- [36] J. Valentini, G.C. Schmitt, D. Grotto, L.D.S. Maria, S.P. Boeira, Piva, Silvia J, et al., Human erythrocyte δ -aminolevulinate dehydratase activity and oxidative stress in hemodialysis patients, *Clin. Biochem.* 40 (2007) 591–594. doi:10.1016/j.clinbiochem.2007.02.007.

- [37] H. Gurer, N. Ercal, Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning?, *Free Radic. Biol. Med.* 29 (2000) 927–945. doi:10.1016/S0891-5849(00)00413-5.
- [38] L. Arribas, I. Almansa, M. Miranda, M. Muriach, F.J. Romero, V.M. Villar, Serum malondialdehyde concentration and glutathione peroxidase activity in a longitudinal study of gestational diabetes, *PLoS One.* 11 (2016) e0155353. doi:10.1371/journal.pone.0155353.
- [39] M. Suhail, S. Patil, S. Khan, S. Siddiqui, Antioxidant vitamins and lipoperoxidation in non-pregnant, pregnant, and gestational diabetic women: erythrocytes osmotic fragility profiles, *J. Clin. Med. Res.* 2 (2010) 266–273. doi:10.4021/jocmr454w.

Appendices

Table 1. Demographic, clinical and laboratory parameters of the studied groups.

Parameters	GDM (n=48)	Controls (n=30)
Maternal age (years)	29.00 (25.00-33.00)	24.00 (21.75-30.75)
BMI (kg/m ²)	31.51 ± 4.36	29.45 ± 4.32
Gestational age (weeks)	32.50 (30.25-36.00)	33.00 (31.00-37.00)
Systolic pressure (mmHg)	110.00 (100.00-120.00)	110.00 (100.00-110.00)
Diastolic pressure (mmHg)	70.00 (60.00-70.00)	70.00 (60.00-70.00)
Fasting blood glucose (mg/dL)	96.00 (92.00-105.00)*	78.00 (69.00-81.00)
HbA1c (%)	5.63 ± 0.47	-----
Erythrocytes (10 ⁶ /mm ³)	4.14 ± 0.34	3.97 ± 0.34
Hemoglobin (g/dL)	11.90 (11.20-12.50)	11.60 (10.80-13.20)
Hematocrit (%)	35.89 ± 2.56	35.56 ± 2.64
Platelets (10 ³ /mm ³)	228.00 ± 44.22	212.30 ± 42.04

Data were expressed as mean ± SD or median (interquartile range). Statistically significant differences from the controls were determined by Mann-Whitney test (* $p < 0.0001$).

Table 2. Biomarkers of oxidative stress in women with GDM and controls.

Biomarkers	GDM (n=48)	Controls (n=30)
TBARS plasma (nmol/mL)	5.83 ± 1.98****	3.93 ± 1.62
TBARS erythrocytes (nmol/mL)	25.14 ± 5.88****	16.69 ± 7.66
P-SH (nmol P-SH/mL)	124.5 (105.70-146.50)***	153.40 (127.20-170.90)
NP-SH (nmol NP-SH/mL)	712.00 ± 120.70***	829.50 ± 155.90
Vitamin C (µg vit C/mL)	10.83 ± 2.95**	14.03 ± 5.26
Catalase (K/mg·Hb)	45.15 ± 8.49*	50.91 ± 11.3

Data were expressed as mean ± SD or median (interquartile range). Statistically significant differences from the controls were determined by Student's t or Mann-Whitney test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

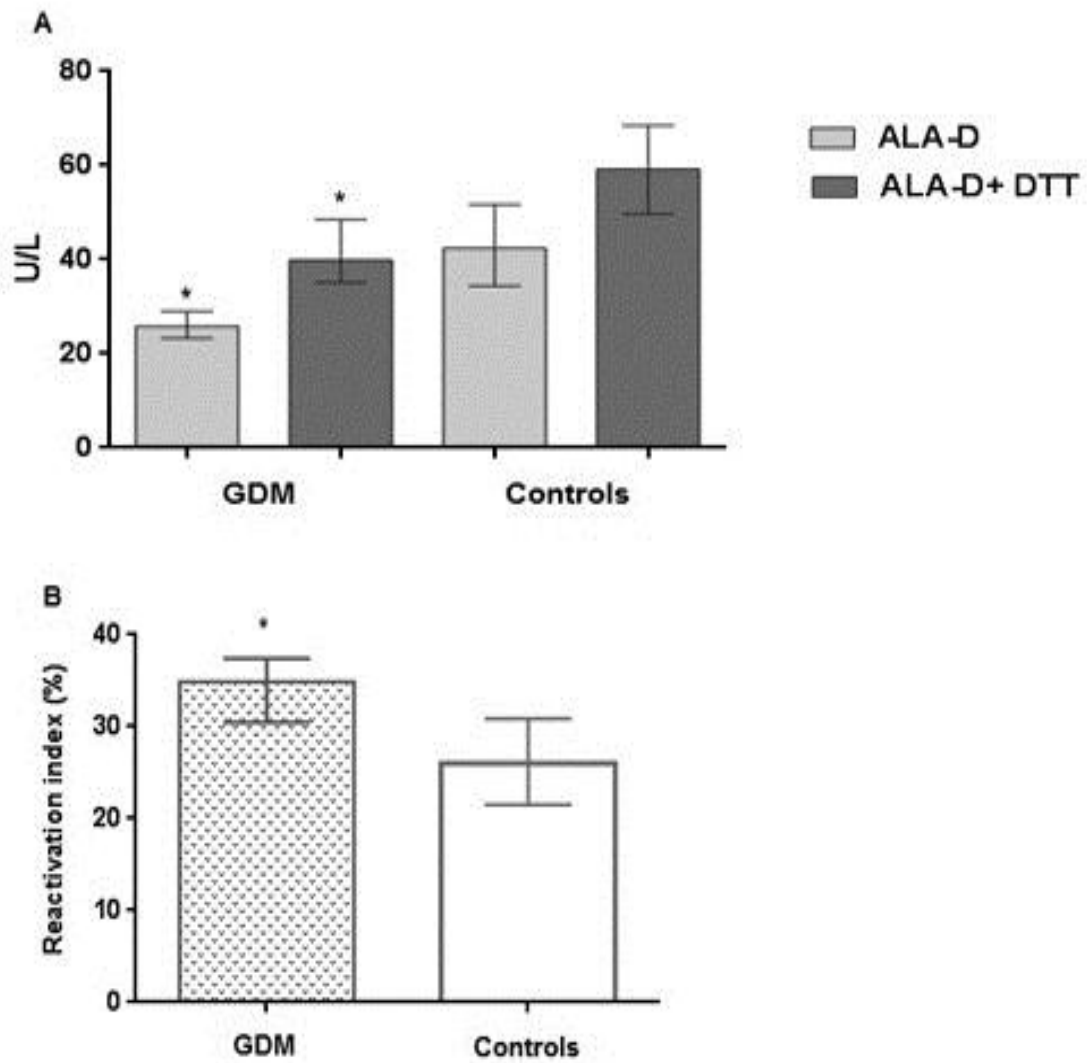


Fig.1. A. Activity of δ -ALA-D enzyme in women with GDM and controls. Data were expressed as median (interquartile range) in U/L. **B.** Reactivation index of δ -ALA-D enzyme in women with GDM and controls. Data were expressed as median (interquartile range) in %. Statistically significant differences from the controls were determined by Mann-Whitney test (* $p < 0.0001$).

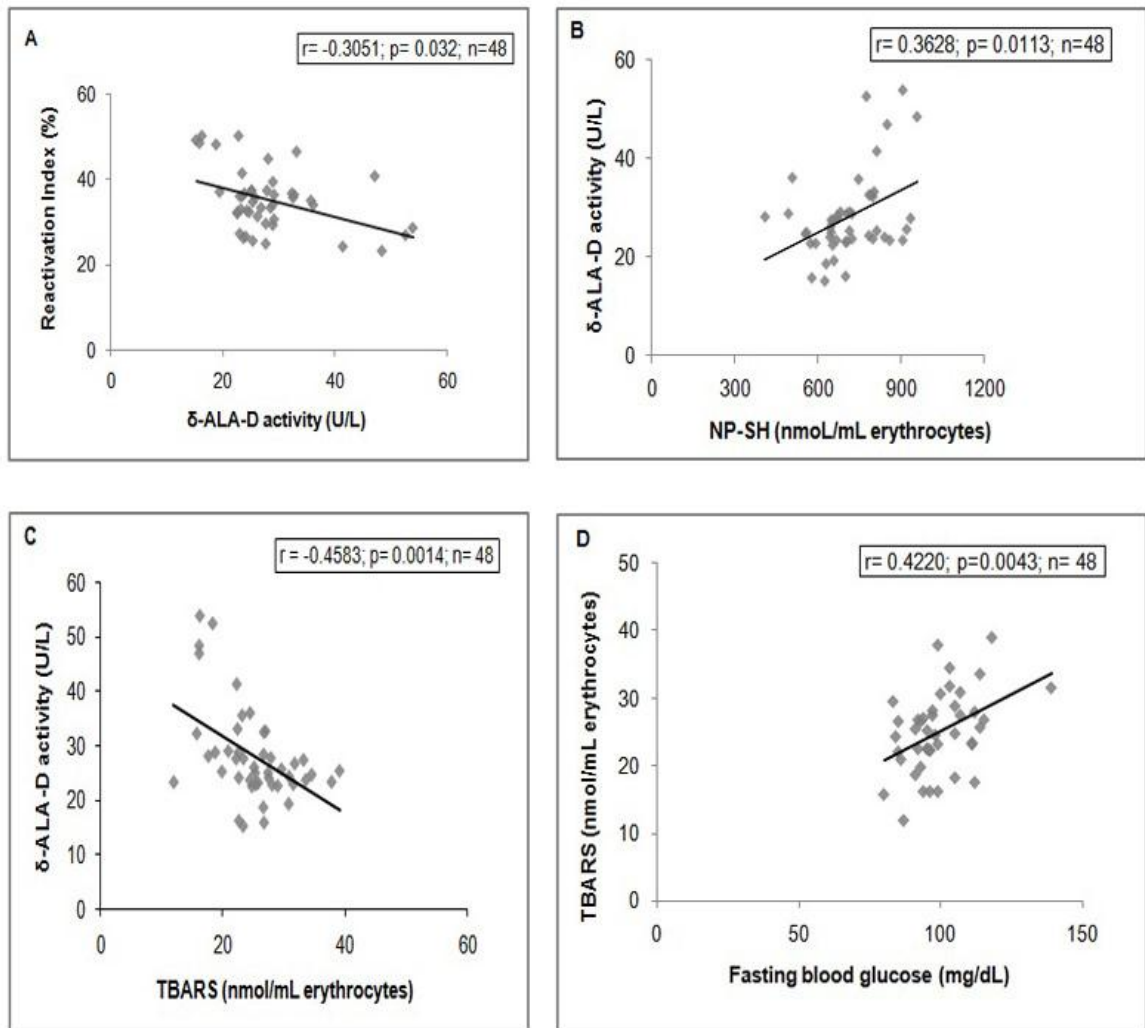


Fig 2. Spearman correlations in women with GDM (n=48). **A.** Correlation between δ -ALA-D activity and the reactivation index ($r = -0.3051$, $p = 0.0032$), **B.** Correlation between δ -ALA-D activity and NP-SH levels ($r = 0.3628$, $p = 0.0113$), **C.** Correlation between δ -ALA-D activity and TBARS levels in erythrocytes ($r = -0.4583$, $p = 0.0014$), **D.** Correlation between TBARS levels in erythrocytes and fasting glucose levels in women with GDM ($r = 0.4220$, $p = 0.0043$).

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados nas condições experimentais realizadas, pode-se concluir que gestantes com DMG desenvolvem um estresse oxidativo maior do que as gestantes normoglicêmicas para o mesmo período gestacional. Essa hiperglicemia não compensada, possivelmente é a razão do aumento dos níveis de TBARS e da redução das defesas antioxidantes nessas gestantes, demonstrando que no DMG há uma maior produção de espécies reativas de oxigênio, que consequentemente aceleram o processo de peroxidação lipídica. Além disso, foi possível concluir que a δ -ALA-D pode ser utilizada como um parâmetro de avaliação de estresse oxidativo, visto que esta enzima sulfidrídica apresentou sua atividade reduzida e um maior índice de reativação nas gestantes com DMG.

Desse modo, este estudo contribuiu para uma maior compreensão do perfil oxidativo de gestantes com DMG, bem como do comportamento da δ -ALA-D, nesta condição.

PERSPECTIVAS

Esta pesquisa pode ser ampliada, a fim de elucidar alguns questionamentos surgidos no decorrer deste trabalho, bem como para aprofundar e deixar mais completo este estudo. Para isso, os seguintes objetivos são de extremo interesse:

- Avaliar quantas gestantes com DMG voltaram ao estado normoglicêmico e quantas foram reclassificadas como DM2, após a consulta de puerpério.
- Verificar a associação dos parâmetros de estresse oxidativo e da atividade da δ -ALA-D analisados nesta dissertação, com as complicações maternas e perinatais, como surgimento de hipertensão, partos pré-termo, malformação e macrosomia fetal.
- Analisar parâmetros de estresse oxidativo, a atividade da enzima δ -ALA-D, dados clínicos e laboratoriais em gestantes com DM2 e comparar com as gestantes com DMG.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A. et al. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. **Reprod Biol Endocrinol.**, v. 10, n. 49. Jun. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22748101>>. Acesso em: 05 Abr. 2016. DOI: 10.1186/1477-7827-10-49.
- AKTÜN, L. H. et al. Gestational diabetes mellitus screening and outcomes. **J Turk Ger Gynecol Assoc.**, v. 16, p. 25-29, Mar. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25788845>>. Acesso em: 10 Abr. 2016. DOI: 10.5152/jtgga.2015.15081.
- AL-GUBORY, K. H.; FOWLER, P. A.; GARREL, C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 42, n. 10, p. 1634-1650, Oct. 2010. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20601089>>. Acesso em: 10 Abr. 2016. DOI: 10.1016/j.biocel.2010.06.001.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Classification and diagnosis of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 38, n. 1, p. 08-16, Jan. 2015. Disponível em: <http://care.diabetesjournals.org/content/38/Supplement_1/S8>. Acesso em: 10 Abr. 2016. DOI:10.2337/dc15-S005.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care**, v. 37, n. 1, p. 14-80, Jan. 2014. Disponível em <http://care.diabetesjournals.org/content/37/Supplement_1/S14>. Acesso em: 10 Abr. 2016. DOI: 10.2337/dc14-S014.
- BARNARD, G. F. et al. Mechanism of porphobilinogen synthase – Possible role of essential thiol groups. **J. Biol. Chem.**, v. 252, p. 8965-8974, 1977. Disponível em:<<http://www.jbc.org/content/252/24/8965.full.pdf>>. Acesso em 26 Jun. 2016.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 29, n. 1, p. 113-123, Fev. 2006. Acesso em: 11 Abr. 2016. DOI: 10.1590/S0100-40422006000100021.
- BATLLE, A. M. et al. Purification and general properties of delta-aminolevulinatase dehydratase from cow liver. **Biochem. J.**, v. 104, n. 1, p. 244-249, Jul. 1967. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1270567/>>. Acesso em: 24 Jun. 2016.
- BAYNES, J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes**, v. 40, n. 4, p. 405-412, Apr. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2010041>>. Acesso em: 08 Abr. 2016.
- BAZ, B.; RIVELINE, J. P.; GAUTIER, J. F. Endocrinology of pregnancy: Gestational diabetes mellitus - Definition, aetiological and clinical aspects. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 174, n. 2, p. 43–51, Feb. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26431552>>. Acesso em: 20 Jun. 2016. DOI:10.1530/EJE-15-0378.

BEVAN, D. R.; BODLAENDER, P.; SHEMIN, D. Mechanism of porphobilinogen synthase. Requirement of Zn²⁺ for enzyme activity. **J. Biol. Chem.**, v. 255, n. 5, p. 2030- 2035, Sep. 1980. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/255/5/2030.full.pdf>>. Acesso em: 27 Jun. 2016.

BIRI, A. et al. Oxidant status in maternal and cord plasma and placental tissue in gestational diabetes. *Placenta*, v. 27, n. 2-3, p. 327-332, Feb-Mar, 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16338477>>. Acesso em: 13 Jun. 2016. DOI:10.1016/j.placenta.2005.01.002.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organ J.**, v. 5, n. 1, p. 9-19, Jan. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23268465>>. Acesso em: 29 Mar. 2016. DOI: 10.1097/WOX.0b013e3182439613.

BONFANTI, G. et al. δ -Aminolevulinate dehydratase activity in type 2 diabetic patients and its association with lipid profile and oxidative stress. **Clin Biochem.**, v. 44, n. 13, p. 1105–1109, Sep. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21762684>>. Acesso em: 12 Abr. 2016. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2011.06.980.

BRITO, V. B. et al. Inhibition of δ -aminolevulinate dehydratase is not closely related to the development of hyperglycemia in alloxan-induced diabetic mice. **Exp Toxicol Pathol.**, v. 63, n. 5, p. 443–451, Jul. 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20356720>>. Acesso em: 12 Abr. 2016. DOI: 10.1016/j.etp.2010.03.003.

BUCHANAN, T. A. et al. "What is gestational diabetes?" **Diabetes Care**, v. 30, n. 2, p. 105-111, 2007. Disponível em: <http://care.diabetesjournals.org/content/30/Supplement_2/S105>. Acesso em: 12 Abr. 2016. DOI:10.2337/dc07-s201.

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.**, v. 25, n. 3, p. 287-299, Jun. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3101336/>>. Acesso em: 10 Abr. 2016. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 441-449, Abr. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000200036&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 15 Abr. 2016. DOI:10.1590/S0100-40422007000200036.

DEMASI, M. et al. The prooxidant effect of 5-aminolevulinic acid in the brain tissue of rats: implications in neuropsychiatric manifestations in porphyrias. **Free Radic Biol Med.**, v. 20, n. 3, p. 291-299, 1996. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8720899>>. Acesso em: 28 Jun. 2016.

DENT, A. J. et al. Two different zinc sites in bovine 5-aminolevulinate dehydratase distinguished by extended X-ray absorption fine structure. **Biochemistry**, v. 29, n. 34, p. 7822-7828, Aug. 1990. Disponível em: < <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00486a007?journalCode=bichaw>>. Acesso em: 27 Jun. 2016. DOI: 10.1021/bi00486a007.

DETSCH, J. C. M. et al. Marcadores para o diagnóstico e tratamento de 924 gestações com diabetes melito gestacional. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, São Paulo, v. 55, n. 6, p. 389-398, Aug. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302011000600005>. Acesso em: 15 Mai.2016. DOI:10.1590/S0004-27302011000600005.

DIAO, C. et al. Systemic and characteristic metabolites in the serum of streptozotocin-induced diabetic rats at different stages as revealed by a ¹H-NMR based metabonomic approach. **Mol Biosyst.**, v. 10, n. 3, p. 686-693, Mar. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24448714>>. Acesso em: 10 Abr. 2016. DOI: 10.1039/c3mb70609e.

FAVERO, A. M. et al. Lactating and non-lactating rats differ to renal toxicity induced by mercuric chloride: the preventive effect of zinc chloride. **Cell Biochem Funct.**, v. 32, n. 5, p. 420–428, Jul. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24619859>>. Acesso em: 21 Jun. 2016. DOI: 10.1002/cbf.3032.

FERNANDEZ-CUARTERO, B. et al. Delta-aminolevulinato dehidratase (ALA-D) activity in human and experimental diabetes mellitus. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 31, n. 3-4, p. 479–88, Mar- Apr. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10224671>>. Acesso em: 15 Jun. 2016.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, Mar. 1997. DOI:10.1590/S0104-42301997000100014.

GONÇALVES, T. L. et al. δ-ALA-D activity is a reliable marker for oxidative stress in bone marrow transplant patients. **BMC cancer**, v. 9, n. 8, p. 138, 2009. Disponível em:<<http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-9-138>>. Acesso em: 25 Mai. 2016. DOI: 10.1186/1471-2407-9-138.

GRIFFITHS, H. R. et al. Biomarkers. **Mol Aspects Med.**, v. 23, p. 101 – 208, Feb-Jun. 2002. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12079771>>. Acesso em: 27 Abr. 2016. DOI: 10.1016/S0098-2997(02)00017-1.

GROTTO, D. et al. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 169-174, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000100032&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 11 Abr. 2016. DOI:10.1590/S0100-40422009000100032.

GUOSHENG, L. et al. S. The relationship of serum AGE levels in diabetic mothers with adverse fetal outcome. **J. Perinatol.**, v. 29, p. 483–488, 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/jp/journal/v29/n7/full/jp200912a.html>>. Acesso em: 05 Jun. 2016. DOI:10.1038/jp.2009.12.

GROVER, P. et al. Genotoxicity evaluation in workers occupationally exposed to lead. **Int J Hyg Environ Health.**, v. 213, n. 2, p. 99-106, Mar. 2010. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20153251>>. Acesso em: 22 Jun. 2016. DOI: 10.1016/j.ijheh.2010.01.005.

GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 899, p. 136- 147, 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10863535>>. Acesso em: 14 Abr. 2016.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 35, p. 1147-1150, Nov. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17956298>>. Acesso em: 29 Mar. 2016. DOI:10.1042/BST0351147.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 4rd ed, New York, Oxford University Press, 2007.

HARSEM, N. K. et al. Staff, Advanced glycation end products in pregnancies complicated with diabetes mellitus or preeclampsia., **Hypertens. Pregnancy.**, v. 27, n. 4, p. 374–386, 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19003638>>. Acesso em: 30 Mai. 2016. DOI:10.1080/10641950802000968.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FATIMA, A. de. Glutationa e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008. Disponível em: http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=1170. Acesso em: 03 Mai. 2016. DOI:10.1590/S0100-40422008000500046.

IESSI, I. L. et al. Evaluation of neonatally-induced mild diabetes in rats: Maternal and fetal repercussions. **Diabetes Metab Syndr.**, v. 2, n. 37, Jun. 2010. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2904722/> >. Acesso em: 19 Jun. 2016. DOI:10.1186/1758-5996-2-37.

JAFFE, E. K. The porphobilinogen synthase catalyzed reaction mechanism. **Bioorg. Chem.**, v. 32, p. 316-325, Oct. 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15381398>>. Acesso em: 26 Jun. 2016. DOI: 10.1016/j.bioorg.2004.05.010.

JAFFE, E. K. et al. Characterization of the role of the stimulatory magnesium of Escherichia coli porphobilinogen synthase. **Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 244-251, Jan. 1995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7819203>>. Acesso em: 25 Jun. 2016.

JORDÃO, A. A. J. et al. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina Ribeirão Preto**, v. 31, n. 3, p. 434 – 449, Jul./Set. 1998. Disponível em: <<http://revistas.usp.br/rmrp/article/view/7697>>. Acesso em: 26 Mai. 2016. DOI: 10.11606/issn.2176-7262.v31i3p434-449

KAAJA, R.; RÖNNEMAA T. Gestational Diabetes: Pathogenesis and consequences to mother and offspring. **RDS**, v. 5, n. 4, p. 194-202, Winter 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2664679/>>. Acesso em: 28 Mar. 2016. DOI:10.1900/RDS.2008.5.194.

KAUTZKY-WILLER, A. et al. Pronounced insulin resistance and inadequate beta cell secretion characterize lean gestational diabetes during and after pregnancy. **Diabetes Care**, v. 20, n. 11, p. 1717-1723 Nov. 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9353615>>. Acesso em: 15 Mai. 2016.

KIM, C. Gestational diabetes: risks, management and treatment options. **Int J Womens Health**, v. 2, p. 339-351, Oct. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2990903/>>. Acesso em: 12 Abr. 2016. DOI:10.2147/IJWH.S13333.

KONDO, H.; TAKAHASHI, M.; NIKI, E. Peroxynitrite-induced hemolysis of human erythrocytes and its inhibition by antioxidants. **FEBS Lett.**, v.413, n. 2, p. 236-238, Aug. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9280288>>. Acesso em: 05 Abr. 2016.

LAPPAS, M. et al. The role of oxidative stress in the pathophysiology of gestational diabetes mellitus. **Antioxid Redox Signal.**, v. 15, n. 12, p. 3061–3100, Dec. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21675877>>. Acesso em: 11 Abr. 2016. DOI: 10.1089/ars.2010.3765.

LEFÈVRE, G. et al. Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances. **Ann Biol Clin.**, v. 56, n. 3, p. 305-319, May-Jun. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9754263>>. Acesso em: 15 Abr. 2016.

LENG, J. et al. Prevalence of gestational diabetes mellitus and its risk factors in chinese pregnant women: A prospective population-based study in Tianjin, China. **PLoS ONE**. Mar. 2015, v. 10, n. 3, p. e0121029. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4370728/>>. Acesso em: 30 Mar. 2016. DOI:10.1371/journal.pone.0121029.

LÓPEZ-TINOCO, C. et al. Oxidative stress and antioxidant status in patients with late-onset gestational diabetes mellitus. **Acta Diabetol.** v. 50, n. 2, p. 201–208, Apr. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21327985>>. Acesso em: 11 Jun. 2016. DOI:10.1007/s00592-011-0264-2.

McCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). **J. Biol. Chem.**, v. 244, p. 6049-6055, Nov. 1969. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5389100>>. Acesso em: 19 Abr. 2016.

METZGER, B. E. et al. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. **N Engl J Med.**, v. 358, n. 19, p. 1991–2002, May. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18463375>>. Acesso em: 11 Abr. 2016. DOI: 10.1056/NEJMoa0707943.

NASCIMENTO, S. N et al. Cognitive deficits and ALA-D inhibition in children exposed to multiple metals. **Environ Res.**, v. 136, p. 387-395, Jan. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25460660>>. Acesso em: 13 Abr. 2016. DOI: 10.1016/j.envres.2014.10.003.

NELSON, H. M. et al. Zinc, copper and δ -aminolaevulinic acid dehydratase in vitro and in vivo. **Toxicology**, v. 21, n. 3, p. 261-266, 1981. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0300483X8190161X>>. Acesso em 28 Jun. 2016. DOI:10.1016/0300-483X(81)90161-X.

ORNOY, A. et al. Effect of maternal diabetes on the embryo, fetus, and children: Congenital anomalies, genetic and epigenetic changes and developmental outcomes. **Birth Defects Res Part C Embryo Today.**, v. 105 n. 1, p. 53-72, Mar. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25783684>>. Acesso em: 30 Mar. 2016. DOI: 10.1002/bdrc.21090.

PASQUALOTTO, R. K.; ALBERTON, D.; FRIGERI, R. H. Diabetes mellitus e Complicações. **J. Biotec. Biodivers.**, v. 3, n. 4, p. 134-145, 2012. Disponível em: <<http://revista.uft.edu.br/index.php/JBB/article/view/385>>. Acesso em: 10 Abr. 2016.

PILZ, J.; MEINEKE, I.; GLEITER, C. H. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl.**, v. 74, n. 2, p. 315–325, Jun.2000. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378434700001742>. Acesso em: 16 Abr. 2016. DOI:10.1016/S0378-4347(00)00174-2.

RAJDL, D. et al. Markers of oxidative stress in diabetic mothers and their infants during delivery. **Physiol. Res.**, v. 54, p. 429–436, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15588143>>. Acesso em: 12 Jun. 2016.

READER, D. M. Medical nutrition therapy and lifestyle interventions. **Diabetes Care**, v. 30, n. 12, p. 188-193, Jul. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17596470>>. Acesso em: 03 Abr. 2016. DOI: 10.2337/dc07-s214.

ROCHA, J. B. T. et al. Aminolevulinatase (δ-ALA-D) as marker protein of intoxication with metals and other pro-oxidant situations. **Toxicol Res**, v. 1, p. 85-102, 2012. DOI: 10.1039/C2TX20014G.

ROCHA, M. E. M. et al. Oxidative Damage to Ferritin by 5-Aminolevulinic Acid. **Arch Biochem Biophys.**, v. 409, n. 2, p. 349-356, Jan. 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003986102006331>>. Acesso em: 29 Jun. 2016. DOI:10.1016/S0003-9861(02)00633-1.

RUDGE, M. V. C. et al. Pesquisa translacional em diabetes melito gestacional e hiperglicemia gestacional leve: conhecimento atual e nossa experiência. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, São Paulo, v. 57, n. 7, p. 497-508, Out. 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302013000700001>. Acesso em: 11 Abr. 2016. DOI: 10.1590/S0004-27302013000700001.

SASSA, S. ALA-D Porphyrria. **Seminars in Liver Disease**, v. 18, n. 1, p. 95-101, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9516683>. Acesso em 12 Abr. 2016. DOI: 10.1055/s-2007-1007145.

SHANG, M. et al. Oxidative stress and antioxidant status in women with gestational diabetes mellitus diagnosed by IADPSG criteria. **Diabetes Res. Clin. Pract.** V. 109, n. 2, p. 404–410, Aug. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26025697>>. Acesso em: 11 Abr. 2016. DOI:10.1016/j.diabres.2015.05.010.

SAYRE L. M.; SMITH, M. A.; PERRY, G. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. **Curr Med Chem.**, v. 8, n. 7, p.721–738, Jun. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11375746>>. Acesso em: 08 Abr. 2016.

SCHMIDT, M. I. et al. Gestational diabetes mellitus diagnosed with a 2-h 75-g oral glucose tolerance test and adverse pregnancy outcomes. **Diabetes Care**, v. 24, n. 7, p. 1151-1155, Jul. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11423494>>. Acesso em: 15 Mai. 2016.

SCHMATZ, R. et al. Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats, **Biochimie.**, v. 94, n. 2 p. 374–383, Febr. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21864646>>. Acesso em: 10 Jun. 2016. DOI:10.1016/j.biochi.2011.08.005.

SCHOTT, K. L. et al. Influência de desproteinizantes ácidos na quantificação da glutatona reduzida eritrocitária por CLAE-UV. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 592-596, Jun. 2007. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000300017. Acesso em: 26 Mai. 2016. DOI:10.1590/S0100-40422007000300017.

SHOOLINGIN-JORDAN, P. M. et al. 5-aminolevulinic acid dehydratase: metals, mutants and mechanism. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 30, n. 4, p. 584-590, Aug. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12196142>>. Acesso em: 23 Jun. 2016. DOI:10.1042.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016)**, São Paulo: A.C. Farmacêutica, 2016. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/sbdonline/images/docs/DIRETRIZES-SBD-2015-2016.pdf>>. Acesso em: 15 Mai. 2016.

SOMMER, R.; BEYERSMANN, D. Zinc and cadmium in 5-aminolevulinic acid dehydratase. Equilibrium, kinetic, and ¹¹³Cd-nmr-studies. **J. Inorg. Biochem.**, v. 20, n. 2, p.131-145, 1984. Disponível em: <<http://europemc.org/abstract/med/6716101>>. Acesso em: 25 Jun. 2016. DOI: 10.1016/0162-0134(84)80013-6.

SOUZA, J. B. et al. Delta-aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) activity in diabetes and hypothyroidism. **Clin. Biochem.**, v. 40, p. 321-325, 2007. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17291479>>. Acesso em: 27 Jun. 2016. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2006.11.016.

SOHAL, R. S.; ORR, W. C. The redox stress hypothesis of aging. **Free radical biology & medicine.**, v. 52, n. 3, p. 539-555, Feb. 2012. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3267846/>>. Acesso em: 12 Abr. 2016. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.445.

SPENCER, P.; JORDAN, P. M. Investigation of the nature of the two metal-binding sites in 5-aminolaevulinic acid dehydratase from Escherichia coli. **Biochem. J.**, v. 300, n. 1, p. 373-381, Jun. 1994. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1138172/>>. Acesso em: 27 Jun. 2016.

SUHAIL, M. et al. Antioxidant vitamins and lipoperoxidation in non-pregnant, pregnant, and gestational diabetic women: erythrocytes osmotic fragility profiles. **J. Clin. Med. Res.**, v. 2, n. 6, p. 266–273, Dec. 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3194031/>>. Acesso em: 20 Jun. 2016. DOI:10.4021/jocmr454w.

TOESCU, V. et al. Changes in plasma lipids and markers of oxidative stress in normal pregnancy and pregnancies complicated by diabetes. **Clin Sci (Lond)**, v. 106, n. 1, p. 93-98, Jan. 2016. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12875648> >. Acesso em: 17 Jun. 2016. DOI: 10.1042/CS20030175.

TSUKAMOTO, I. et al. The role of zinc with special reference to the essential thiol groups in delta-aminolevulinic acid dehydratase of bovine liver. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 570, n. 1, p. 167-178, Sep. 1979. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/486501>>. Acesso em: 23 Jun. 2016.

VALENTINI, J. et al. Human erythrocyte δ -aminolevulinic acid dehydratase activity and oxidative stress in hemodialysis patients, **Clin. Biochem.** v. 40, p. 591–594, 2007. Disponível em: < <http://europepmc.org/abstract/med/17462617>>. Acesso em: 29 Jun. 2016. doi:10.1016/j.clinbiochem.2007.02.007.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem. Biol. Interact.**, v. 160, n. 1, p.1–40, Mar. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16430879>>. Acesso em: 25 Mai. 2016. DOI: 10.1016/j.cbi.2005.12.009.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978905>>. Acesso em: 08 Mai. 2016. DOI: 10.1016/j.biocel.2006.07.001.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, Out. 2007. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422007000500046&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 14 Abr. 2016. DOI:10.1590/S0100-40422007000500046.

WANG, G. et al. Changes in incidence and risk factors of gestational diabetes mellitus among pregnant women in Shanghai: a comparative study between year 2001 and 2010. **JACC**, v. 66, n. 16, p. C128-C129, Oct. 2015. Disponível em:< <http://content.onlinejacc.org/article.aspx?articleID=2462326>>. Acesso em: 30 Mar. 2016. DOI: 10.1016/j.jacc.2015.06.495.

WIEACKER, P. et al. Assignment of the gene coding for human catalase to the short arm of chromosome 11. **Ann Genet.**, v. 23, n. 2, p. 73-77, 1980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6967289>>. Acesso em: 15 Abr. 2016.

YANG, Y.; GUAN, X. Rapid and thiol-specific high-throughput assay for simultaneous relative quantification of total thiols, protein thiols, and nonprotein thiols in cells. **Anal Chem.**, v. 87, n. 1, p. 649-655, Jan. 2015. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25423115>>. Acesso em: 25 Mai. 2016. DOI: 10.1021/ac503411p.

YANG, Y., WU, J., SUN, P. Effects of Delta-Aminolevulinic Acid Dehydratase Polymorphisms on Susceptibility to Lead in Han Subjects from Southwestern China. **Int J Environ Res Public Health**, v. 9, n. 7, p. 2326–2338, Jul. 2012. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3407905/>>. Acesso em: 10 Jun. 2016. DOI:10.3390/ijerph9072326.

YU, T. W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mut Res**, v. 379, p. 201-210, Oct. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9357549>>. Acesso em: 13 Abr. 2016.

ZANINI, D. et al. δ -Aminolevulinic acid dehydratase activity in lung cancer patients and its relationship with oxidative stress. **Biomed Pharmacother.**, v. 68, n. 5, p. 603- 609. Jun. 2014. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24855033> >. Acesso em: 28 Mar. 2016. DOI: 10.1016/j.biopha.2014.04.005.

ZHOU, C. et al. Association of oxidative stress biomarkers with gestational diabetes mellitus in pregnant women: A case-control study. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, Apr. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25915047>>. Acesso em: 30 Mar. 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0126490.

ANEXOS

ANEXO A — Comprovante de submissão do manuscrito “Influence of gestational diabetes on the activity of δ -aminolevulinate dehydratase and oxidative stress biomarkers” à revista Clinical Biochemistry.

CLINICAL BIOCHEMISTRY Contact us  Help ?  'My EES Hub' available for consolidated users ... [more](#)

home | main menu | submit paper | guide for authors | register | change details | log out Username: thissianegoncalves@yahoo.com.br
Switch To: [Author](#) Go to: [My EES Hub](#) Version: EES 2016.4

Submissions Being Processed for Author Thissiane L. Gonçalves

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display results per page.

Action 	Manuscript Number 	Title 	Initial Date Submitted 	Status Date 	Current Status 
View Submission Send E-mail	CLB-D-16-00469	Influence of gestational diabetes on the activity of δ -aminolevulinate dehydratase and oxidative stress biomarkers	Jun 20, 2016	Jun 23, 2016	With Editor

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display results per page.

ANEXO B — Questionário aplicado as gestantes.

QUESTIONÁRIO

Nome: _____ Data da coleta: _____

SAME: _____ Telefone: _____

1. Qual é a sua idade?

2. Peso: Altura: IMC: Pressão Arterial:

3. Qual é a sua idade gestacional (semanas de gestação)?

4. É a sua primeira gestação?

() Sim.

() Não. Histórico das gestações anteriores

5. Como se encontra a sua glicemia sanguínea? Verificar caderneta da gestante e exames laboratoriais até o momento.

6. Tem histórico de diabetes na família?

7. Faz uso de alguma medicação ou suplementação vitamínica no momento?

() Sim. Qual o(s) medicamento(s)? () Não

8. Tomou algum medicamento no último mês? Caso sim, qual?

9. Pratica alguma atividade física? Caso sim, relatar qual e com que frequência.

ANEXO C — Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em gestantes com diabetes mellitus.

Pesquisador responsável: Prof^a Thissiane de Lima Gonçalves.

Instituição/ Departamento: Universidade Federal de Santa Maria – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Telefone para contato: (55) 3220 – 8464.

Você está sendo convidada a participar da pesquisa AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM GESTANTES COM DIABETES MELLITUS.

Sua participação não é obrigatória, não haverá nenhuma forma de compensação financeira e não haverá nenhum custo para você.

O principal objetivo deste estudo é investigar o nível de estresse oxidativo que reflete os danos provocados pela gestação no organismo, em material biológico (sangue) de pacientes do ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Universitário de Santa Maria.

O fato de você participar de nosso estudo implicará somente na coleta de uma amostra de 8 mL de sangue no momento da sua consulta de rotina no ambulatório de ginecologia e obstetrícia. Este procedimento foi previamente acordado com os responsáveis pelo ambulatório.

O desconforto se resume à picada da agulha, sendo que após a coleta o local poderá ficar dolorido ou arroxeadado, mas não requer nenhum cuidado especial, voltando ao normal em poucos dias. O material biológico (sangue) será destinado para análises bioquímicas.

Sua participação contribuirá para o estudo científico do Diabetes mellitus durante a gestação e dos mecanismos envolvidos nas suas complicações. Isso auxiliará na tentativa de minimizar tais complicações e melhorar a qualidade de vida das gestantes.

As informações obtidas através desta pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre a sua participação. Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Eu,.....
(assinatura do (a) participante da pesquisa), RG n°:_____ declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Prof^a. Dra. Thissiane de Lima Gonçalves (Pesquisadora responsável)
thissianegoncalves@yahoo.com.br

Qualquer dúvida entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa: Avenida Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria - 7^o andar - Sala 702 Cidade Universitária – Bairro Camobi - 97105-900 - Santa Maria – RS-Tel.: (55)32209362 - e-mail: comiteeticapesquisa@mail.ufsm.br.

ANEXO D — Produção bibliográfica obtida durante o período de realização do Mestrado:

Artigo publicado:

1. De Lucca, Leidiane; Rodrigues, Fabiane; Jantsch, Letícia; Neme, Walter; Gallarreta, Francisco; Gonçalves, Thissiane. *Oxidative Profile and δ -Aminolevulinate Dehydratase Activity in Healthy Pregnant Women with Iron Supplementation*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, p. 463, 2016.

Resumos publicados em anais de congressos:

1. Rodrigues, F.; Lucca, L.; Jantsch, LB.; Goncalves, TL. *Estimação da concentração de Ácido Ascórbico no Plasma de Gestantes Diabéticas do Tipo 2*. In: **VIII Congresso Internacional de Bioanálises, XI Congresso Sul Brasileiro de Biomedicina e XV Semana Gaúcha de Biomedicina**, 2015, Novo Hamburgo.
2. Jantsch, LB.; Rodrigues, F.; De Lucca, L.; Goncalves, TL. *Avaliação dos Níveis de TBARS e Vitamina C em Gestantes com Diabetes Mellitus Gestacional*. In: **3º Congresso Internacional em Saúde: Atenção Integral à Saúde**, 2015, Ijuí.
3. De Lucca, L.; Nicoli, BD.; Rodrigues, F.; Goncalves, TL. *Quantificação da Vitamina C em Gestantes com pré-Eclâmpsia*. In: **VIII Congresso Internacional de Bioanálises, XI Congresso Sul Brasileiro de Biomedicina e XV Semana Gaúcha de Biomedicina**, 2015, Novo Hamburgo.
4. De Lucca, L.; Rodrigues, F.; Goncalves, TL. *Avaliação da Atividade da Enzima Delta-Aminolevulinato Desidratase em Gestantes com Pré-Eclâmpsia*. In: **XVIII Congresso Gaúcho de Ginecologia e Obstetrícia**, 2015, Porto Alegre.