

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

Hellen Lopes de Paula

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM GESTANTES COM  
DIABETES *MELLITUS* PRÉ-EXISTENTE E GESTACIONAL**

Santa Maria, RS  
2019

**Hellen Lopes de Paula**

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM GESTANTES COM DIABETES  
*MELLITUS* PRÉ-EXISTENTE E GESTACIONAL**

Dissertação apresentada ao Curso 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<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Thissiane de Lima Gonçalves Bernasconi

Santa Maria, RS  
2019

de Paula, Hellen  
AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM GESTANTES COM  
DIABETES MELLITUS PRÉ-EXISTENTE E GESTACIONAL / Hellen de  
Paula.- 2019.  
81 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, 2019

1. Delta-aminolevulinato-desidratase 2. Diabetes  
Mellitus na gestação 3. Diabetes Mellitus pré-gestacional  
4. Grávidas 5. Perfil oxidativo I. de Lima Gonçalves  
Bernasconi, Thissiane II. Título.

**Hellen Lopes de Paula**

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM GESTANTES COM DIABETES  
MELLITUS PRÉ-EXISTENTE E GESTACIONAL**

Dissertação apresentada ao Curso 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 11 de janeiro de 2019:**

---

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

---

**Etiane Tatsch, Dra. (UFSM)**

---

**Ricardo Brandão, Dr. (UFPE) - Parecer**

Santa Maria, RS  
2019

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho a minha amada mãe, meu anjo que me guia lá de cima. Obrigada pelo amor e dedicação incondicional, por acreditar em mim e me incentivar a evoluir. Muito do que sou devo a ti. Teus ensinamentos valerão a vida inteira. Te amarei eternamente!

Obrigada por tudo!

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, pelo fortalecimento diante dos desafios enfrentados. Agradeço também pelas oportunidades, e pessoas que me acompanharam nesta trajetória.

Aos meu pais, Paulo e Ercí (*in memoriam*), pessoas especiais, meus heróis, maiores exemplos de determinação, persistência, valentia, humildade e caráter. Obrigada pela confiança, apoio, carinho, amor, dedicação, pelas oportunidades oferecidas, apesar das dificuldades que por vezes enfrentamos, por acreditarem sempre na minha capacidade e auxiliarem na realização dos meus sonhos. Serei para sempre grata. Amo vocês!

Minha irmã Michelle e sobrinha Gabriela, obrigada por estarem ao meu lado mesmo de longe, apoiando e incentivando minhas decisões. Amo vocês!

À minha querida Tia Bata, obrigada por auxiliar sempre com muito carinho, estando presente nos momentos mais necessários.

Ao meu marido André, difícil descrever em palavras todo apoio, paciência, dedicação, amor e companheirismo. Obrigada por estar sempre ao meu lado, fornecendo doses diárias de força e incentivo. Presente de Deus que ilumina meus dias, é maravilhoso poder contar contigo. Te amo! E a sua família, que hoje também é minha, por me acolher, preocuparem-se comigo, e apoiarem minhas escolhas.

Aos amigos Carmen, Daiane, Fallon, Janete e Jaqueline, pelo apoio, momentos de descontração, companheirismo, carinho, preocupação, conversas e conselhos.

À amiga Juciara e família, pela amizade, carinho e cuidado.

Aos colegas de trabalho do Serviço de Hemoterapia do HUSM e da Farmácia Escola, tive muita sorte de encontrar pessoas tão maravilhosas como vocês. Em especial aos chefes Zanoni e Liziane, que sempre entenderam meus horários complicados, colaborando muito para que eu pudesse concluir mais essa etapa.

À minha querida orientadora Thissiane, por ter acreditado em mim, mesmo sem ter experiência na pesquisa, pela dedicação, carinho, ensinamentos e apoio no desenvolvimento desse trabalho.

Às colegas do laboratório Bárbara, Fabi, Letícia, Leidi, Lígia e Silmara, pela amizade e empenho em todas nossas atividades. Agradeço em especial, a Leidi pela dedicação e paciência ao transmitir tudo que me foi ensinado, e a Silmara pelo companheirismo em todo o mestrado, auxílio nos momentos difíceis, e apoio nas coletas e experimentos.

Aos professores, membros da banca, Etiane, Ricardo e Marli, pela disponibilidade e pelas sugestões que certamente serão muito importantes para o aprimoramento desse trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas pela acolhida e auxílio sempre que preciso.

À UFSM e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, que contribuíram grandemente para minha formação profissional, proporcionando ensino público de qualidade.

À CAPES pela concessão do apoio financeiro para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos funcionários do HUSM, especialmente ao Ambulatório de Gestantes de Alto Risco, pela disponibilidade, compreensão e auxílio nos dias de coleta.

Um agradecimento muito especial a todas as gestantes com diabetes, pela boa vontade e colaboração na participação da pesquisa.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento e conclusão desse trabalho.

**MUITO OBRIGADA!**

“Conheça todas as teorias,  
domine todas as técnicas,  
mas ao tocar uma alma humana,  
seja apenas outra alma humana.”

(Carl Jung)

## RESUMO

### **AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM GESTANTES COM DIABETES *MELLITUS* PRÉ-EXISTENTE E GESTACIONAL**

AUTORA: Hellen Lopes de Paula

ORIENTADORA: Thissiane de Lima Gonçalves Bernasconi

Durante o período gestacional normal, há uma elevação do metabolismo oxidativo devido à grande demanda de oxigênio requisitada pela mãe, pelo feto e pela placenta. Em gestantes com patologias adicionais, como é o caso do Diabetes *Mellitus* (DM), essas circunstâncias podem estar ainda mais aumentadas. O DM trata-se de um distúrbio metabólico de origem diversa, caracterizado por hiperglicemia e alterações no metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras, que são geradas pelo defeito na ação e/ou secreção da insulina. Na gestação essa patologia pode estar presente de duas formas: prévia a gravidez e desenvolvida no período gestacional, geradas dessa forma em momentos distintos no organismo. O estresse oxidativo é dito como o estado onde ocorre a perda do equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes no organismo, resultado principalmente da produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (EROs), tendo um importante papel na patogênese de muitas doenças, incluindo o diabetes e suas complicações. Nesse contexto, também está inserida a enzima delta-aminolevulinato-desidratase ( $\delta$ -ALA-D), pois esta pode estar inibida em situações pró-oxidativas, gerando diminuição da biossíntese de compostos, como é o caso do grupamento heme, e acúmulo de seu substrato ácido 5-aminolevulínico (ALA), que contribui diretamente para a elevação desse estado oxidativo pelo acúmulo de EROs. Considerando a influência do estresse oxidativo sobre a gestação e sobre o DM, este trabalho teve como objetivo, avaliar de forma comparativa, o perfil oxidativo e antioxidativo, bem como a atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D, em gestantes com diabetes tipo 2 prévia a gestação (DM2), Diabetes *Mellitus* Gestacional (DMG) e grupo controle (gestantes hípidas). Foram analisados parâmetros de estresse oxidativo através da quantificação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), dos grupos tióis proteicos (P-SH) e não proteicos (NP-SH), os níveis de vitamina C, além da determinação da atividade das enzimas catalase e  $\delta$ -ALA-D, nos diferentes grupos de gestantes. Os níveis de TBARS foram maiores, enquanto que os NP-SH e vitamina C, diminuídos, nas gestantes com DM, sem diferença significativa entre os dois grupos. Já os P-SH mostraram-se significativamente diminuídos nas gestantes com DMG, e a atividade da enzima catalase no grupo com DM2 prévia. A atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D mostrou-se significativamente diminuída em amostras de gestantes com DMG, enquanto no grupo com DM2 prévia a gestação, apresentou-se de modo semelhante ao controle. Dessa forma, confirma-se que o estresse oxidativo está mais elevado nas gestantes com DM, assim como as defesas antioxidantes diminuídas, e embora ambos tipos de diabetes possam estar presentes na gestação, e sejam gerados pela intolerância a carboidratos, eles são eventos diferenciados e, portanto, produzem efeitos distintos no organismo materno.

**Palavras-chave:**  $\delta$ -ALA-D. Diabetes *Mellitus* na gestação. Diabetes *Mellitus* Pré-gestacional. Grávidas. Perfil Oxidativo.

## ABSTRACT

### EVALUATION OF OXIDATIVE STRESS IN PREGNANT WOMEN WITH PRE-EXISTING AND GESTATIONAL DIABETES *MELLITUS*

AUTHOR: Hellen Lopes de Paula  
ADVISOR: Thissiane de Lima Gonçalves Bernasconi

During the normal gestational period, there is an elevation of oxidative metabolism due to the high demand for oxygen required by the mother, fetus and placenta. In pregnant women with additional pathologies, such as Diabetes Mellitus (DM), these circumstances may be even greater. DM is a metabolic disorder of diverse origin, characterized by hyperglycemia and changes in the metabolism of carbohydrates, proteins and fats, which are generated by the defect in the action and/or secretion of insulin. In pregnancy this pathology may be present in two ways: prior to pregnancy and developed in the gestational period, thus generated at different times in the body. Oxidative stress is said to be the state where the loss of balance between oxidants and antioxidants in the body occurs, primarily as a result of increased production of reactive oxygen species (ROS), and plays an important role in the pathogenesis of many diseases, including diabetes and complications. In this context, the enzyme delta-aminolevulinic acid dehydratase ( $\delta$ -ALA-D) is also inserted, since this enzyme may be inhibited in pro-oxidative situations, causing a decrease in the biosynthesis of compounds, as in the case of the heme group, and its substrate 5-aminolevulinic acid (ALA), which directly contributes to the elevation of this oxidative state by the accumulation of ROS. Considering the influence of oxidative stress on pregnancy and on DM, this study aimed to evaluate, in a comparative way, the oxidative and antioxidative profile, as well as the  $\delta$ -ALA-D enzyme activity, in pregnant women with previous type 2 diabetes gestation (DM2), Gestational Diabetes Mellitus (DMG) and control group (healthy pregnant women). Oxidative stress parameters were analyzed by quantification of thiobarbituric acid reactive species (TBARS), protein thiol groups (P-SH) and non-protein (NP-SH) groups, vitamin C levels, and determination of enzyme activity catalase and  $\delta$ -ALA-D, in the different groups of pregnant women. The levels of TBARS were higher, whereas NP-SH and vitamin C were decreased in pregnant women with DM, with no significant difference between the two groups. The P-SH levels were significantly reduced in pregnant women with DMG, and the activity of the enzyme catalase in the DM2 group. The activity of the  $\delta$ -ALA-D enzyme was significantly reduced in samples from pregnant women with GDM, whereas in the group with DM2 prior to gestation, it was similar to the control. Thus, it is confirmed that oxidative stress is higher in pregnant women with DM, as well as diminished antioxidant defenses, and although both types of diabetes may be present during pregnancy, and are generated by carbohydrate intolerance, they are differentiated events and, therefore, produce different effects in the maternal organism.

**Keywords:**  $\delta$ -ALA-D. Diabetes *Mellitus* in pregnancy. Pre-gestational Diabetes *Mellitus*. Pregnant. Oxidative profile.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 - Sintomas do diabetes tipo 1.....	18
Figura 2 - Mecanismo de resistência à insulina.....	19
Figura 3 - Sintomas do diabetes tipo 2.....	20
Figura 4 - Complicações microvasculares e macrovasculares.....	23
Figura 5 - Fluxograma para o diagnóstico do diabetes na gestação.....	26
Figura 6 - Planilha de monitoramento domiciliar da glicemia para gestantes em dieta e/ou com bom controle glicêmico.....	32
Figura 7 - Planilha de monitoramento domiciliar da glicemia para gestantes em uso de insulina e/ou mau controle glicêmico.....	33
Figura 8 - Formação de radicais livres com origem do oxigênio molecular.....	35
Figura 9 - Etapas do processo de peroxidação lipídica.....	36
Figura 10 - Mecanismo de ação do sistema antioxidante enzimático.....	39
Figura 11 - Formação do porfobilinogênio pela enzima $\delta$ -ALA-D.....	41
Figura 12 - Relação entre taxas de geração de oxidantes, atividade antioxidante e dano oxidativo no diabetes.....	44
Figura 13 - Hiperglicemia, estresse oxidativo e os danos gerados no feto.....	45

### MANUSCRITO

Figura 1 – A. $\delta$ -ALA-D enzyme activity in the groups of pregnant women analyzed.....	63
B. Reactivation index of $\delta$ -ALA-D in pregnant women with and without diabetes.....	63

## LISTA DE TABELAS

### REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1 - Critérios para o teste de diabetes ou pré-diabetes em adultos assintomáticos.....	17
Tabela 2 - Critérios laboratoriais para diagnóstico de normoglicemia, pré-diabetes e DM, adotados pela Sociedade Brasileira de Diabetes.....	22
Tabela 3 - Recomendações adotadas pela Sociedade Brasileira de Diabetes, para rastreamento e diagnóstico de DM na gestação.....	25
Tabela 4 - Espécies Reativas de Oxigênio.....	35

### MANUSCRITO

Tabela 1 - Clinical, demographic and laboratory parameters of the pregnant women analysed.....	64
Tabela 2 - Gestational characteristics of pregnant women with diabetes and their newborns....	65
Tabela 3 - Oxidative stress markers of the pregnant women analyzed.....	66
Tabela 4 - Correlations between $\delta$ -ALA-D activity and oxidative stress parameters.....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGE	Produto Final de Glicação Avançada (Advanced Glycation End-products)
ADA	Associação Americana de Diabetes (American Diabetes Association)
ALA	Ácido 5-Aminolevulínico
δ-ALA-D	Delta-Aminolevulinato-Desidratase
ANTI-GAD	Antidescarboxilase do Ácido Glutâmico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CAT	Catalase
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
CCS	Centro de Ciências da Saúde
DACT	Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
DM	Diabetes <i>Mellitus</i>
DM1	Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo 1
DM2	Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo 2
DMG	Diabetes <i>Mellitus</i> Gestacional
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	5',5'- ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico)
DTT	Ditiotreitol
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
GSH	Glutathione Reduzida
GSSG	Glutathione Oxidada
HbA1c	Hemoglobina Glicada
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade (High Density Lipoprotein)
HUSM	Hospital Universitário de Santa Maria
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
IMC	Índice de Massa Corporal
LOOH	Hidroperóxido Lipídico
MAP	Monitorização Anteparto
MDA	Malondialdeído
OH•	Radical Hidroxila
OMS	Organização Mundial de Saúde
O <sub>2</sub>	Oxigênio Molecular
O <sub>2</sub> • <sup>-</sup>	Radical Ânion Superóxido
PBF	Perfil Biofísico Fetal
PBG	Porfobilinogênio
PKC	Proteína Quinase C
SAME	Serviço de Arquivo Médico
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
-SH	Grupamento Tiol
SOD	Superóxido Dismutase
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TOTG	Teste de Tolerância Oral à Glicose
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria

USD  
Zn<sup>2+</sup>

Dólares dos Estados Unidos (United States Dollar)  
Zinco

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO A</b> - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP).....	75
<b>ANEXO B</b> - Questionário aplicado às gestantes.....	78
<b>ANEXO C</b> - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	79
<b>ANEXO D</b> - Termo de Confidencialidade.....	80
<b>ANEXO E</b> - Produção bibliográfica obtida durante o período de realização do Mestrado.....	81

## SUMÁRIO

<b>1 APRESENTAÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO .....	16
1.1.1 Diabetes <i>Mellitus</i> .....	16
1.1.2 Estresse Oxidativo .....	34
1.1.3 Enzima Delta-Aminolevulinato-Desidratase .....	40
1.1.4 Gestação, Diabetes e Estresse Oxidativo .....	42
1.2 PROPOSIÇÃO.....	46
1.2.1 Proposição Geral .....	46
1.2.2 Proposições Específicas.....	46
1.3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	47
<b>2 MANUSCRITO – Assessment of clinical characteristics, oxidative stress markers, and <math>\delta</math>-aminolevulinate dehydratase enzyme activity among pregnant women with pre-gestational type 2 and gestational diabetes mellitus.</b> .....	<b>48</b>
<b>3 CONCLUSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>68</b>
<b>ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS (CEP).....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXO B - QUESTIONÁRIO APLICADO ÀS GESTANTES.....</b>	<b>78</b>
<b>ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXO D – TERMO DE CONFIDENCIALIDADE.....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO E – PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA OBTIDA DURANTE O PERÍODO DE REALIZAÇÃO DO MESTRADO.....</b>	<b>81</b>

## 1 APRESENTAÇÃO

O Diabetes *Mellitus* (DM) é uma das patologias que mais afeta as mulheres em período gestacional, e está relacionada com um risco mais elevado de complicações maternas e fetais (ARAÚJO; KEATING; MARTEL, 2015; PEUCHANT et al., 2004). A glicose elevada tem sido descrita como um dos principais fatores que geram as complicações do diabetes, e o estresse oxidativo também é relacionado como um importante elemento nessa patologia, inclusive quando associada a gestação e suas complicações (LÓPEZ-TINOCO et al., 2013). O efeito prejudicial da glicose alterada é mediado, dentre outras causas, pelo aumento de espécies reativas, atribuído a diferentes mecanismos (MAHMOUD et al., 2012; PEUCHANT et al., 2004).

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, sendo que qualquer alteração nessa relação pode gerar perturbação para o organismo. Pequenas mudanças podem ser solucionadas pela homeostase celular, porém quando em proporções maiores podem levar a danos irreparáveis. É também reconhecido por ter papel central na fisiopatologia de vários distúrbios, entre eles as complicações na gravidez (BURTON; JAUNIAUX, 2011).

Estreitamente relacionada a alterações oxidativas está a enzima delta-aminolevulinato-desidratase ( $\delta$ -ALA-D), pois possui grupos sulfidrílicos sensíveis a oxidação gerada por agentes oxidantes. Apresenta importante função na biossíntese do heme e, encontra-se inibida em situações pró-oxidantes, como no DM, podendo gerar o acúmulo do seu substrato, ácido 5-aminolevulínico (ALA), que pode intensificar a produção de espécies reativas, contribuindo para o cenário de estresse oxidativo (BONFANTI et al., 2011; ZANINI et al., 2014).

Diante dessas evidências, tem-se como propósito realizar uma análise comparativa dos parâmetros oxidativos, antioxidativos e da atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D, bem como seu índice de reativação, em grupos de gestantes que desenvolveram DM em diferentes momentos: mulheres que possuíam DM tipo 2 prévia a gestação e mulheres que desenvolveram o diabetes durante a gestação, e no grupo controle (gestantes hípidas).

## 1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1.1 Diabetes *Mellitus*

#### 1.1.1.1 Definição

O DM trata-se de um distúrbio metabólico de origem diversa, caracterizado por hiperglicemia e desordem no metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras, que são geradas pelo defeito na ação e/ou secreção da insulina (BRASIL, 2013). A insulina, produzida pelo pâncreas, é um hormônio essencial que auxilia na sinalização da glicose da corrente sanguínea até o interior das células do organismo, onde esta é convertida em energia. A falta de insulina ou a incapacidade das células de responder diante desta, provoca altos níveis de glicose no sangue, que é a principal característica do diabetes. A glicemia não controlada pode gerar danos a longo prazo em vários órgãos do corpo, podendo levar a sérias complicações. Por outro lado, se mantida dentro dos valores estipulados como referência, esses agravos podem ser retardados ou prevenidos (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017). Esta patologia gera alta morbimortalidade, com perda importante na qualidade de vida, sendo uma das principais causas de insuficiência renal, amputação de membros inferiores, cegueira e doença cardiovascular (BRASIL, 2004).

#### 1.1.1.2 Epidemiologia e impacto na saúde pública

O DM é considerado um relevante problema de saúde pública, representando um grande impacto nos gastos para os sistemas de saúde e economia do mundo todo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Em 2017, a estimativa mundial dos gastos em saúde para pessoas com DM entre 20 e 79 anos, foi de USD 727.000 milhões. Além dessas despesas financeiras, o diabetes acarreta também outros custos associados à dor, ansiedade, inconveniência e menor qualidade de vida que afeta não só os doentes, como suas famílias. O diabetes representa também carga adicional à sociedade, em decorrência da perda de produtividade no trabalho, aposentadoria precoce e mortalidade prematura (BRASIL, 2004; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017).

Nesse mesmo ano, calculava-se que 425 milhões de pessoas nessa faixa de idade possuíam a patologia no mundo, sendo deste total 26 milhões provenientes da América do Sul e Central. O Brasil, neste cenário, ocupava o quarto lugar no ranking mundial, com

aproximadamente 12,5 milhões de pessoas com a doença, porém é estimado que em 2045 esteja na quinta posição com 20,3 milhões, revelando um aumento de 62,4% de sua população nesta faixa afetada pelo distúrbio (BRASIL, 2004; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017).

A glicemia elevada é citada como o terceiro fator, em ordem de relevância, como causa de mortalidade prematura a nível mundial, ficando atrás apenas de pressão arterial aumentada e utilização de tabaco (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). No Brasil, foi calculado que em 2017, 108.600 pessoas perderam a vida devido esse distúrbio (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017).

O aumento da prevalência desta doença está associado a diversas causas, como: urbanização acelerada, mudança epidemiológica e nutricional, excesso de peso e estilo de vida sedentário mais frequente entre os indivíduos, crescimento e envelhecimento da população e sobrevida das pessoas que possuem a patologia (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). Na tabela abaixo são citados alguns fatores de risco utilizados como critério para que o teste para o diabetes seja realizado:

Tabela 1- Critérios para o teste de diabetes ou pré-diabetes em adultos assintomáticos.

---

Os testes devem ser considerados em adultos com sobrepeso ou obesidade ( $IMC \geq 25Kg/mm^2$ ) que tenham um ou mais dos fatores de risco abaixo:

- Parente de primeiro grau com diabetes;
- Raça/etnia de alto risco (por exemplo, afro-americanos, latinos, americanos nativos, asiáticos-americanos, pessoas provenientes das ilhas do Pacífico);
- História de Doenças Cardiovasculares;
- Hipertensão ( $\geq 140/90mmHg$  ou em terapia para hipertensão);
- Nível de colesterol HDL  $< 35 mg/dL$  e/ou nível de triglicérides  $> 250 mg/dL$ ;
- Mulheres com síndrome dos ovários policísticos;
- Inatividade física;
- Outras condições clínicas associadas à resistência à insulina (por exemplo, obesidade grave, acantose nigricans).

---

Pacientes com pré-diabetes ( $HbA1c \geq 5,7\%$ ) devem ser testados anualmente.

---

As mulheres que foram diagnosticadas com DMG devem fazer testes ao longo da vida pelo menos a cada 3 anos.

---

Para todos os outros pacientes, o teste deve começar aos 45 anos de idade.

---

Se os resultados forem normais, os testes devem ser repetidos em intervalos de pelo menos 3 anos, com a consideração de testes mais frequentes, dependendo dos resultados iniciais e do status de risco.

---

DMG: Diabetes *Mellitus* Gestacional; HbA1c: Hemoglobina Glicada; HDL: Lipoproteína de Alta Densidade (High Density Lipoprotein); IMC: Índice de Massa Corporal.

Fonte: Adaptação de AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (2018).

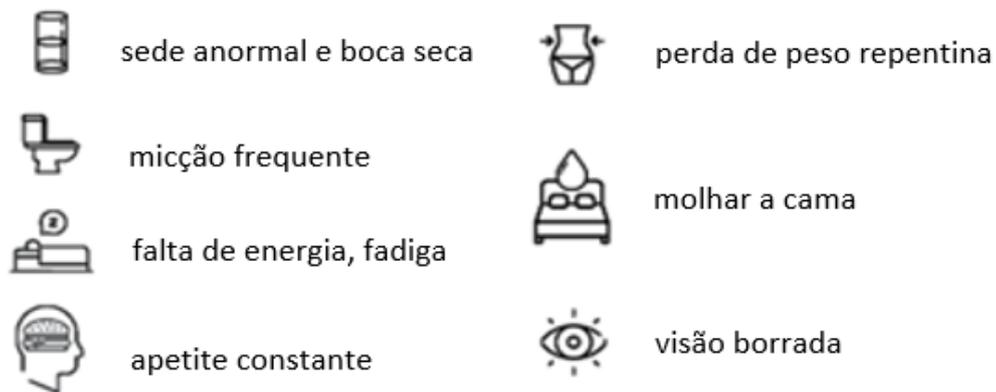
### 1.1.1.3 Classificação

O DM pode ser classificado em quatro categorias de acordo com a sua etiologia, segundo a Associação Americana de Diabetes (ADA) e a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD):

#### **Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1)**

Doença autoimune com aparecimento normalmente abrupto, decorrente da destruição das células  $\beta$  pancreáticas, geralmente leva a deficiência absoluta de insulina, quando a administração da mesma é necessária para prevenir a cetoacidose. É mais frequentemente diagnosticada em crianças, adolescentes e adultos jovens, atingindo igualmente homens e mulheres. É subdividida em DM tipo 1A, forma mais incidente, confirmada pela positividade de um ou mais autoanticorpos, como, antidescarboxilase do ácido glutâmico (anti-GAD), anti-ilhotas e anti-insulina, e DM tipo 1B ou idiopática, considerada quando não são detectáveis autoanticorpos na circulação (BRASIL, 2013; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). Abaixo estão citados alguns sintomas apresentados no DM1:

Figura 1- Sintomas do diabetes tipo 1.



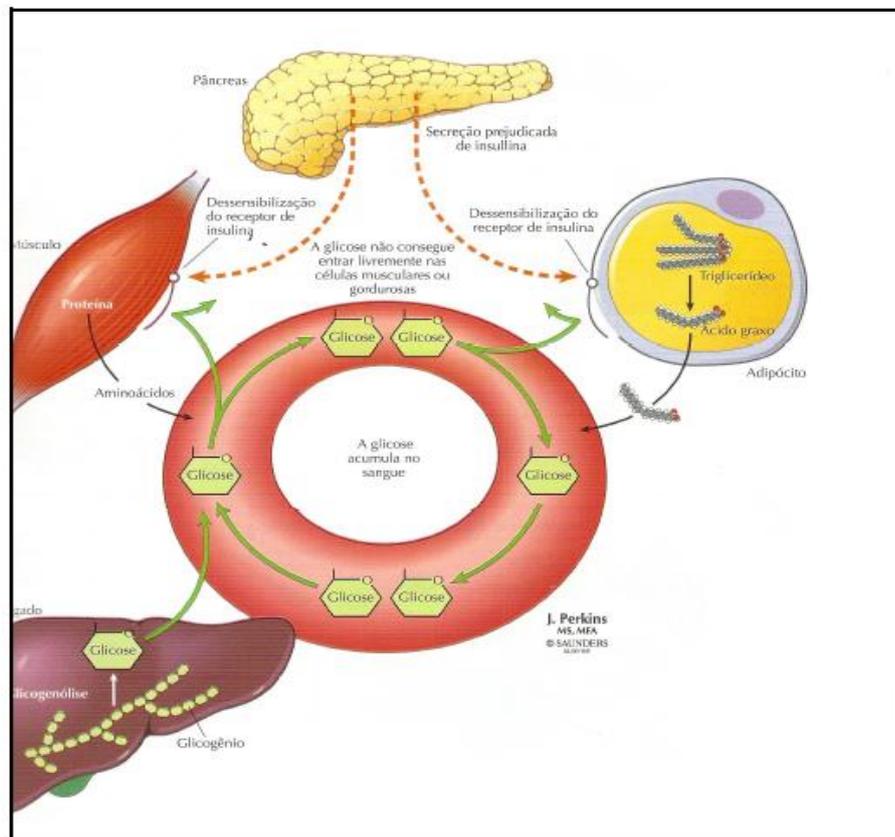
Fonte: Adaptação de INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (2017).

#### **Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2)**

É considerado o distúrbio endócrino mais comum, correspondendo a 90 a 95% de todos os casos de DM. Os fatores de risco para o desenvolvimento deste tipo da patologia são: história familiar da doença, avançar da idade, obesidade, sedentarismo, diagnóstico prévio de pré-diabetes ou diabetes *mellitus* gestacional (DMG) e presença de componentes da síndrome

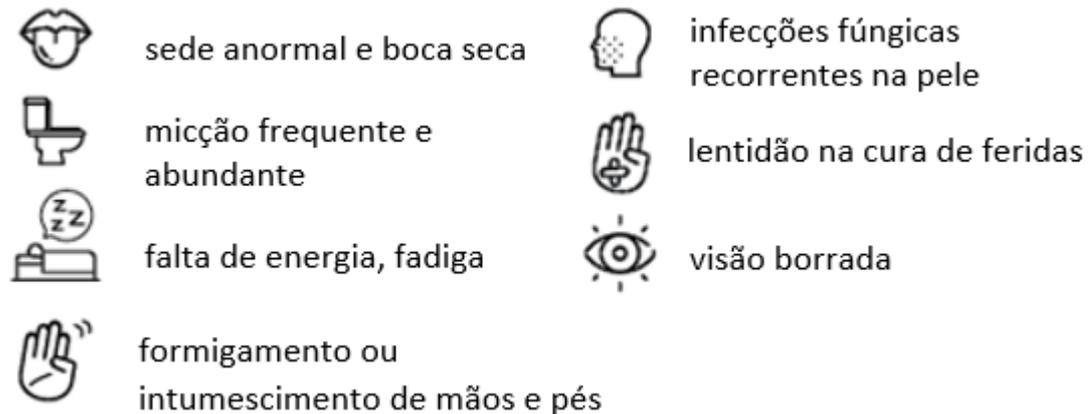
metabólica, tais como hipertensão arterial e dislipidemia. A adiposidade corporal, quando associada ao DM2, é distribuída de forma central, indicando acúmulo de gordura nas vísceras. Esse tecido desenvolvido de forma excessiva, produz citocinas pró-inflamatórias e gera resistência à insulina (Figura 2). Sendo avaliado como uma deficiência relativa, ou seja, há um estado de resistência a ação, juntamente com defeito na secreção de insulina. Pode levar anos para que sua administração seja necessária, porém nestes casos, seu uso visa a manutenção do controle da glicemia (BRASIL, 2013; GELALETI et al., 2015; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). Na maioria da população pré-diabética, a primeira anormalidade é resistência à insulina que precede o desenvolvimento da intolerância à glicose. Inicialmente, o pâncreas tenta compensar a resistência através do aumento de sua secreção. Quando o pâncreas é incapaz de manter uma resposta hiperinsulinêmica suficiente, o diabetes instala-se como consequência da perda progressiva da função das células  $\beta$ . Pacientes com DM2 também são caracterizados pela redução da massa de células  $\beta$  em comparação com sujeitos não diabéticos (GELALETI et al., 2015).

Figura 2- Mecanismo de resistência à insulina.



A seguir são apresentados alguns dos sintomas referidos no DM2:

Figura 3- Sintomas do diabetes tipo 2.



Fonte: Adaptação de INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (2017).

### **Diabetes *Mellitus* Gestacional**

É um estado de hiperglicemia, detectado pela primeira vez na gestação (BRASIL, 2013). Esta classificação será melhor descrita no decorrer do texto, por ser parte fundamental deste trabalho.

### **Tipos específicos de Diabetes *Mellitus* devido a outras causas**

Fazem parte desta categoria de classificação, os tipos menos comuns de DM, com apresentação clínica bastante variada e dependente da alteração de base que provocou o distúrbio. São exemplos deste tipo da doença: defeitos genéticos na função da célula  $\beta$  pancreática e na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, diabetes induzida por medicamentos ou agentes químicos, infecções, formas incomuns autoimunes e síndromes genéticas associadas ao DM (BRASIL, 2013; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

#### *1.1.1.4 Diagnóstico*

Os testes preconizados para o diagnóstico da doença, pela ADA, e SBD, segundo diretrizes 2017-2018, são:

- Dosagem de glicose plasmática de jejum  
Ausência de ingestão de calorias por pelo menos 8 horas;
- Dosagem de glicose plasmática aleatória (ao acaso, independente de jejum)  
Para pacientes com sintomas clássicos de hiperglicemia, tais como poliúria, polidipsia, polifagia e emagrecimento;
- Teste de tolerância oral a glicose (TOTG) (curva de ingestão de 75 g de glicose anidra dissolvida em água)  
Uma amostra de sangue é coletada antes da ingestão da glicose, e outra após 2h da sobrecarga;
- Hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>)  
Refere-se à percentagem de glicosilação da hemoglobina, aproximando os níveis médios de glicose no sangue ao longo dos últimos dois a três meses, a partir da lenta renovação de glóbulos vermelhos no corpo (PIPPITT; LI; GURGLE, 2016). Apresenta algumas vantagens em relação aos outros métodos, como: não necessitar de jejum, ser uma medida que reflete a glicemia nos três meses anteriores à dosagem e ser mais estável. Porém, sofre interferência no seu resultado por hemoglobinas variantes (hemoglobinopatias), assim como quando a renovação dos glóbulos vermelhos é aumentada, como na gravidez (segundo e terceiro trimestre), doença falciforme, terapia com eritropoietina, perda de sangue, transfusão e hemodiálise  
Na Tabela 2 são citados os critérios utilizados pela SBD para o diagnóstico de normoglicemia, pré-diabetes e DM.

Tabela 2- Critérios laboratoriais para diagnóstico de normoglicemia, pré-diabetes e DM, adotados pela Sociedade Brasileira de Diabetes.

	<b>Glicose em jejum (mg/dL)</b>	<b>Glicose 2 horas após sobrecarga com 75 g de glicose (mg/dL)</b>	<b>Glicose ao acaso</b>	<b>HbA<sub>1c</sub> (%)</b>	<b>Observações</b>
Normoglicemia	<100	<140	-	<5,7	OMS emprega valor de corte de 110 mg/dL para normalidade da glicose em jejum.
Pré-diabetes ou risco aumentado para DM	$\geq 100$ e $< 126^*$	$\geq 140$ e $< 200^\#$	-	$\geq 5,7$ e $< 6,5$	Positividade de qualquer dos parâmetros confirma diagnóstico de Pré-diabetes.
Diabetes estabelecido	$\geq 126$	$\geq 200$	$\geq 200$ com sintomas inequívocos de hiperglicemia	$\geq 6,5$	Positividade de qualquer dos parâmetros confirma diagnóstico de DM. Método de HbA <sub>1c</sub> deve ser o padronizado. Na ausência de sintomas de hiperglicemia, é necessário confirmar o diagnóstico pela repetição de testes.

\* Categoria também conhecida como glicemia de jejum alterada; # Categoria também conhecida como intolerância oral a glicose.

OMS: Organização Mundial da Saúde; HbA<sub>1c</sub>: Hemoglobina Glicada; DM: Diabetes *Mellitus*.

Fonte: (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

#### 1.1.1.5 Complicações

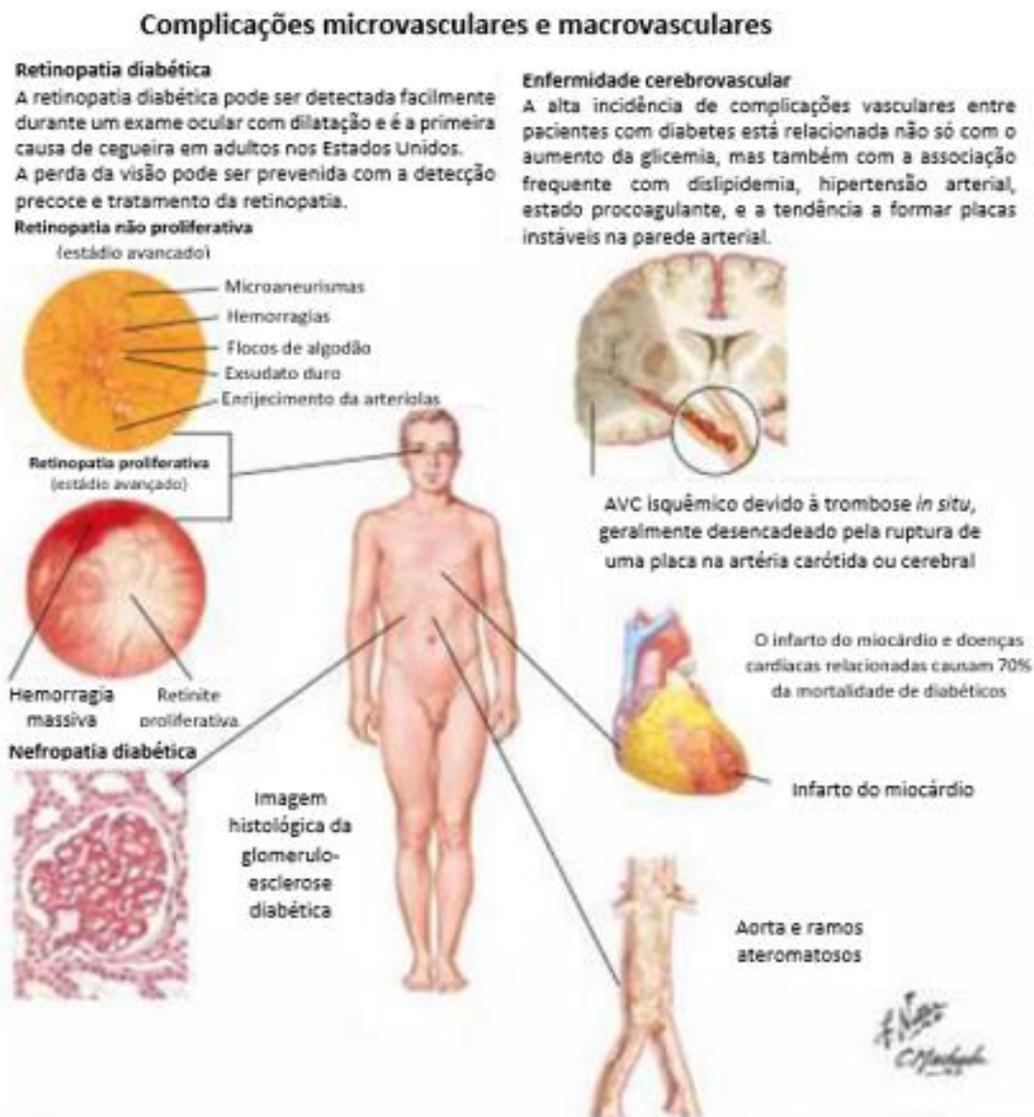
##### **Complicações agudas**

As principais complicações agudas relacionadas ao DM são: cetoacidose diabética, hipoglicemia e estado hiperosmolar hiperglicêmico, inclusive a prevenção de mortes ocasionadas por estas causas é de grande importância, por muitas vezes serem evitáveis (KLAFKE et al., 2015).

## Complicações Crônicas

Geralmente as complicações crônicas do DM aparecem após muitos anos de doença e são essencialmente do tipo vascular (PESCOSOLIDO; CAMPAGNA; BARBATO, 2014). A progressão desses danos também é regulada por outros fatores como hipertensão, dislipidemia, obesidade e tabagismo. Estas complicações estão categorizadas em distúrbios micro e macrovasculares (Figura 4), que acabam por resultar em retinopatia, nefropatia, neuropatia, doença coronariana, doença cerebrovascular e doença arterial periférica (PESCOSOLIDO; CAMPAGNA; BARBATO, 2014; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

Figura 4 – Complicações microvasculares e macrovasculares.



### *1.1.1.6 Diabetes na Gestação*

O diabetes na gestação é considerado uma condição de alto risco materno-fetal, e o aumento da incidência global da patologia, estende-se também a esse período (McCANCE, 2015). A nível mundial, em 2017 foi estimado que 21,3 milhões (16,2%) de crianças nascidas vivas de mães entre 20-49 anos foram afetadas pela hiperglicemia na gestação (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017). Esse distúrbio pode ser pré-gestacional, ou desenvolver-se durante a gestação, tendo desta forma, etiologias diferenciadas (HESLLER; DUNEMN, 2017).

A gravidez é um período de vida progressivamente hiperglicêmico, e também uma situação fisiológica de resistência à insulina, e dessa forma pode ser o primeiro momento na vida de uma mulher para testar sua capacidade para responder a um estresse fisiológico e para detectar aquelas em maior risco de desenvolver diabetes no futuro (SUHAIL et al., 2010; ZHU et al., 2015).

Esse distúrbio, quando presente na gestação pode afetar não só o desenvolvimento, como também gerar danos ao longo de toda vida do bebê em formação. É responsável especialmente por macrosomia e malformações fetais, bem como por índices elevados de morbimortalidade perinatal (BRASIL, 2010; ORNOY et al., 2015). Porém, a detecção precoce e o controle metabólico têm potencial para reduzir muito os efeitos do ambiente hiperglicêmico em um feto em crescimento (HESLLER; DUNEMN, 2017).

#### *1.1.1.6.1 Diagnóstico do Diabetes na Gestação*

Na primeira consulta de pré-natal, idealmente realizada no primeiro trimestre de gestação, é sugerido que seja investigado DM pré-existente através da realização de exames habituais. Nesse primeiro momento, as gestantes devem ser monitoradas pelos critérios utilizados em não gestantes e, confirmando-se o diagnóstico, devem ser consideradas portadoras de DM pré-existente (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). Dessa forma, o diagnóstico precoce do diabetes na gestação minimiza a exposição do feto em desenvolvimento para condições subótimas e previne complicações perinatais e suas sequelas (MAHMOUD et al., 2012).

É importante citar que o valor limite da glicemia em jejum durante a gestação difere do considerado normal para não gestantes, sendo  $< 92$  mg/dL em qualquer fase da gestação. Valores entre 92 e 126 mg/dL são diagnósticos de DMG em qualquer fase da gestação. Toda

mulher sem diagnóstico de DM prévia ou DMG, deve ser submetida a TOTG com 75 g de glicose após jejum calórico mínimo de 8 horas, entre 24 e 28 semanas de gestação, com coleta de glicose em jejum, 1 e 2 horas após sobrecarga. Sempre salientando a manutenção de dieta sem restrição de carboidratos nos três dias anteriores ao exame, sendo um único valor alterado no teste, suficiente para o diagnóstico de DMG (Tabela 3) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

Tabela 3- Recomendações adotadas pela Sociedade Brasileira de Diabetes, para rastreamento e diagnóstico de DM na gestação.

---

Na primeira consulta de pré-natal, recomenda-se avaliar as mulheres quanto a presença de DM prévio, não diagnosticado e francamente manifesto.

O diagnóstico de DM será feito se um dos testes a seguir apresentar-se alterado:

- Glicemia em jejum  $\geq 126$  mg/dL;
- Glicemia 2 horas após sobrecarga com 75 g de glicose  $\geq 200$  mg/dL;
- HbA1c  $\geq 6,5\%$ ;
- Glicemia aleatória  $\geq 200$  mg/dL na presença de sintomas;
- Confirmação será feita pela repetição dos exames alterados, na ausência de sintomas.

---

Sugere-se que seja feita dosagem de glicemia de jejum em todas as mulheres na primeira consulta de pré-natal.

---

Mulheres sem diagnóstico de DM, mas com glicemia de jejum  $\geq 92$  mg/dL, devem receber diagnóstico de DMG.

---

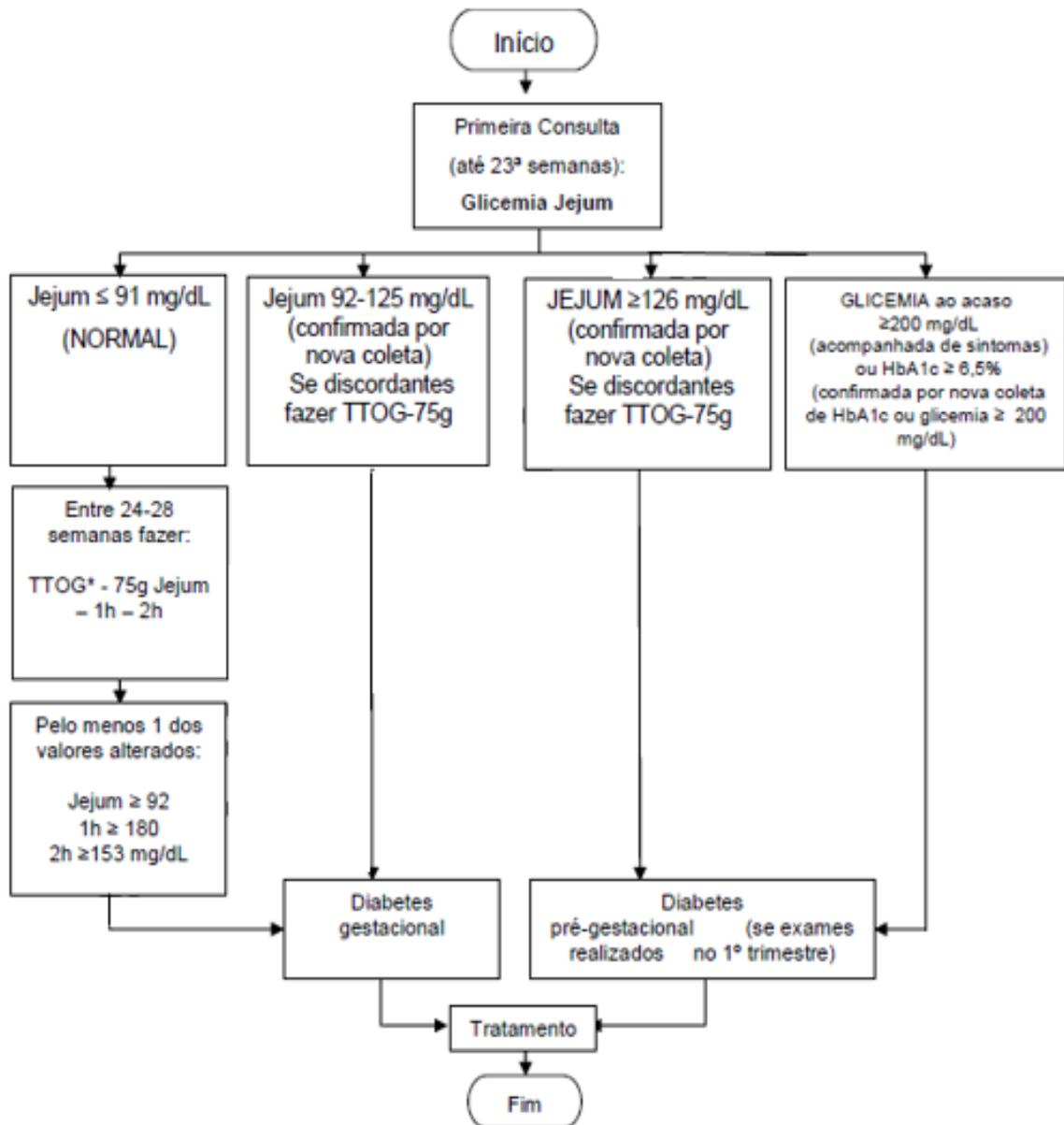
Toda mulher com glicemia de jejum  $< 92$  mg/dL inicial deve ser submetida a teste de sobrecarga oral com 75 g de glicose anidra entre 24 e 28 semanas de gestação, sendo o diagnóstico de diabetes gestacional estabelecido quando no mínimo um dos valores a seguir encontrar-se alterado:

- Glicemia em jejum  $\geq 92$  mg/dL;
  - Glicemia 1 hora após sobrecarga  $\geq 180$  mg/dL;
  - Glicemia 2 horas após sobrecarga  $\geq 153$  mg/dL.
- 

Fonte: Adaptação de SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (2017).

A seguir, está disponibilizado o fluxograma utilizado pelo Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) até o ano de 2018, para o diagnóstico do DM na gestação.

Figura 5- Fluxograma para o diagnóstico do diabetes na gestação.



TTOG/ TOTG: teste de tolerância oral à glicose - 75g: glicemia de jejum, 1 e 2 horas após ingestão de 75g de glicose.

Obs.: após o período de rastreio universal (1ª consulta até as 23 semanas) coletar diretamente o TOTG - 75g.

Fonte: (HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA, 2015).

#### 1.1.1.6.2 Fatores de Riscos e Possíveis Complicações

São bem definidos tanto para a mãe, como para o bebê, porém, são alterados de certo modo pelo tipo e duração do diabetes, controle glicêmico e danos relacionadas a patologia.

**Fatores de risco para a mãe**

Gerais: idade, paridade, peso, hipertensão, tabagismo e utilização de drogas;

Obstétricos: abortamento prévio, gravidez múltipla, deficiência nutricional e histórico obstétrico ruim (McCANCE, 2015).

**Possíveis Complicações**

Maternas: aborto espontâneo, retinopatia e nefropatia aceleradas, hipoglicemia, cetoacidose diabética, pré-eclâmpsia, hidrânio, parto operatório e infecção.

Fetais: natimortalidade, mortalidade perinatal, anomalias congênitas, feto com tamanho pequeno ou grande para a idade gestacional, parto pré-termo, parto operatório, distocia do ombro e lesão ao nascimento, hipoglicemia neonatal, policitemia, hipocalcemia e síndrome do desconforto respiratório (McCANCE, 2015).

**1.1.1.6.3 Fisiopatologia**

A gravidez caracteriza-se pelo estado de resistência à insulina, aliada também à intensa mudança nos mecanismos de controle da glicemia, em função do consumo de glicose pelo feto. O corpo está predisposto a resistir à insulina, à fim de manter altos níveis de glicose disponíveis para o bebê. Este estado pode contribuir para mulheres predispostas a ocorrência de alterações glicêmicas, favorecendo o desenvolvimento de DM durante a gestação. A patologia instala-se quando o pâncreas da paciente não é suficiente para superar a resistência à insulina natural criada pelo estado de gravidez (HESLLER; DUNEMN, 2017; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2016).

A placenta possui necessidades particulares de substrato, pois é um órgão com um alto metabolismo. Sendo a glicose o nutriente que atravessa a placenta nas maiores concentrações, utilizando cerca de 50% do total contido na circulação materna (HESLLER; DUNEMN, 2017).

O estado hiperglicêmico descrito acima pode não ser prevalente até que a placenta esteja totalmente formada e liberando hormônios que promovem sua ocorrência. A produção de alguns hormônios pela mesma e outros elevados pela gestação, tais como lactogênio placentário, cortisol e prolactina, podem promover redução da atuação da insulina em seus receptores e, conseqüentemente, uma elevada produção de insulina nas gestantes saudáveis. Esse mecanismo, entretanto, pode não ser observado em gestantes que já estejam com sua capacidade de produção de insulina no limite. Essas mulheres têm insuficiente aumento de produção de insulina e, assim,

podem desenvolver diabetes durante a gestação (HESLLER; DUNEMN, 2017; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2016).

Neste contexto, ocorre uma adaptação do metabolismo materno durante a gravidez envolvendo uma maior queda na glicose plasmática e aminoácidos, e uma maior mobilização de ácidos graxos livres no jejum durante a noite, do que no estado não-grávida associada à resistência à insulina hepática. Na gestação gerada de forma mais tardia, um aumento progressivo da glicose pós-prandial e sua resposta insulínica, associada à diminuição da sensibilidade à insulina, iguala-se ao crescimento da unidade placentária fetal e reverte rapidamente após o parto. Este anabolismo facilitado provoca mudanças apropriadas no metabolismo de carboidratos, aminoácidos e lipídios, e garante nutrientes adequados para o feto em desenvolvimento. Deficiência de reserva de células  $\beta$ , seja absolutamente, como no DM1, ou relativamente, como no DM2 ou DMG, resultará na adaptação anormal do metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras. Algumas hipóteses indicam que o estado hiperglicêmico da mãe acelera o crescimento fetal através da hiperinsulinemia fetal (McCANCE, 2015).

#### 1.1.1.6.4 Diabetes *Mellitus* Pré-existente

O diabetes diagnosticado antes da gestação, pode ser do tipo 1, tipo 2 ou de outros tipos, e representa 10% das grávidas com diabetes, sendo ideal que essas pacientes recebam cuidados apropriados antes mesmo de engravidar. Essas mulheres devem ser encaminhadas a centros especializados, onde seja visada, compensação metabólica antes da concepção, avaliação da presença de complicações crônicas decorrentes da doença e recebimento de orientações. É relevante que essas mulheres engravidem com níveis glicêmicos adequados, objetivando, prevenir malformações fetais associadas ao aumento da glicemia periconcepcional e as demais complicações que podem ocorrer, tanto para a mãe como para o feto, associadas a gestação. Quanto mais descontrolados os níveis glicêmicos estiverem no período da concepção, maior o risco de abortamento e malformações do concepto (BRASIL, 2010). Recomenda-se HbA1c < 6,5% antes da concepção, visando menor risco de anomalias congênitas. Essas gestantes apresentam maior risco de malformações fetais e outras complicações gestacionais e neonatais (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

Estudos têm revelado que o DM pré-existente quando mal controlado antes mesmo da concepção e durante o primeiro semestre, está associado a defeitos congênitos graves em 5-10% das gestações, e ao aborto espontâneo em 15-20%. Porém também podem gerar outros

tipos de complicações, inclusive problemas no desenvolvimento neurológico (ORNOY et al., 2015).

Apesar dos desafios que o DM pré-existente apresenta para o sucesso do resultado da gravidez, pesquisas mostram que cuidados incluindo controle glicêmico rigoroso, terapia anti-hipertensiva, avaliações clínicas regulares e identificação precoce de mulheres com risco de complicações, resulta em alta taxa de sobrevivência fetal, peso normal ao nascer e desenvolvimento sem efeitos negativos significativos sobre a saúde (ORNOY et al., 2015).

No DM 1, é necessária insulina suficiente para compensar o aumento das necessidades calóricas, aumentando a adiposidade, diminuindo o exercício e aumentando os hormônios anti-insulina. A dose de insulina para manter a normoglicemia e evitar a cetose materna pode aumentar em até três vezes durante a gestação no DM 1, e as mulheres com DM 2 geralmente necessitam de tratamento com insulina, muitas vezes em altas doses, devido à obesidade e à inatividade física (McCANCE, 2015).

A prevalência de indivíduos com DM 2 têm se elevado muito com o passar dos anos, afetando assim também as mulheres em idade reprodutiva. Mulheres que apresentam diabetes pré-gestacional possuem risco aumentado para complicações na gravidez comparado as que não possuem esta patologia, podendo vir a desenvolver: abortos espontâneos, distúrbios hipertensivos, parto prematuro, preferência por parto cesáreo e fetos com anomalias congênitas, além de mortalidade e morbidade perinatal (KINSLEY, 2007). Com frequência, mulheres com diabetes prévia à gestação apresentam retinopatia, nefropatia e neuropatia. As diretrizes recomendam triagem para complicações do diabetes antes e durante a gestação, bem como após o parto, pois podem manifestar ou ter progresso nestes tempos. A nefropatia diabética está associada com maiores taxas de anomalias congênitas e pré-eclâmpsia (SCHAEFER-GRAF et al., 2018). Inclusive, mulheres com DM apresentando nefropatia ou vasculopatia devem ser orientadas a não engravidar (BRASIL, 2010).

#### 1.1.1.6.5 Diabetes *Mellitus* Gestacional

O DMG é definido como intolerância a carboidratos, de intensidade variada, que é diagnosticada pela primeira vez ou iniciada durante a gestação. Geralmente desenvolve-se na segunda metade da gravidez e relaciona-se com a resistência à insulina, sendo sua prevalência de 1-4%, dependendo da origem étnica e idade (ORNOY, 2012). Gestantes com DMG apresentam risco aumentado de complicações maternas e perinatais, como pré-eclâmpsia, hidrâmnios, elevação de intervenções, futura DM2, macrossomia, anomalias congênitas,

anormalidades metabólicas e conseqüentemente obesidade na infância e adolescência (KARAMALI et al., 2017).

O teste de rastreamento para DMG deve ser oferecido, de acordo com os fatores de risco, a toda gestante durante o pré-natal, podendo ser requisitado na primeira consulta e/ou em 24 a 28 semanas de gravidez, sempre orientando sobre os riscos e benefícios deste rastreio, e as possíveis complicações próprias da patologia em questão (BRASIL, 2012).

Dados fornecidos por estudos anteriores revelam que até metade de todas as mulheres com esta condição podem progredir ao desenvolvimento de DM2 mais tardiamente, com a maior taxa de ocorrência nos primeiros 5 anos após a gravidez. Nesse sentido, o DMG pode servir para revelar as mulheres com predisposição a desenvolver o DM2 futuramente (MAHMOUD et al., 2012; RAYANAGOUDAR et al., 2016).

#### 1.1.1.6.6 Tratamento do Diabetes na Gestação

No cuidado da gestante com diabetes devem ser adotadas medidas que possam reduzir os eventos adversos gerados, a seguir são indicadas algumas recomendações:

##### **Dieta**

O tratamento inicial baseia-se na prescrição de uma dieta adequada para DM, que permita controle metabólico e ganho adequado de peso de acordo com o estado nutricional de cada gestante, avaliado pelo índice de massa corporal antes da gestação (BRASIL, 2010; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

##### **Exercício Físico**

A atividade física deve fazer parte da estratégia de manejo do diabetes na gestação. Gestantes sedentárias podem ser orientadas a iniciar um programa de caminhadas regulares, enquanto as que já praticavam exercícios regularmente podem mantê-los, evitando os de alto impacto. Deve-se seguir as contraindicações obstétricas (BRASIL, 2010; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017)

##### **Tratamento Farmacológico**

O tratamento farmacológico deve ser indicado quando após duas semanas de dieta os níveis glicêmicos permanecerem elevados. E pode ser realizado através da administração de hipoglicemiantes orais ou insulina (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

**Hipoglicemiantes orais**

Abaixo são citados os medicamentos, metformina e glibenclamida, utilizados na terapia medicamentosa para o controle da glicemia em gestantes diabéticas, outros agentes orais são contraindicados (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

**Metformina**

Atravessa a placenta. Preocupações com potenciais efeitos adversos tanto na mãe quanto no feto limitam seu uso na gravidez, por esse motivo seu uso na gestação ainda é motivo de controvérsia (ROJAS; GOMES, 2013). Porém vários estudos recentes não demonstram efeitos deletérios materno-fetais, entretanto consta na bula, por determinação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), como contraindição sua administração na gestação e amamentação, exceto sob orientação médica (CLORIDRATO DE METFORMINA, 2014; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

**Glibenclamida**

É uma sulfonilureia, que ultrapassa a barreira placentária. Dados recentes revelam que está associada a aumento do risco de hipoglicemia neonatal, maior ganho de peso materno, maior ganho de peso neonatal e macrossomia, sugerindo que deva ser utilizada com cautela (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

**Insulinoterapia**

Nas gestantes com diabetes prévia as necessidades de insulina são maiores e aumentam com a progressão da gravidez, devendo ser monitoradas de acordo com o perfil glicêmico. O crescimento fetal exagerado também é critério para o uso de insulina, quando a medida da circunferência abdominal fetal for igual ou superior ao percentil 75 em ecografia. Esquemas com doses múltiplas e associação de insulinas de ação intermediária e rápida podem ser usados quando necessário. As gestantes em uso de insulina e seus familiares devem ser orientados para o reconhecimento de sinais de hipoglicemia. Na ocorrência destes, deve ser realizada medição imediata da glicemia capilar se estiver disponível o glicosímetro (BRASIL, 2010; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

**1.1.1.6.7 Monitoramento do Tratamento**

É recomendado o monitoramento das glicemias capilares pré e pós-prandiais, de quatro a sete vezes por dia, especialmente nas gestantes em uso de insulina (SOCIEDADE





#### 1.1.1.6.8 Avaliação da vitalidade fetal

O Mobilograma ou Registro Diário de Movimentação Fetal, consiste na observação materna dos movimentos fetais após as principais refeições, sendo indicado a partir da 28ª semana. A presença de 10 movimentos fetais em um período de 2 horas ou 5-6 movimentos fetais na primeira hora, indica bem-estar fetal. Esse cuidado é importante, pois mesmo com exames de vitalidade recentes, o feto de mãe com diabetes pode ir a óbito inesperadamente, especialmente se apresentar glicemia elevada (ARAGÃO, 2008; HOSPITAL UNIVERSITÁRIO, 2015).

Nas gestantes utilizando tratamentos, como insulina ou hipoglicemiantes orais, sugere-se avaliação da vitalidade fetal após a 32ª semana de gestação, por meio da Monitorização Anteparto (MAP) e do Perfil Biofísico Fetal (PBF) semanal ou bissemanal. Naquelas com bom controle glicêmico com dieta, a avaliação da vitalidade fetal está indicada a partir da 36ª semana (HOSPITAL UNIVERSITÁRIO, 2015).

Dopplervelocimetria deve ser solicitada sempre que se suspeitar de insuficiência placentária, especialmente nos casos de diabetes pré-gestacional ou diabetes associado à hipertensão, pois este avalia as alterações de fluxo sanguíneo dos vasos fetais (ARAGÃO, 2008; HOSPITAL UNIVERSITÁRIO, 2015).

#### 1.1.2 Estresse Oxidativo

Estresse oxidativo é um termo utilizado para definir a perda do equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes no organismo (CHIKEZIE; OJIAKO; OGBUJI, 2015; FRIJHOFF et al., 2015). Este controle pode ser modificado pela elevação da produção dos níveis de espécies oxidantes, como espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou espécies reativas de nitrogênio (ERNs), diminuição da sua remoção, ou ainda pelo decréscimo das defesas antioxidantes (AGARWAL et al., 2012; TOLJIC et al., 2017).

Este cenário provoca a modificação de proteínas celulares, lipídios e DNA, atingindo não apenas o desempenho e a diferenciação, mas também pode levar a apoptose e dano celular (GAUSTER et al., 2017).

O termo EROs é utilizado para moléculas que contém pelo menos um átomo de oxigênio em sua estrutura, aplicando-se aos radicais livres (os quais possuem grande capacidade de gerar), e seus intermediários não-radicalares (Tabela 4). Essas espécies estão envolvidas em

importantes papéis nas células, como por exemplo nas vias de sinalização, porém em excesso podem levar a danos em moléculas essenciais para o organismo (BURTON; JAUNIAUX, 2011; DUHIG; CHAPPELL; SHENNAN, 2016). O metabolismo do oxigênio é essencial para a vida aeróbica, sendo a homeostase celular responsável pela manutenção de um balanço entre a formação e eliminação das EROs (PESCOSOLIDO; CAMPAGNA; BARBATO, 2014).

Tabela 4 – Espécies Reativas de Oxigênio.

Radicalares		Não-radicalares	
Hidroxila	$\text{OH}\cdot$	Peroxinitrito	$\text{ONOO}^-$
Alcoxila	$\text{L(R)O}\cdot$	Hipoclorito	$-\text{OCl}$
Hidroperoxila	$\text{HOO}\cdot$	Hidroperóxido	$\text{L(R)OOH}$
Peroxila	$\text{L(R)OO}\cdot$	Oxigênio Singlete	$\Delta\text{O}_2$
Óxido Nítrico	$\text{NO}\cdot$	Peróxido de Hidrogênio	$\text{H}_2\text{O}_2$
Superóxido	$\text{O}_2\cdot^-$		

Fonte: (ABUJA; ALBERTINI, 2001).

Radical livre refere-se a átomo ou molécula que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, e é este não-emparelhamento de elétrons que lhes confere alta reatividade, sendo em sua maioria derivados do metabolismo do oxigênio (Figura 8) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Figura 8 – Formação de radicais livres com origem do oxigênio molecular.



Fonte: (AUGUSTO, 2006).

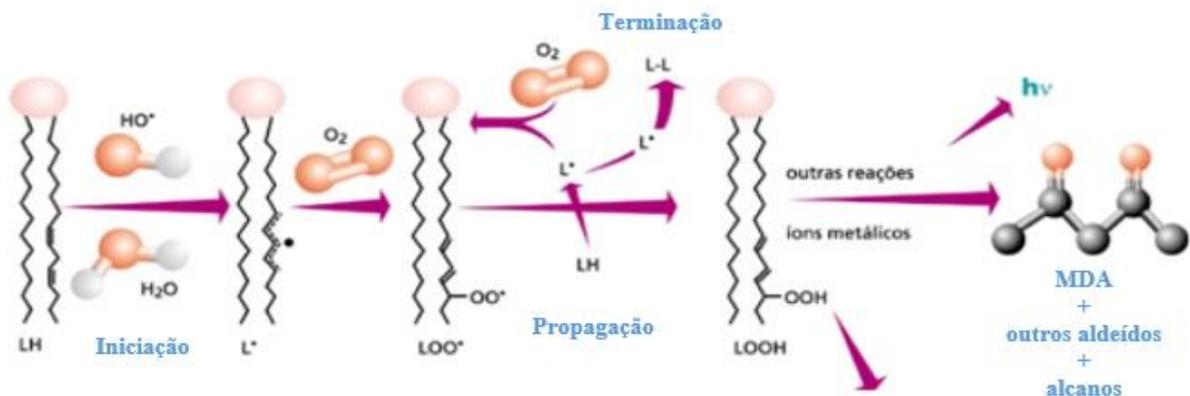
A geração de radicais livres no organismo ocorre via ação catalítica de enzimas durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular (fatores

endógenos) e pela exposição a fatores exógenos (ozônio, radiações gama e ultravioleta, medicamentos, dieta, cigarro, etc.) (COTINGUIBA et al., 2013).

Todos os componentes celulares podem ser alvo da ação das EROs, porém a membrana é um dos mais atingidos, levando a ocorrência da peroxidação lipídica, a qual acarreta alterações na estrutura e em sua permeabilidade. Com isso, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos, como o malondialdeído (MDA), culminando com a morte celular. A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, patológicos como o câncer, exacerbação da toxicidade de xenobióticos e envolvida na patogênese de muitos distúrbios degenerativos. Assim como na formação das EROs, nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos são importantes em processos fisiológicos como na reação em cascata a partir do ácido aracônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória. Todavia, o excesso de tais produtos pode ser lesivo (CHIKEZIE; OJIAKO; OGBUJI, 2015; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; LI et al., 2016).

A peroxidação lipídica é uma importante reação em cadeia de radical livre (HALLIWELL; CHIRICO, 1993), e a seguir são demonstradas as etapas desse processo:

Figura 9 – Etapas do processo de peroxidação lipídica.



Fonte: Adaptação de AUGUSTO (2006).

Medidas experimentais para verificação da peroxidação lipídica incluem MDA, 4-hidroxinonal, TBARS, hidroperóxido lipídico (LOOH) e isoprostanos (HALLIWELL, 2012; LAPPAS et al., 2011).

MDA é formado como resultado da peroxidação lipídica de ácidos graxos poli-insaturados, e é comumente utilizado para indicar lipoperoxidação e estresse oxidativo, sendo

facilmente medido no plasma. Este composto gerado reage facilmente com ácido tiobarbitúrico levando à formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) que fluorescem permitindo a sua fácil quantificação (CUFFE; XU; PERKINS, 2017).

Os hidroperóxidos têm efeitos tóxicos nas células tanto diretamente quanto através da degradação da hidroxila, que é um radical altamente tóxico. Eles também podem reagir com metais de transição como ferro ou cobre para formar aldeídos estáveis, como malondialdeídos, que por sua vez danificarão as membranas celulares. Os radicais peroxil podem remover o hidrogênio dos lipídios, produzindo hidroperóxidos que propagam ainda mais o radical livre (MARITIM; SANDERS; WATKINS, 2003).

Para resistir à formação excessiva das EROs, antioxidantes são sintetizados pelo organismo, e também adquiridos da dieta, desta maneira gradualmente neutralizam os radicais de oxigênio (HALLIWELL, 2007; GAUSTER et al., 2017). Os antioxidantes servem como protetores do organismo, desintoxicando o excesso dessas espécies produzidas pelo organismo, auxiliando assim na manutenção do equilíbrio oxidante/antioxidante. (AGARWAL et al., 2012). Podendo ser eficazes por agir de várias maneiras como: inibindo reações de oxidação de radicais livres, inibindo a formação de radicais lipídicos livres, interrompendo a propagação da reação em cadeia de auto-oxidação, através do sinergismo com outros antioxidantes, como agentes redutores que convertem hidroperóxidos em compostos estáveis, como quelantes de metais que convertem metais pró-oxidantes (derivados de ferro e cobre) em produtos estáveis, e finalmente como inibidores de enzimas pró-oxidativas (lipooxigenases) (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

Mecanismos de defesa antioxidante envolvem tanto estratégias enzimáticas, como não-enzimáticas, que trabalham em conjunto contra diferentes tipos de oxidantes (MARITIM; SANDERS; WATKINS, 2003). Os antioxidantes não enzimáticos podem ser endógenos, ou seja, produzidos pelo metabolismo, como o ácido lipóico, L-ariginina, coenzima Q10, glutathione, melatonina, ácido úrico, bilirrubina, proteínas quelantes de metais, transferrina, entre outros. E também compostos que não podem ser produzidos pelo corpo, e devem ser fornecidos através de alimentos ou suplementos, como por exemplo: vitamina E, vitamina C, carotenóides, traço metais (selênio, manganês, zinco), flavonóides, ômega-3 e ácidos graxos ômega-6 (PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008).

A glutathione (GSH) é a substância intracelular mais abundante antioxidante à base de grupamentos tiol. Sua função é principalmente como um tampão sulfidril, mas também serve para desintoxicar compostos por reações de conjugação catalisadas por glutathione S-transferases ou diretamente, como é o caso do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) na reação catalisada pela glutathione peroxidase (GPx) (NORDBERG; ARNÉR, 2001). Atua como um

eliminador direto de radicais livres, co-substrato para a atividade da GPx, e cofator de muitas enzimas, age também formando conjugados em reações (MARITIM; SANDERS; WATKINS, 2003). Sua forma reduzida (GSH) é oxidada ao seu dímero dissulfeto de glutathione (GSSG), mediada pela GPx, em resposta ao estresse oxidativo como meio de minimizar dano causado por espécies reativas (GORI et al., 2014; JIN et al., 2016). É um importante antioxidante tanto em ambientes intra, como extra celulares (DOTAN; LICHTENBERG; PINCHUK, 2004).

O grupamento tiol (-SH ou sulfidril) é uma forma altamente ativa e versátil de enxofre reduzido em biomoléculas. A concentração total de tiol é o resultado de vários grupos individuais de pequenos compostos (ex.:cisteína), peptídeos (ex.: glutathione) e proteínas tiólicas (ex.: tioredoxina), muito importante para a manutenção da homeostase redox. Vários estados patológicos associam-se à oxidação e modificação de tióis de forma a sugerir seu papel causal no evento patológico correspondente (GORI et al., 2014; OLIVEIRA; LAURINDO, 2018). Para sua quantificação, é comumente usado um ensaio espectrofotométrico, utilizando o ácido 5',5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB), o qual reage especificamente com os grupos de interesse, e pode representar a quantidade de GSH presente no sangue (BOYNE; ELLMAN, 1972; HU, 1994).

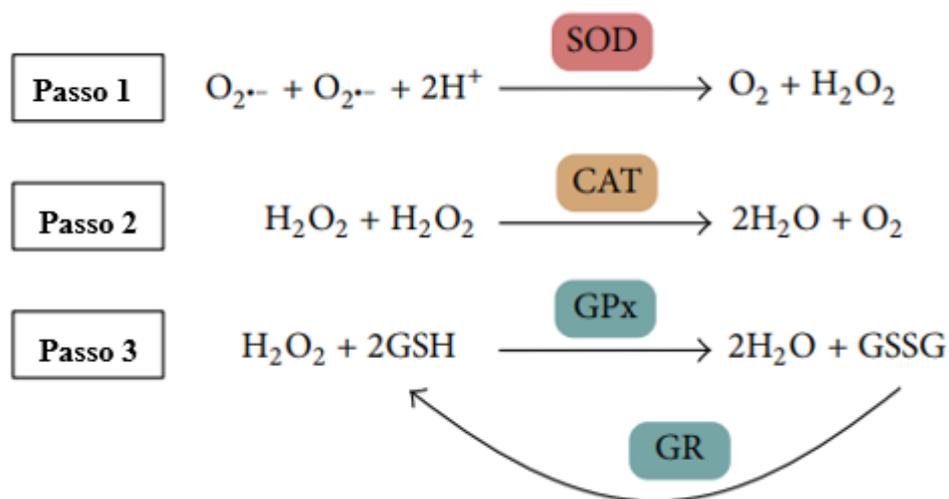
A vitamina C, também conhecida como ácido ascórbico, é comumente encontrado em nosso organismo na forma de ascorbato. Sendo muito solúvel em água, está localizado nos compartimentos aquosos dos tecidos (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). É um antioxidante altamente eficaz, devido à sua capacidade de doar prontamente elétrons, protegendo assim biomoléculas importantes de danos produzidos por oxidantes durante o metabolismo celular normal e através da exposição a toxinas e poluentes (CARR; MAGGINI, 2017). Tendo em vista que o ascorbato converte as espécies oxidantes em inofensivas e que os seus derivados são pouco reativos, esse age como antioxidante *in vivo* (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Antioxidantes enzimáticos apresentam um metal de transição em seu núcleo, capaz de assumir diferentes valências à medida que transferem elétrons durante o processo de desintoxicação (BURTON; JAUNIAUX, 2011). As principais enzimas antioxidantes diretamente envolvidas na neutralização de espécies reativas, e conseqüentemente prevenção de danos oxidativos nas células são: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), GPx e glutathione redutase (GR) (MELO et al., 2011; PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008).

A SOD (EC 1.15.1.1) é a primeira enzima de desintoxicação, o antioxidante mais poderoso na célula, e pode ser rapidamente induzida em certas condições geradas pela exposição ao estresse oxidativo. Deste modo, age fazendo parte do sistema de primeira linha de

defesa contra EROs, e tem como função catalisar a dismutação de duas moléculas do radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), potencialmente prejudicial, a espécies menos reativas como o oxigênio molecular ( $O_2$ ) e  $H_2O_2$  (HE et al., 2017; IGHODARO; AKINLOYE, 2018; MATÉS; PÉREZ-GÓMEZ; DE CASTRO, 1999). Por sua vez, as enzimas CAT (EC 1.11.1.6) e GPx (EC 1.11.1.9) convertem  $H_2O_2$  em água (MELO et al., 2011), conforme demonstrado na figura abaixo.

Figura 10 – Mecanismo de ação do sistema antioxidante enzimático.



CAT: catase; SOD: superóxido dismutase; GPx: glutaciona peroxidase; GR: glutaciona redutase; GSH: glutaciona reduzida; GSSG: glutaciona oxidada.

Fonte: Adaptação de PENG et al. (2014).

A CAT uma hemeoproteína citoplasmática, contém quatro grupamentos de ferriprotoporfirina por molécula, localiza-se nos peroxissomas, e é encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado. Catalisa a redução do  $H_2O_2$  a água e oxigênio, sendo conhecida como a enzima mais eficiente, uma vez que nunca satura com  $H_2O_2$  (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; LIANG et al., 2016; MARITIM; SANDERS; WATKINS, 2003).

As GPxs pertencem a uma família de enzimas filogeneticamente relacionadas, e seus membros apresentam função anti-oxidante, atuando em diferentes componentes celulares, como citosol, mitocôndrias, núcleo, plasma e membrana (LIANG et al., 2016). Desempenham um papel proeminente e bem estabelecido na desintoxicação e sinalização de  $H_2O_2$  (BENHAR, 2018).

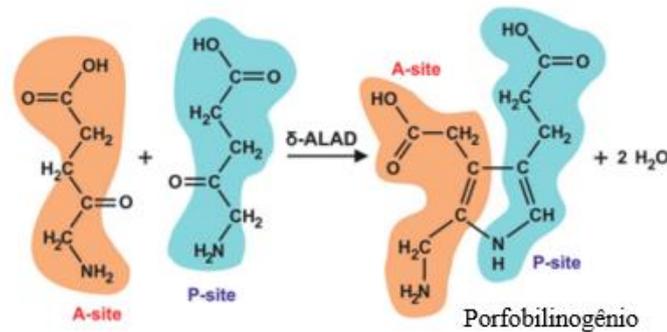
Estudos demonstraram que uma diminuição das atividades de enzimas antioxidantes, como CAT, SOD e GPx, acabam por facilitar a lesão celular, provavelmente pela diminuição da eliminação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, um dos principais EROs, que age como um agente indutor típico de dano no DNA (LIANG et al., 2016; POLACHINI et al., 2015).

### **1.1.3 Enzima Delta-Aminolevulinato-Desidratase**

A enzima delta-aminolevulinato-desidratase ( $\delta$ -ALA-D) (E.C. 4.2.1.24), também denominada como 5-aminolevulinato-desidratase ou porfobilinogênio sintase, foi isolada pela primeira vez de um fígado bovino por Gibson et al., em 1955 e, desde então já foi constatada a sua presença em várias fontes, onde suas características são estudadas. A enzima identificada nos mamíferos é composta por 8 subunidades idênticas, apresenta pH ótimo de 6,3 a 7,1 e requer zinco (Zn<sup>2+</sup>) para ação catalítica máxima (GIBBS; CHAUDHRY; JORDAN, 1985). É uma metaloproteína de Zn<sup>2+</sup> que precisa da redução de grupos –SH para sua atividade, é relativamente estável, solúvel e citoplasmática, características que possibilitam a quantificação de sua atividade (JAFFE et al., 1995; PANIZ et al., 2007).

Apresenta papel essencial para todos os organismos aeróbicos, participando da formação do porfobilinogênio (PBG), onde catalisa a condensação assimétrica e ciclização de duas moléculas de 5-aminolevulinato (ALA) (Figura 11). O PBG é o precursor monopirrólico das moléculas tetrapirrólicas, como o grupamento heme e a clorofila. Esses compostos são relevantes pois participam dos grupos prostéticos de proteínas, como a hemoglobina, mioglobina, citocromos, catalase e peroxidase (DJORDJEVIĆ, 1985; SOUZA et al., 2007).

Figura 11- Formação do porfobilinogênio pela enzima  $\delta$ -ALA-D.



Fonte: Adaptação de ROCHA et al. (2012).

Esta enzima possui também alta sensibilidade ao oxigênio, que está associada a resíduos de cisteína fortemente reativos, sendo estes necessários para sua estabilidade e atividade (GIBBS; CHAUDHRY; JORDAN, 1985). A  $\delta$ -ALA-D responde assim, a situações relacionadas com estresse oxidativo, e sua inibição pode levar a um acúmulo de ALA no sangue, o qual tem se mostrado um indutor de eventos pró-oxidantes, podendo acabar por intensificar o estresse oxidativo, pela superprodução de espécies reativas ou pela liberação de ferro de proteínas como a ferritina. Essa inibição pode ocorrer, por exemplo, pela presença de metais pesados, como mercúrio, chumbo e cádmio, onde ocorre enolização e oxidação, produzindo  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\bullet-}$  e radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), e estes, conseqüentemente, podendo causar danos no DNA, peroxidação lipídica e depleção do sistema de defesa antioxidante celular. A redução da atividade da enzima, pode também ser um fator adicional relacionado a mecanismos que promovem anemia, pela sua participação na biossíntese do heme (DE LUCCA et al., 2016 a; GONÇALVES et al., 2005; VALENTINI et al., 2007; ZANINI et al., 2014).

A inibição da enzima pode ser recuperada *in vitro* pela adição de  $Zn^{+2}$ , tióis ou agentes redutores, como o ditioneitol (DTT), avaliando o envolvimento dos grupos  $-SH$  (BAIERLE et al., 2014; FERNÁNDEZ-CUARTERO et al., 1999; VALENTINI et al., 2007).

A diminuição da atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D já foi reportada em algumas patologias, incluindo o câncer cervical em mulheres, câncer de pulmão, insuficiência renal crônica (pacientes de hemodiálise), DM, pacientes transplantados de medula óssea e pré-eclâmpsia, mostrando assim sua importância em conjunto com os demais parâmetros como um marcador de estresse oxidativo e comprometimento de processos metabólicos (BONFANTI et al., 2011; BONFANTI et al., 2012; DA SILVA et al., 2007; DE LUCCA et al., 2016 b; GONÇALVES et al., 2005; GONÇALVES et al., 2009; ZANINI et al., 2014).

### 1.1.4 Gestação, Diabetes e Estresse Oxidativo

A gestação é um período onde o metabolismo oxidativo encontra-se sabidamente elevado, devido à grande demanda de oxigênio requisitada pela mãe, pelo feto e pela placenta, rica em mitocôndrias, fazendo com que ocorra uma maior produção de EROs. No entanto, em gestações normais, existe um equilíbrio oxidativo fisiológico (HASTIE; LAPPAS, 2014; VIDAL et al., 2017).

O primeiro trimestre da gravidez humana é um período altamente sensível e suscetível ao estresse oxidativo. Portanto, durante o início da gravidez a placenta e o embrião se desenvolvem em um ambiente de baixo oxigênio, pensado para proteger o embrião de danos oxidativos. No final do primeiro trimestre, o fluxo sanguíneo útero-placentário é estabelecido e a concentração de oxigênio placentário aumenta rapidamente. Esta explosão oxidativa é um sinal importante para certos processos de desenvolvimento placentário e fetal. Assim, ambos, hipóxia no início e subsequente *burst* oxidativo no final do primeiro trimestre são implicados como reguladores que dirigem a normal morfogênese e função placentária (GAUSTER et al., 2017).

A placenta é uma rica fonte de oxidantes e antioxidantes, e também é capaz de induzir agentes de limpeza enzimáticos e não enzimáticos contra radicais livres (LAPPAS et al., 2011). Fornece a interface da mãe e circulações fetais, proporciona nutrientes e sinais hormonais ao feto para controlar o seu metabolismo, pode desempenhar um papel crucial na sua proteção a partir de efeitos adversos do ambiente diabético materno, enquanto distúrbios na função placentária podem exacerbar esse estado. Portanto, o seu desenvolvimento apropriado é vital para o decorrer normal da gestação, apesar de tornar o nível de estresse oxidativo mais elevado (BIRI et al., 2006; DUAN et al., 2017).

O estresse oxidativo é resultado principalmente da superprodução de EROs, tendo um importante papel na fisiopatologia de muitas doenças, incluindo o diabetes e as complicações relacionadas a gestação (BURTON; JAUNIAUX, 2011; CHIKEZIE; OJIAKO; OGBUJI, 2015; PESCOSOLIDO; CAMPAGNA; BARBATO, 2014).

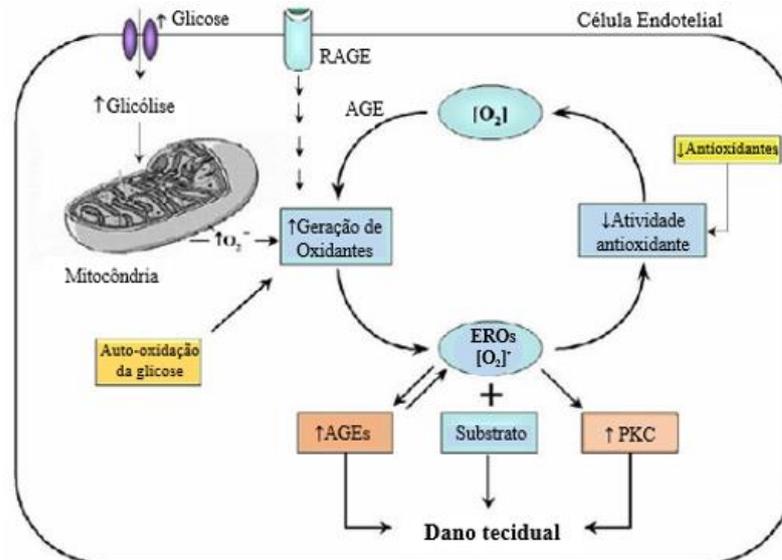
As EROs possuem um papel essencial na gravidez, porém em excesso, podem sobrepôr o sistema antioxidante e contribuir para o dano oxidativo, sendo um dos principais mecanismos das muitas complicações em indivíduos com DM. Estudos revelam que um alto nível de EROs é uma das razões fundamentais para lesão celular e morte (DUAN et al., 2017; RAMIRO-CORTIJO et al., 2016).

Em gestantes com patologias adicionais, como é o caso do DM, são encontrados vários marcadores de estresse oxidativo elevados e a capacidade do sistema antioxidante diminuída (ARRIBAS et al., 2016). Esse estado oxidante pode influenciar o desenvolvimento precoce do embrião alterando os principais fatores de transcrição e, conseqüentemente, modificando a expressão gênica (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005). Níveis aumentados de mediadores inflamatórios e biomarcadores de estresse oxidativo, podem induzir resistência materna à insulina, danos no DNA e aberrações cromossômicas (KARAMALI et al., 2017).

O efeito patogênico da alta glicose em conjunto com os ácidos graxos é mediado via aumento de EROs e ERNs. Estes radicais livres acabam por induzir diretamente dano tecidual. Tanto a resistência à insulina como sua secreção diminuída são características importantes da fisiopatologia do DM2 e do DMG (MAHMOUD et al., 2012).

A produção de radicais livres é gerada pela elevação da glicose de forma não controlada, que pode ocorrer por várias vias, como: glicólise aumentada, ativação intercelular de via do sorbitol (poliol), autooxidação da glicose, ativação da proteína quinase C (PKC) dependente de NAD(P)H oxidase, aumento do fluxo da via hexosamina, aumento intracelular da formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs), aumento da expressão do receptor para AGEs (RAGEs) e seus ligantes ativadores, e glicação de proteína não enzimática (Figura 12). Juntamente com a diminuição do potencial de defesa antioxidante (BADEHNOOSH et al., 2017; BIRI et al., 2006; CHIKEZIE; OJIAKO; OGBUJI, 2015).

Figura 12- Relação entre taxas de geração de oxidantes, atividade antioxidante e dano oxidativo no diabetes.



AGE: produtos finais de glicação avançada; PKC: proteína quinase C; RAGE: receptores dos produtos finais de glicação avançada.

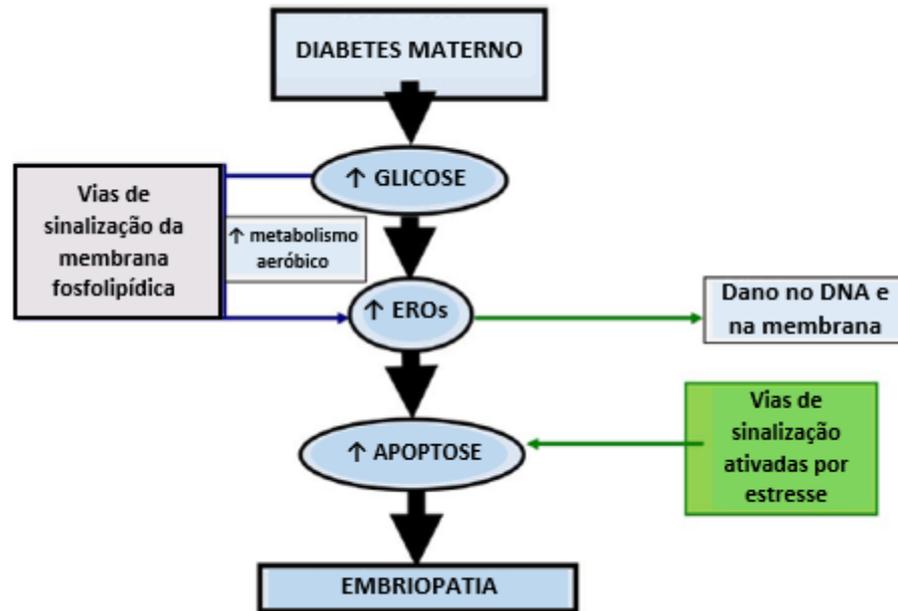
Fonte: Adaptação de CHIKEZIE; OJIAKO; OGBUJI (2015).

Esses caminhos contribuem diretamente a um aumento no estresse oxidativo, que são associados a uma série de danos no tecido durante estado diabético. De fato, o estresse oxidativo tem sido considerado como um dos principais mecanismos patogênicos na progressão do diabetes, e pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento de muitas complicações tardias relacionadas a patologia, incluindo doenças cardiovasculares, renais e do sistema nervoso (PALMA et al., 2014).

O controle da glicemia materna durante a gravidez em mulheres com diabetes é de extrema importância para reduzir as complicações perinatais para a mãe e para o bebê (ENDO et al., 2018). A hiperglicemia materna leva ao aumento do estresse oxidativo, via formação de EROs, produzidas, em parte, pelas mitocôndrias. Essas espécies causam danos na membrana, o que, por sua vez, ativam a morte celular programada através das proteínas pró-apoptóticas. A regulação positiva de proteínas pró-apoptóticas leva ao estresse endoplasmático e morte celular. A apoptose anormal causa malformações nos principais sistemas orgânicos do feto em desenvolvimento. À medida que a concentração materna de glicose aumenta, também aumenta a concentração de EROs dentro do embrião e do feto, com isso, a capacidade antioxidante natural das células fetais diminui, o que leva a pelo menos três eventos biomoleculares que

causam defeitos congênitos: alterações na membrana, disfunção mitocondrial, e iniciação de morte celular programada anormal (apoptose) (Figura 13) (ORNOY et al., 2015).

Figura 13- Hiperglicemia, estresse oxidativo e os danos gerados no feto.



Fonte: Adaptação de ORNOY et al. (2015).

## 1.2 PROPOSIÇÃO

### 1.2.1 Proposição Geral

Este trabalho teve como objetivo realizar uma análise comparativa dos parâmetros de perfil oxidativo, resposta antioxidante e atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D entre gestantes com DM tipo 2 pré-existente, gestacional e grupo controle.

### 1.2.2 Proposições Específicas

Nas amostras de gestantes com diabetes e grupo controle, objetiva-se:

-Avaliar a peroxidação lipídica, através dos níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), no plasma e em eritrócitos;

-Avaliar os protetores do estresse oxidativo: vitamina C no plasma, grupamentos tióis (-SH) proteicos no plasma e não-proteicos em eritrócitos, e atividade da enzima catalase;

-Avaliar a atividade da enzima sulfidrílica  $\delta$ -ALA-D, bem como seu índice de reativação, em sangue total;

-Avaliar os parâmetros hematológicos (hemograma completo), bioquímicos (glicemia e hemoglobina glicada) e antropométricos (índice de massa corporal);

-Avaliar as possíveis correlações entre as variáveis, a partir dos resultados obtidos.

### 1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos que fazem parte dessa dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito, o qual se encontra nessa dissertação. O manuscrito foi submetido para a avaliação da Revista *Primary Care Diabetes*. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontrando-se no próprio manuscrito.

**2 MANUSCRITO – Assessment of clinical characteristics, oxidative stress markers, and  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase enzyme activity among pregnant women with pre-gestational type 2 and gestational diabetes mellitus.**

Manuscrito submetido para publicação na Revista *Primary Care Diabetes*

Hellen Lopes de Paula, Fabiane Rodrigues, Leidiane de Lucca, Silmara Ana Vendrame,  
Walter Santos Neme, Thissiane de Lima Gonçalves.

**Assessment of clinical characteristics, oxidative stress markers, and  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase enzyme activity among pregnant women with pre-gestational type 2 and gestational diabetes *mellitus***

Hellen Lopes de Paula<sup>a</sup>, Fabiane Rodrigues<sup>a</sup>, Leidiane de Lucca<sup>a</sup>, Silmara Ana Vendrame<sup>a</sup>, Walter Santos Neme<sup>b</sup>, Thissiane de Lima Gonçalves<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Clinical and Toxicology Analysis, Center of Healthy Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>b</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

Hellen Lopes de Paula: hellen\_lopes89@hotmail.com

Fabiane Rodrigues: fabianeufsm@gmail.com

Leidiane de Lucca: leidi\_lucca@hotmail.com

Silmara Ana Vendrame: silmaravendrame@yahoo.com.br

Walter Santos Neme: wsneme@yahoo.com.br

Thissiane de Lima Gonçalves: thissianegoncalves@yahoo.com.br

\*Corresponding author:

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

**Assessment of clinical characteristics, oxidative stress markers, and  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase enzyme activity among pregnant women with pre-gestational type 2 and gestational diabetes *mellitus***

**Abstract**

**Aims:** To perform a comparative analysis of the clinical characteristics, oxidative stress markers, and  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase ( $\delta$ -ALA-D) activity in pregnant women with pre-gestational type 2 and gestational diabetes mellitus (T2DM and GDM).

**Methods:** In total, 108 pregnant women were recruited in the third trimester of gestation and subdivided into control, T2DM, and GDM groups, which were evaluated for clinical characteristics, oxidative and antioxidative profiles, and  $\delta$ -ALA-D activity.

**Results:** Pregnant women with DM showed an increase in maternal age, pre-gestational and gestational body mass index, and blood pressure; those with T2DM had a greater number of previous fetal death. Levels of thiobarbituric acid-reactive substances were higher and levels of non-protein thiols and vitamin C were lower in the groups with DM compared with the control. The enzyme catalase was decreased in the T2DM group, while the levels of protein thiol groups were decreased in GDM.  $\delta$ -ALA-D activity was decreased in pregnant women with GDM and the enzyme reactivation index was higher in both groups with DM.

**Conclusions:** DM in the gestation, regardless of origin, generates increase in oxidative stress and decrease in antioxidant defences. The clinical characteristics of the groups with DM presented considerable differences.

**Keywords:**  $\delta$ -ALA-D. Gestational diabetes mellitus. Oxidative stress. Type 2 diabetes mellitus.

## 1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) consists of a systemic disorder characterized by consistently high glycemia and defects in the release and/or action of endogenous insulin [1]. It is considered the most frequent metabolic problem that affects women in the gestational period [2]. It may be present prior to conception, such as type 1 or type 2 DM (T2DM), the prevalence of which has increased in the last decades, or, it may develop during pregnancy, which is called gestational diabetes mellitus (GDM) and affects approximately 3–25% of pregnancies, varying according to the population, ethnicity, and diagnostic criteria used [1,3]. This complication, when present, may lead to long-term negative consequences for both the mother and fetus [4] and is associated with an increase in miscarriage rate, congenital abnormalities, and macrosomia, which are effects largely related to the hyperglycemic conditions to which the organism is exposed [5]. As the child ages, additional risks include the development of chronic diseases such as obesity, hypertension, and metabolic syndrome [6].

Oxidative stress is described when oxidizing substances, especially reactive oxygen species (ROS), overlap the neutralizing capacity of antioxidants in the body. ROS can be generated by conditions of hyperglycemia and react with biomolecules, such as membrane lipids, proteins, and DNA, generating irreversible damage through their ability to induce biochemical changes [7,8].

Physiological gestation is a period in which oxidative stress is elevated by an increased demand for oxygen by the placenta, which is rich in mitochondria, as well as by a decrease in antioxidant power [9]. Complementing this physiological structure, in the presence of a hyperglycemic environment, advanced glycation end products are generated, which are involved in the production of free radicals, causing the oxidation state to be exacerbated [3,10]. Thus, pregnancies complicated by this factor have been analyzed for a better clarification of its pathogenesis [3].

Research has revealed increased free radical production and depletion of antioxidant levels in pregnant women with DM, leading to an increased risk of complications in pregnancy [4,11,12]. Thus, markers of oxidative stress are one of the main targets of research related to DM, since they are a viable option for the prognosis and management of this disorder [7,13].

$\delta$ -Aminolevulinate dehydratase ( $\delta$ -ALA-D, E.C. 4.2.1.24), an essential enzyme in aerobic organisms, participates in the formation of the heme group of hemoglobin and other tetrapyrrol molecules. This enzyme has sulfhydryl groups that are sensitive to oxidizing agents and may

therefore be reduced in situations of oxidative stress [10,13]. Decreased activity of this enzyme due to oxidation affects the biosynthesis of various compounds and may also lead to the accumulation of its substrate 5-aminolevulinic acid, which contributes to the production of ROS [14]. In the DM scenario, this enzymatic analysis may provide additional information to determine if glucose metabolism dysregulation is associated with complications secondary to hyperglycemia [10].

The aim of the present study was to perform a comparative analysis of clinical and gestational characteristics, oxidative and antioxidative markers, and  $\delta$ -ALA-D enzyme activity and its correlations, between pregnant women with pre-gestational T2DM and GDM.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Study population**

The study population comprised 108 pregnant women, which were subdivided into three experimental groups. The control group (C), with 30 healthy pregnant women, underwent prenatal follow-up at the Basic Health Unit Wilson Paulo Noal of the municipality of Santa Maria, Brazil. Pregnant women with pre-gestational T2DM (30 participants) and pregnant women who developed GDM (48 participants) were from the outpatient clinic that provides assistance to High Risk Pregnant Women at the Hospital Universitário de Santa Maria (AGAR-HUSM). Pregnant women from HUSM were distributed in both groups according to the parameters established in the Clinical Protocol - Diabetes Mellitus and Gestation [15]. All samples were collected in the third trimester of gestation. Pregnant women with multiple pregnancy, those with chronic conditions, smokers, alcoholics, asthmatics, hypertension, infectious diseases, thyroid diseases, neoplasms, autoimmune diseases, or any other pathology other than pre-gestational T2DM and GDM, including other types of diabetes, were excluded from the study. The patient's data were obtained by consulting the medical record. Pregnant women with T2DM controlled diabetes for insulin administration and had no major complications caused by the disease, whereas those in the DMG group controlled only with diet. This work was approved by the Ethics Committee in Research with Human Subjects (CEP) of the Federal University of Santa Maria (UFSM; n° 33665314.4.0000.5346) and is in accordance with the Declaration of Helsinki. All the participants officiated their agreement to collaborate with the research by signing the Term of Free and Informed Consent.

## **2.2. Collection of samples**

Blood samples were collected after 8 h of fasting per venipuncture using vacuum tubes containing anticoagulants: EDTA (used for blood counts and glycated hemoglobin), sodium fluoride (determination of plasma glucose), and heparin (oxidative stress parameters). From heparin containing whole blood was obtained by centrifugation plasma, and erythrocytes after washing with 0.9% sodium chloride. All determinations were made shortly after obtaining the material.

## **2.3. Analyses**

### **2.3.1. Clinical, biochemical, and hematological parameters**

Body mass index (BMI) was obtained by calculating the weight divided by the height squared ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Blood pressure was verified with a calibrated aneroid sphygmomanometer (mmHg). Biochemical parameters, such as glucose, were determined using the hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase method (Glucose-Dimension® RxL Max®, Siemens, USA) and glycated hemoglobin A1c (HbA1c), measured in whole blood, was evaluated only in pregnant women with DM, using high performance liquid chromatography cation exchange with a D-10 analyzer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Hematological analysis (erythrocytes, hemoglobin, haematocrit, and platelets) was performed using the Sysmex® XE-5000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan).

### **2.3.2. Pro-oxidant substances**

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were determined in plasma and erythrocytes, thus evaluating lipid peroxidation, as previously described by Lapenna et al. (2001) [16]. Phosphoric acid (1%) and 0.6% thiobarbituric acid (TBA) were used for plasma, and 20% trichloroacetic acid (TCA) and 1.2% TBA for erythrocytes, with malondialdehyde (MDA) as a standard. The product of the TBA reaction with MDA was measured spectrophotometrically at 532 nm, and expressed in nmol MDA/mL plasma and nmol MDA/mL erythrocytes.

### **2.3.3. Antioxidants**

Quantification of plasma of protein thiol groups (P-SH) and non-protein thiol groups (NP-SH) in erythrocytes was verified as described by Boyne and Ellman (1972) [17] and modified by Jacques-Silva et al. (2001) [18]. The reduction of 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) acid was performed using phosphate buffer. A curve of different concentrations of glutathione was

used as a standard. The reaction product was read at 412 nm, and the results were expressed as nmol P-SH/mL plasma and nmol NP-SH/mL erythrocytes.

Vitamin C dosing in plasma was performed as previously described by Galley et al. (1996) [19], with modifications by Jacques-Silva et al. (2001) [18]. Ascorbic acid was used as a standard. This colorimetric reaction generates an orange product, which was measured at 520 nm and expressed as  $\mu\text{g vit C/mL plasma}$ .

#### **2.3.4. Enzymatic activity**

The verification of catalase activity was determined in erythrocytes, according to Aebi (1984) [20]. Enzyme activity was measured by the rate of decomposition of hydrogen peroxide, which was verified in a spectrophotometer at 240 nm and expressed as K/mg Hb.

$\delta$ -ALAD activity was determined using heparinized whole blood as previously described by Berlin and Schaller (1974) [21]. The final reaction product is the porphobilinogen rate formed at 1 h at 37°C, which is read at 555 nm and expressed as U/L (nmol PBG/h/mgHb). To analyze if the changes in enzyme activity were caused by oxidation of the thiol groups, the reactivation index was determined by concomitant testing of tubes containing the same incubation medium, except for the addition of 2 mM dithiothreitol (DTT), a reducing agent. The enzyme reactivation index was estimated using the equation:  $A-B/A*100$ , where A =  $\delta$ -ALA-D absorbance with DTT and B =  $\delta$ -ALA-D absorbance without DTT.

#### **2.4. Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software version 6.01 (Software GraphPad, San Diego, CA, USA). First, the Shapiro–Wilk normality test was applied for evaluation of the sample distribution. When three groups were analyzed, one-way analysis of variance (ANOVA) was used for normally distributed data, followed by Tukey’s test for comparisons among groups, the results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD), and Kruskal–Wallis test was used when the data were non-parametric and the results are presented as median (interquartile range). However, when only two groups were evaluated, the Student’s t-test was used for normally distributed data, and the results are expressed as mean  $\pm$  SD, whereas the Mann–Whitney test was used for non-parametric data and the results are presented as median (interquartile range). The analysis of gestational parameters was performed using the Chi-square test. Correlations among all participants were assessed using the Spearman correlation coefficient. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

### 3. Results

The clinical, demographic and laboratory parameters of the 108 pregnant women evaluated are presented in **Table 1**. These data reveal significant differences between the pregnant women with DM and the control group in nearly all parameters. In addition, pre-gestational BMI showed higher between groups of pregnant women with DM. Fasting plasma glucose levels were significantly higher in pregnant women with DM, including a significant difference between T2DM and GDM. HbA1c was only measured in the groups of pregnant women with the pathology, and revealed that the pregnant women with pre-gestational T2DM presented significantly greater levels compared with the GDM group. Finally, platelet count was higher in the presence of DM.

**Table 2** shows a comparison of the two groups of pregnant women with DM in relation to the gestational characteristics and their newborns. The number of pregnant women who presented with fetal death in previous pregnancies was higher in women with pre-existing T2DM.

The levels of oxidative stress markers are presented in **Table 3**. The erythrocyte and plasma TBARS levels were considerably higher in pregnant women with DM compared to the control group. The levels of NP-SH and vitamin C were significantly lower in the groups with DM, while catalase activity and P-SH levels were significantly decreased only in the groups with T2DM and GDM, respectively.

**Figure 1A** represents  $\delta$ -ALA-D activity in the presence and absence of the reducing agent DTT in the different groups. The difference was considerable in relation to the control group, only in the pregnant women with GDM. However, the  $\delta$ -ALA-D reactivation index was significant in pregnant women with DM compared with the control group (**Fig. 1B**).

The correlations between  $\delta$ -ALA-D activity and oxidative stress parameters are shown in **Table 4**. The results show a weak negative correlation between  $\delta$ -ALA-D activity and plasma and erythrocytes TBARS, while a weak positive correlation was observed for NP-SH.

### 4. Discussion

The present study emphasizes the differences between pregnancies where pre-gestational T2DM and GDM are involved, in addition to emphasizing the participation of oxidative stress

and reduction of the antioxidant defense system, among the factors involved in the pathogenesis.

According to the clinical and demographic data (**Table 1**) evaluated in the present study, different patient profiles in the studied groups were observed. In particular, significant increases in maternal age, pre-gestational and gestational BMI, and systolic and diastolic blood pressure were revealed in pregnant women with DM compared with the control group. Maternal age and gestational BMI were higher in pregnant women with pre-gestational T2DM and GDM, which is consistent with the results of Toescu et al. [22]. Overall, the risk factors for the development of DM are similar for their subtypes and include advanced maternal age and obesity [23], and thus this pathology develops more easily in these individuals.

Pre-gestational BMI is recognized as a factor influencing fetal growth [24]. In this study, the group of pregnant women with pre-existing T2DM presented the highest BMI values, which was related to the number of newborns that presented with macrosomia (10%) (**Table 2**).

Analysis of the gestational characteristics of the pregnant women (**Table 2**) revealed that 40% with pre-existing T2DM had at least one fetal death episode, compared to 10.41% of pregnant women with GDM. Jovanović et al. [25] also found a higher rate of miscarriages in pregnant women with T2DM, associating this disorder with a significant increase in the risk of adverse delivery outcomes and all types of complications, including the number of serious neonatal complications. One of the justifications outlined by Matjila et al. [26] regarding the impact on recurrent gestational loss may be the link with high BMI, which appears to be related to T2DM.

Possible explanations for the increased blood pressure may be the effects of hyperinsulinemia, weight gain, and renal sodium retention [23], however, in both groups the blood pressure values do not exceed reference limits to be classified as hypertensive.

In pregnant women with DM, fasting plasma glucose levels were higher than the normoglycemic control. Both glucose and HbA1c levels, measured only in pregnant women with the disorder, were higher in pregnant women with pre-gestational T2DM. These values are similar to those presented by Sugiyama et al. [27]. This data may indicate that the group with pre-gestational T2DM has a higher degree of carbohydrate intolerance compared to the GDM group [27].

Higher platelet count results were obtained for the pregnant women with DM, consistent with the results of Sahbaz et al. [28] for GDM. Platelets are known to play an important role in

blood clotting and homeostasis, although additional functions have been revealed more recently. The association of platelet counts and indexes with inflammatory diseases has been investigated as a possible inflammatory marker, and inflammation is implicated in the pathogenesis of DM [28].

Lipid peroxidation (**Table 3**) is one of the most relevant consequences of oxidative stress and cause of oxidative damage [29]. MDA is formed by the peroxidation of polyunsaturated fatty acids, is associated with hyperglycemia and insulin dysfunction [30], and can be used as a measure of damage and modifications of the structure and function of cell membranes [31]. The formation of MDA was verified in this study using the TBARS technique, and an increase in lipid damage was observed in pregnant women with DM due to elevated levels in both plasma and erythrocytes. Arribas et al. [32], as well as Shang et al. [31], also revealed an increase in MDA in women with GDM, suggesting a relationship between lipid peroxidation and changes in prostaglandin synthesis, which could also be related to fetal malformations attributed to DM [32]. This study also demonstrated weak negative correlations between plasma and erythrocyte TBARS values and  $\delta$ -ALA-D activity, suggesting a high production of ROS [14] in pregnant women with DM.

It is also relevant to note that there has been a decrease in the levels of thiol groups, which are molecules that contain a sulfhydryl functional group attached to a carbon atom and have an important action against free radicals [14]. This result is consistent with that of Rajdl et al. [33]. In erythrocytes, there was a significant difference in both groups compared with the control, already in the plasma, it was only relevant for the GDM group in relation to the control. A weak positive correlation was found between  $\delta$ -ALA-D activity and NP-SH levels, similar to that found by Rodrigues et al. [34], which suggests that these groups are easily oxidized in conditions of oxidative stress.

Vitamin C plays an important role in non-enzymatic antioxidant defense [35]. In this study, vitamin C levels were significantly decreased in the groups of pregnant women with DM, consistent with the results of Shang et al. [31]. Because it has an important role in protecting thiol groups, diminished levels of vitamin C may decrease its antioxidant activity [36].

Catalase is an important player in the enzymatic antioxidant defense system, which participates in the detoxification of hydrogen peroxide and performs important functions in the adaptation of cells to pathological conditions [36]. In this study, catalase activity was reduced in pregnant women with DM, but this decrease was only significant in the group with T2DM. These data are consistent with those of López-Tinoco et al. [37].

An overall view of the antioxidant parameters measured reveals a decrease in the antioxidant defense, which may have occurred due to inactivation caused by excess free radicals [33,38].

We also observed a decrease in  $\delta$ -ALA-D activity in pregnant women with GDM, both in the presence and absence of DTT, compared with the other groups (**Fig. 1A**), which is consistent with the results of Rodrigues et al. [34]. Pregnant women with T2DM exhibited similar levels of  $\delta$ -ALA-D activity as the control group. This can be explained by the fact that pregnant women with pre-existing T2DM use insulin. Palma et al. [38] showed that the use of insulin prevented the reduction in  $\delta$ -ALA-D activity in rats with DM and its decrease occurred when it was not used.

In the enzyme reactivation index assay (**Fig. 1B**), both groups of pregnant women presented significant results. This data has been used to evaluate the involvement of thiol groups in the inhibition of  $\delta$ -ALA-D activity. As the results were relevant, the possibility of compromising these clusters in the restoration of the enzyme was shown when DTT was added [14].

In general, different profiles were observed in the pregnant women. One of the main data observed was an increase in BMI seen primarily in pregnant women with pre-existing T2DM, representing a greater risk factor for complications, such as hypertension, macrosomia and fetal death. Altogether, the evaluated parameters confirmed an increase in oxidative stress and revealed a decreased antioxidant response in DM, both in pre-existing T2DM and GDM, which could be an adaptive and protective response. Although both disorders are generated by carbohydrate intolerance, they are differentiated events and thus produce different effects on the body. Thus, determination of these parameters will be important for a better understanding of this pathology so frequent in the population.

### **Acknowledgments**

The authors thank the pregnant women who made this study possible. They also acknowledge the support of the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel, Scientific Initiation Program for the Hospital Universitário de Santa Maria, Permanent Health Education Center, High Pregnant Ambulatory Risk of the Hospital Universitário de Santa Maria and Federal University of Santa Maria.

### Conflict of interest

The authors state that they have no conflict of interest.

### References

- [1] Sociedade Brasileira de Diabetes. Guidelines of the Brazilian Diabetes Society 2017-2018, Clannad, São Paulo, 2017.
- [2] J. R. Araújo, E. Keating, F. Martel, Impact of gestational diabetes mellitus in the maternal-to-fetal transport of nutrients, *Curr Diab Rep*, 15(1)(2015).  
<https://doi.org/10.1007/s11892-014-0569-y>.
- [3] M. Witczak, J. Wilczyński, E. Gulczyńska et al, What is the impact of gestational diabetes mellitus on frequency of structural chromosome aberrations in pregnant women and their offspring?, *Mutat Res*, 818(2017)27-30. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2017.04.003>.
- [4] M. TOLJIC, A. Egic, J. Munjas et al, Increased oxidative stress and cytokines-block micronucleus cytome assay parameters in pregnant women with gestational diabetes mellitus and gestational arterial hypertension, *Reprod Toxicol*, 71(2017)55-62.  
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.04.002>.
- [5] K. Lambert, R. I. G. Holt, The use of insulin analogues in pregnancy, *Diabetes Obes Metab*, 15(10)(2013)888-900. <https://doi.org/10.1111/dom.12098>.
- [6] C. Villarroel, A. Salinas, P. López et al, Pregestational type 2 diabetes and gestational diabetes exhibit different sexual steroid profiles during pregnancy, *Gynecol Endocrinol*, 33(3)(2016)212-217. <https://doi.org/10.1080/09513590.2016.1248933>.
- [7] J. S. M. Cuffe, Z. C. Xu, A. V. Perkins, Biomarkers of oxidative stress in pregnancy complications, *Biomark Med*, 11(3)(2017)295-306. <https://doi.org/10.2217/bmm-2016-0250>.
- [8] D. Zanini, L. P. Pelinson, R. Schmatz et al,  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase activity in lung cancer patients and its relationship with oxidative stress, *Biomed Pharmacother*, 68(5)(2014)603-609. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2014.04.005>.
- [9] R. Hastie, M. Lappas, The effect of pre-existing maternal obesity and diabetes on placental mitochondrial content and electron transport chain activity, *Placenta*, 35(9)(2014)673-683. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.06.368>.
- [10] J. B. Souza, J. B. T. Rocha, C. W. Nogueira et al, Delta-aminolevulinate dehydratase ( $\delta$ -ALA-D) activity in diabetes and hypothyroidism, *Clin Biochem*, 40(5-6)(2007)321-325.  
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2006.11.016>.
- [11] K. A. S. Murthy, A. Bhandiwada, S. L. Chandan et al, Evaluation of oxidative stress and proinflammatory cytokines in gestational diabetes mellitus and their correlation with pregnancy outcome, *Indian J Endocrinol Metab*, 22(1)(2018)79-84.  
[https://doi.org/10.4103/ijem.IJEM\\_232\\_16](https://doi.org/10.4103/ijem.IJEM_232_16).

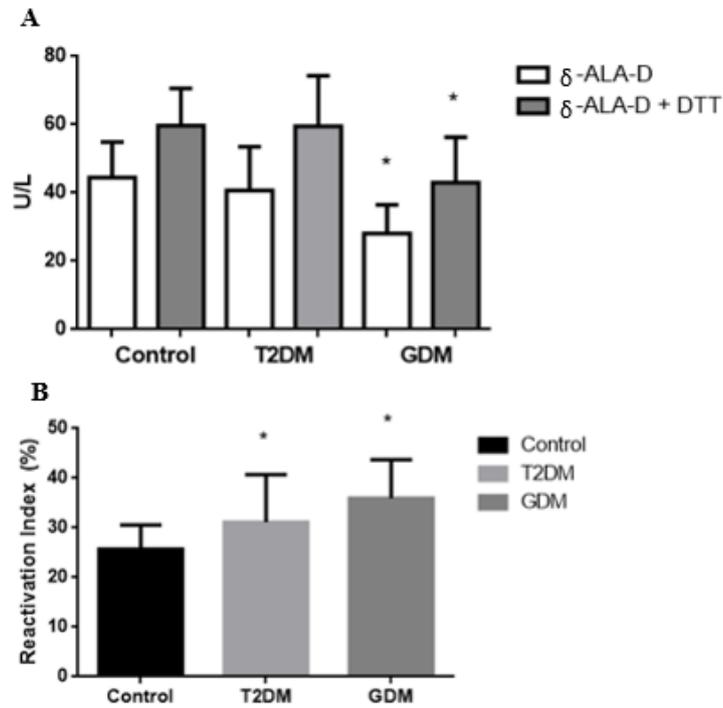
- [12] H. Rueangdetnarong, R. Sekararithi, T. Jaiwongkam et al, Comparisons of the oxidative stress biomarkers levels in gestational diabetes mellitus (GDM) and non-GDM among Thai-population: cohort study, *Endocr Connect*, 7(5)(2018)681-687. <https://doi.org/10.1530/EC-18-0093>.
- [13] G. Bonfanti, R. B. Ceolin, T. Valcorte et al,  $\delta$ -Aminolevulinate dehydratase activity in type 2 diabetic patients and its association with lipid profile and oxidative stress, *Clin Biochem*, 44(13)(2011)1105-1109. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.06.980>.
- [14] L. De Lucca, F. Rodrigues, L. B. Jantsch et al, Delta-aminolevulinate dehydratase activity and oxidative stress markers in preeclampsia, *Biomed Pharmacother*, 84(2016)224-229. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.09.033>.
- [15] Hospital Universitário de Santa Maria. Clinical Protocol - Diabetes Mellitus in Gestation, Code PC11 DMG, Santa Maria, 2015.
- [16] D. Lapenna, G. Ciofani, S. D. Pierdomenico et al, Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid peroxides in human plasma, *Free Radic Biol Med*, 31(3)(2001)331–335. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00584-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00584-6).
- [17] A. F. Boyne, G. L. Ellman, A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components, *Anal Biochem*, 46(2)(1972)639–653. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90335-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90335-1).
- [18] M. C. Jacques-Silva, C. W. Nogueira, L. C. Broch et al, Dyphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and acid ascorsbic in liver brain of mice, *Pharmacol Toxicol*, 88(3)(2001)119–125. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0773.2001.d01-92.x>.
- [19] 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(1)(1996)139-143. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02022-5](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02022-5).
- [20] H. Aebi, Catalase in vitro, *Methods Enzymol*, 105(1984)121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
- [21] 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(8)(1974)389–390. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4428852>.
- [22] V. Toescu, S. L. Nuttall, U. Martin et al, Changes in plasma lipids and markers of oxidative stress in normal pregnancy and pregnancies complicated by diabetes, *Clin Sci*, 106(1)(2004)93-98. <https://doi.org/10.1042/CS20030175>.
- [23] A. M. Dirar, J. Doupis, Gestacional diabetes from A to Z, *World J Diabetes*, 8(12)(2017)489-511. <https://doi.org/10.4239/wjd.v8.i12.489>.
- [24] S. Alberico, M. Montico, V. Barresi et al, The role of gestational diabetes, pre-pregnancy body mass index and gestational weight gain on the risk of newborn macrosomia: results from a prospective multicentre study, *BMC Pregnancy Childbirth*, 14(2014). <https://doi.org/10.1186/1471-2393-14-23>.

- [25] L. Jovanovič, Y. Liang, W. Weng et al, Trends in the incidence of diabetes, its clinical sequelae, and associated costs in pregnancy, *Diabetes Metab Res Rev*, 31(7)(2015)707-716. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2656>.
- [26] M. J. Matjila, A. Hoffman, Z. M. Van Der Spuy, Medical conditions associated with recurrent miscarriage—Is BMI the tip of the iceberg?, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 214(2017)91-96. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2017.05.003>.
- [27] T. Sugiyama, M. Saito, H. Nishigori et al, Comparison of pregnancy outcomes between women with gestational diabetes and overt diabetes first diagnosed in pregnancy: a retrospective multi-institutional study in Japan, *Diabetes Res Clin Pract*, 103(1)(2014)20-25. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2013.10.020>.
- [28] A. Sahbaz, H. Cicekler, O. Aynioglu et al, Comparison of the predictive value of plateletcrit with various other blood parameters in gestational diabetes development, *J Obstet Gynaecol*, 36(5)(2016)589-593. <https://doi.org/10.3109/01443615.2015.1110127>.
- [29] E. Niki, Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material, *Biochim Biophys Acta*, 1840(2)(2013)809-817. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.03.020>.
- [30] F. Mahmoud, H. Abul, A. Dashti, Trace elements and cell-mediated immunity in gestational and pre-gestational diabetes mellitus at third trimester of pregnancy, *Acta Med Acad*, 41(2)(2012)175-185. <https://doi.org/10.5644/ama2006-124.50>.
- [31] 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(2)(2015)404-410. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2015.05.010>.
- [32] L. Arribas, I. Almansa, M. Miranda et al, Serum malondialdehyde concentration and glutathione peroxidase activity in a longitudinal study of gestational diabetes, *PLoS One*, 11(5)(2016). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155353>.
- [33] D. Rajdl, J. Racek, A. Steinerová et al, Markers of oxidative stress in diabetic mothers and their infants during delivery, *Physiol Res*, 54(4)(2005)429-436. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15588143>.
- [34] F. Rodrigues, L. De Lucca, W. S. Neme, T. L. Gonçalves, Influence of gestational diabetes on the activity of  $\delta$ -aminolevulinic dehydratase and oxidative stress biomarkers, *Redox Rep*, 23(1)(2018)63-67. <https://doi.org/10.1080/13510002.2017.1402981>.
- [35] T. L. Gonçalves, F. Erthal, C. L. D. Corte et al, Involvement of oxidative stress in the pre-malignant and malignant states of cervical cancer in women, *Clin Biochem*, 38(12)(2005)1071-1075. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.09.008>.
- [36] C. R. N. Polachini, R. M. Spanevello, D. Zanini et al, Evaluation of delta-aminolevulinic dehydratase activity, oxidative stress biomarkers, and vitamin D levels in patients with multiple sclerosis, *Neurotox Res*, 29(2)(2016)230-242. <https://doi.org/10.1007/s12640-015-9584-2>.

[37] C. L. López-Tinoco, M. Roca, A. García-Valero et al, Oxidative stress and antioxidant status in patients with late-onset gestational diabetes mellitus, *Acta Diabetol*, 50(2)(2013)201-208. <https://doi.org/10.1007/s00592-011-0264-2>.

[38] H. E. Palma, P. Wolkmer, M. Gallio et al, Oxidative stress parameters in blood, liver, and kidney of diabetic rats treated with curcumin and/or insulin, *Mol Cell Biochem*, 386(1-2)(2014)199-210. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1858-5>.

Figure:



**Figure 1.** (A)  $\delta$ -ALA-D enzyme activity in the groups of pregnant women analyzed. The results are presented as median (interquartile range) and expressed as U/L. (B) Reactivation index of  $\delta$ -ALA-D in pregnant women with and without diabetes. The results are presented as median (interquartile range) and expressed as a percentage. Statistical analysis was performed using the Kruskal–Wallis test. \* $p < 0.05$  when compared to the control group.  $\delta$ -ALA-D,  $\delta$ -aminolevulinatase dehydratase; DTT, dithiothreitol; GDM, gestational diabetes mellitus; T2DM, pre-gestational type 2 diabetes mellitus.

**Tables:****Table 1.** Clinical, demographic and laboratory parameters of the pregnant women analyzed.

Parameter	C (n = 30)	T2DM (n = 30)	GDM (n = 48)
<i>Clinical and demographic characteristics</i>			
<b>Maternal age (years)</b>	23.0 (20.0–28.0)	33.0 (30.0–35.5) <sup>a</sup>	30.0 (26.0–35.0) <sup>a</sup>
<b>Pre-gestational BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	24.2 (21.8–27.6)	33.3 (29.4–37.9) <sup>a,b</sup>	30.79 (26.0–34.8) <sup>a</sup>
<b>Gestational BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	29.4 ± 4.3	35.3 ± 5.1 <sup>a</sup>	33.1 ± 5.3 <sup>a</sup>
<b>Systolic pressure (mmHg)</b>	110.0 (100.0–110.0)	112.5 (108.0–120.3) <sup>a</sup>	113.5 (110.0–120.0) <sup>a</sup>
<b>Diastolic pressure (mmHg)</b>	70.0 (60.0–70.0)	70.0 (62.7–80.0) <sup>a</sup>	70.0 (70.0–80.0) <sup>a</sup>
<i>Laboratory parameters</i>			
<b>Glucose fasting plasma (mg/dL)</b>	78.0 (69.0–81.0)	119.0 (98.5–154.5) <sup>a,b</sup>	95.0 (87.5–106.8) <sup>a</sup>
<b>HbA1c (%)</b>	-	6.4 ± 1.1 <sup>b</sup>	5.5 ± 0.5
<b>Erythrocytes (10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	4.0 ± 0.3	4.1 ± 0.3	4.1 ± 0.3
<b>Hematocrit (%)</b>	35.6 ± 2.6	36.1 ± 2.3	35.7 ± 2.6
<b>Hemoglobin (g/dL)</b>	11.6 (10.8–13.2)	12.0 (11.7–12.5)	11.8 (11.2–12.6)
<b>Platelets (×10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	161.5 ± 6.6	222.4 ± 38.1 <sup>a</sup>	225.1 ± 55.9 <sup>a</sup>

The parametric results were analyzed by ANOVA, followed by the Tukey's test and expressed as mean ± SD. Non-parametric values were determined by the Kruskal–Wallis test and represented as median (interquartile range). For analysis of HbA1c levels, the Student's t-test was used, and the data are expressed as mean ± SD. <sup>a</sup>p < 0.05 when compared to the control group of pregnant women. <sup>b</sup>p < 0.05 when compared to the group of pregnant women with GDM. BMI, body mass index; C, control group; GDM, gestational diabetes mellitus; HbA1c, glycated hemoglobina; T2DM, type 2 diabetes mellitus prior to gestation.

**Table 2.** Gestational characteristics of pregnant women with diabetes and their newborns.

Parameter	T2DM (n = 30)	GDM (n = 48)	p
<i>Pregnant women</i>			
Parity			0.3858
Primigesta (1st gestation)	16.7	25.0	
Multigesta (2 or more pregnancies)	83.3	75.0	
Suffered previous fetal death	40.0	10.4	0.0021*
Mode of delivery			0.4262
Vaginal	33.3	25.0	
Caesarean	66.7	75.0	
Gestational age at delivery (weeks)	39.0 (37.7–39.0)	39.0 (37.0–39.0)	
Complications related to blood pressure	40.0	20.8	0.0672
<i>Newborn</i>			
Gender			0.8842
Male	40.0	41.7	
Female	60.0	58.3	
Macrosomia (weight (> 4000 g))	10.0	4.2	0.3062

Non-parametric results were analyzed by the Mann–Whitney test and represented as median (interquartile range). Remaining data are expressed as a percentage (%). The p-value was obtained using the Chi-square test. \*p < 0.05 was considered statistically significant. GDM, gestational diabetes mellitus; T2DM, type 2 diabetes mellitus prior to gestation.

**Table 3.** Oxidative stress markers of the pregnant women analyzed.

Parameter	C (n = 30)	T2DM (n = 30)	GDM (n = 48)
TBARS erythrocytes (nmol/mL)	15.7 (10.4–18.5)	25.2 (20.4–32.2) <sup>a</sup>	25.2 (22.3–28.9) <sup>a</sup>
TBARS plasma (nmol/mL)	3.9 ± 1.6	5.2 ± 2.0 <sup>a</sup>	5.8 ± 2.0 <sup>a</sup>
NP-SH (nmol NP-SH/mL)	824.7 ± 152.4	705.0 ± 133.0 <sup>a</sup>	712.0 ± 120.7 <sup>a</sup>
P-SH (nmol P-SH/mL)	153.4 (127.2–170.9)	137.3 (114.5–155.8)	121.0 (104.4–145.7) <sup>a</sup>
Vitamin C (µg vit C/mL)	14.0 ± 5.3	10.5 ± 3.2 <sup>a</sup>	10.8 ± 2.9 <sup>a</sup>
Catalase (K/mg Hb)	50.9 ± 11.3	43.1 ± 8.5 <sup>a</sup>	45.1 ± 8.5

The parametric results were analyzed by ANOVA, followed by Tukey's test and expressed as mean ± SD, and non-parametric values were determined by the Kruskal–Wallis test and represented as median (interquartile range). <sup>a</sup>p < 0.05 compared to the control group. C, control group; GDM, gestational diabetes mellitus; NP-SH, non-protein thiol groups; P-SH, protein thiol groups; TBARS, substances reactive to barbituric acid; T2DM, type 2 diabetes mellitus prior to gestation.

**Table 4.** Correlations between δ-ALA-D activity and oxidative stress parameters.

Correlations	Spearman r	p
δ-ALA-D vs. TBARS, erythrocytes	-0.2339	0.0264*
δ-ALA-D vs. TBARS, plasma	-0.2574	0.0122*
δ-ALA-D vs. NP-SH	0.2642	0.0085*
δ-ALA-D vs. P-SH	0.1797	0.0865
δ-ALA-D vs. vitamin C	0.1535	0.1581
δ-ALA-D vs. catalase	-0.1032	0.3501

Correlation of the data performed using the Spearman correlation coefficient. \*p < 0.05 was considered statistically significant. δ-ALA-D, δ-aminolevulinate dehydratase; NP-SH, non-protein thiol groups; P-SH, protein thiol groups; TBARS, substances reactive to barbituric acid.

### 3 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados nessa dissertação, podemos inferir que as gestantes com DM, independente do período de desenvolvimento da patologia, possuem níveis de estresse oxidativo mais elevados e de antioxidantes diminuídos, em relação ao grupo de gestantes controle, as quais se apresentam com a glicemia dentro dos valores esperados, em mesmo período gestacional. Esses achados provavelmente devem estar relacionados ao ambiente hiperglicêmico em que o organismo está submetido.

Algumas diferenças entre os grupos de gestantes com DM foram observadas, como o maior IMC pré-gestacional e maior taxa de ocorrência de mortes fetais anteriores, nas gestantes com DM2 prévia a gestação. Além disso, foi constatado que a atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D se apresentou diminuída nas gestantes com DMG, enquanto nas com DM2 pré-existente, esta se assemelhou ao controle, possivelmente pela utilização da insulina que pode ter impedido a inibição da enzima.

Desta forma, este estudo contribuiu de forma válida para um maior esclarecimento da diferenciação entre as diferentes formas do DM que podem afetar o período gestacional.

## REFERÊNCIAS

- ABUJA, P. M.; ALBERTINI, R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. **Clin. Chim. Acta**, v. 306, n. 1-2, p. 1-17, 2001.
- AGARWAL, A; GUPTA, S; SHARMA, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v. 3, n.1, p. 28, 2005.
- AGARWAL, A. et al. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v. 10, n. 1, p. 49, 2012.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and diagnosis of diabetes. **Diabetes Care**. v. 41, s. 1, p. S13-S27, jan. 2018.
- ARAGÃO, J. Considerações sobre a avaliação do bem-estar fetal. **Cadernos UniFOA**, v. 4, n. 8, p. 54-57, 2008.
- ARAÚJO, J. R.; KEATING, E.; MARTEL, F. Impact of gestational diabetes mellitus in the maternal-to-fetal transport of nutrients. **Curr. Diab. Rep.**, v. 15, n. 1, p. 569-578, 2015.
- ARRIBAS, L. et al. Serum malondialdehyde concentration and glutathione peroxidase activity in a longitudinal study of gestational diabetes. **PloS One**, v. 11, n. 5, 2016.
- AUGUSTO, O. **Radicais livres: bons, maus e naturais**. São Paulo: Oficina de Textos, 2006. 114p.
- BADEHNOOSH, B. et al. The effects of probiotic supplementation on biomarkers of inflammation, oxidative stress and pregnancy outcomes in gestational diabetes. **J. Matern. Fetal Neonatal Med.**, v. 31, n. 9, p. 1128-1136, 2018.
- BAIERLE, M. et al. Are delta-aminolevulinate dehydratase inhibition and metal concentrations additional factors for the age-related cognitive decline?. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 11, n. 10, p. 10851-10867, 2014.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. D. L. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BENHAR, M. Roles of mammalian glutathione peroxidase and thioredoxin reductase enzymes in the cellular response to nitrosative stress. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 127, p. 160-164, 2018.
- 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, 2006.
- BONFANTI, G. et al.  $\delta$ -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, 2011.

BONFANTI, G. et al. Hypertension strengthens  $\delta$ -ALA-D activity inhibition and increases its reactivation index in type 2 diabetic patients. **J. Diabetes Complications**, v. 26, n. 4, p. 323-327, 2012.

BOYNE, A.F.; ELLMAN, G.L. A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. **Anal. Biochem.**, v. 46, p. 639–653, 1972.

BRASIL. Ministério da Saúde. Organização Pan-Americana da Saúde. **Avaliação do Plano de Reorganização da Atenção à Hipertensão Arterial e ao Diabetes Mellitus no Brasil** / Ministério da Saúde, Organização Pan-Americana da Saúde – Brasília: Ministério da Saúde, 2004. 64p.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. **Gestação de alto risco: manual técnico**/ Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. – 5. ed. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. 304p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. **Cadernos de Atenção Básica. Atenção ao pré-natal de baixo risco**. Brasília, n. 32, p. 175-178, 2012.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. **Cadernos de Atenção Básica. Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica Diabetes Mellitus**. Brasília, n. 36, 2013. 160 p.

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.**, v. 25, p. 287- 299, 2011.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food Chem. Toxicol.**, v. 51, p. 15-25, 2013.

CARR, A. C.; MAGGINI, S. Vitamin C and immune function. **Nutrients**, v. 9, n. 11, p. 1211-1236, 2017.

CHIKEZIE, P. C.; OJIAKO, O. A.; OGBUJI, A. C. Oxidative stress in diabetes mellitus. **Int. J. Biol. Chem.**, v. 9, n. 3, p. 92-109, 2015.

CLORIDRATO DE METFORMINA. Medley Indústria Farmacêutica Ltda. Campinas/SP, [2014]. Bula de remédio.

COTINGUIBA, G. G. et al. Método de avaliação da defesa antioxidante: uma revisão de literatura. **UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde**, v. 15, n. 3, p. 231-237, 2013.

CUFFE, J. S. M.; XU, Z. C.; PERKINS, A. V. Biomarkers of oxidative stress in pregnancy complications. **Biomark. Med.**, v. 11, n. 3, p. 295-306, 2017.

DA SILVA, A. C. et al. Oxidative stress and  $\delta$ -ALA-D activity in chronic renal failure patients. **Biomed. Pharmacother.**, v. 61, n. 2-3, p. 180-185, 2007.

DE LUCCA, L. et al. Oxidative profile and  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity in healthy pregnant women with iron supplementation. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 13, n.5, p. 463, 2016a.

DE LUCCA, L. et al. Delta-aminolevulinic acid dehydratase activity and oxidative stress markers in preeclampsia. **Biomed. Pharmacother.**, v. 84, p. 224-229, 2016b.

DJORDJEVIĆ, V.  $\delta$ -Aminolevulinic acid dehydratase activity in erythrocytes of diabetic patients. **Arch. Int. Physiol. Biochim.**, v. 93, n. 4, p. 285-290, 1985.

DOTAN, Y.; LICHTENBERG, D.; PINCHUK, I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. **Prog. Lipid Res.**, v. 43, n.3, p. 200-227, 2004.

DUAN, Y. et al. Prepregnancy maternal diabetes combined with obesity impairs placental mitochondrial function involving Nrf2/ARE pathway and detrimentally alters metabolism of offspring. **Obes. Res. Clin. Pract.**, v. 12, n. 1, s.1, p. 90-100, 2017.

DUHIG, K.; CHAPPELL, L. C.; SHENNAN, A. H. Oxidative stress in pregnancy and reproduction. **Obstet. Med.**, v. 9, n. 3, p. 113-116, 2016.

ENDO, S. et al. Association of maternal factors with perinatal complications in pregnancies complicated with diabetes: a single-center retrospective analysis. **J. Clin. Med.**, v.7, n. 1, p. 5, 2018.

FERNÁNDEZ-CUARTERO, B. et al. Delta aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in human and experimental diabetes mellitus. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 31, n. 3-4, p. 479-488, 1999.

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

FRIJHOFF, J. et al. Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 23, n. 14, p. 1144-1170, 2015.

GAUSTER, M. et al. Maternal type 1 diabetes activates stress response in early placenta. **Placenta**, v. 50, p. 110-116, 2017.

GELALETI, R. B. et al. Oxidative DNA damage in diabetic and mild gestational hyperglycemic pregnant women. **Diabetol. Metab. Syndr.**, v. 7, n. 1, p. 1, 2015.

GIBBS, P. N. B.; CHAUDHRY, A. G.; JORDAN, P. M. Purification and properties of 5-aminolevulinic acid dehydratase from human erythrocytes. **Biochem. J.**, v. 230, n. 1, p. 25-34, 1985.

GONÇALVES, T. L. et al. Involvement of oxidative stress in the pre-malignant and malignant states of cervical cancer in women. **Clin. Biochem.**, v. 38, n. 12, p. 1071-1075, 2005.

GONÇALVES, T. L. et al. Oxidative stress and  $\delta$ -ALA-D activity in different conditioning regimens in allogeneic bone marrow transplantation patients. **Clin. Biochem.**, v. 42, n. 7-8, p. 602-610, 2009.

- GORI, S. S. et al. Profiling thiol metabolites and quantification of cellular glutathione using FT-ICR-MS spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 406, n. 18, p. 4371-4379, 2014.
- HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 57, s. 5, p. 715S-725S, 1993.
- HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 35, p. 1147-1150, 2007.
- HALLIWELL, B. The antioxidant paradox: less paradoxical now?. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 75, n. 3, p. 637-644, 2012.
- HASTIE, R.; LAPPAS, M. The effect of pre-existing maternal obesity and diabetes on placental mitochondrial content and electron transport chain activity. **Placenta**, v. 35, n. 9, p. 673-683, 2014.
- HE, L. et al. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. **Cell Physiol. Biochem.**, v. 44, n. 2, p. 532-553, 2017.
- HESSLER, K. L.; DUNEMN, K. Laboratory diagnosis of overt type 2 diabetes in the first trimester of pregnancy. **J. Am. Assoc. Nurse Pract.**, v. 29, n. 9, p. 521-526, 2017.
- HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA. **Protocolo Clínico – Diabetes Mellitus na Gestação**. Código PC11 DMG. Santa Maria, RS, jun. 2015. 18 p.
- HU, M. L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. **Methods Enzymol.**, v. 233, p. 380-385, 1994.
- IGHODARO, O. M; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria J. Med.**, v. 54, n. 4, p. 287-293, 2018.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**. International Diabetes Federation, 2017. 8th edition. 147 p.
- 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, 1995.
- JIN, X. et al. Monitoring the glutathione redox reaction in living human cells by combining metabolic labeling with heteronuclear NMR. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 55, n. 28, p. 7939-7942, 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, 2011.
- LI, H. et al. Plasma markers of oxidative stress in patients with gestational diabetes mellitus in the second and third trimester. **Obstet. Gynecol. Int.**, v. 2016, 2016.

LIANG, W. et al. Effects of antioxidant system on coronary artery lesions in patients with abnormal glucose metabolism. **Aging Clin. Exp. Res.**, v. 29, n. 2, p. 141-146, 2016.

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, 2013.

KARAMALI, M. et al. The effects of synbiotic supplementation on pregnancy outcomes in gestational diabetes. **Probiotics Antimicrob. Proteins**, v. 10, n.3, p. 496-503, 2017.

KINSLEY, B. Achieving better outcomes in pregnancies complicated by type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Clin. Ther.**, v. 29, s. D, p. S153-S160, 2007.

KLAFKE, A. et al. The decline in mortality due to acute complications of diabetes mellitus in Brazil, 1991–2010. **BMC Public Health**, v. 15, n. 1, p. 772-779, 2015.

MAHMOUD, F. et al. Trace elements and cell-mediated immunity in gestational and pre-gestational diabetes mellitus at third trimester of pregnancy. **Acta Med. Acad.**, v. 41, n. 2, p. 175-185, 2012.

MARITIM, A. C.; SANDERS, R. A; WATKINS, J. B. 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, v. 17, n. 1, p. 24-38, 2003.

MATÉS, J. M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; DE CASTRO, I. N. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clin. Biochem.**, v. 32, n. 8, p. 595–603, 1999.

McCANCE, D. R. Diabetes in pregnancy. **Best Pract. Res. Clin. Obst. Gynaecol.**, v. 29, n. 5, p. 685-699, 2015.

MELO, A. et al. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: mechanisms and therapeutic perspectives. **Oxid. Med. Cell Longev.**, v. 2011, 2011.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

OLIVEIRA, P. V. S.; LAURINDO, F. R. M. Implications of plasma thiol redox in disease. **Clin. Sci.**, v. 132, n. 12, p. 1257-1280, 2018.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Ministério da Saúde. Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia. Sociedade Brasileira de Diabetes. **Rastreamento e diagnóstico de diabetes mellitus gestacional no Brasil**. Brasília, DF: OPAS, 2016. 32p.

ORNOY, A. Biomarkers of maternal diabetes and its complication in pregnancy. **Reprod. Toxicol.**, v. 34, n. 2, p. 174-179, 2012.

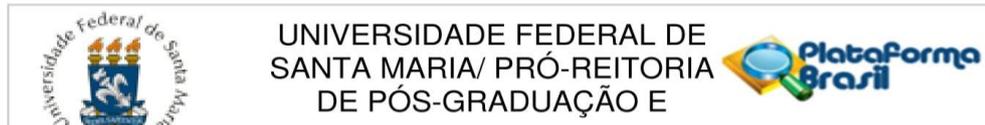
ORNOY, A. et al. Effect of maternal diabetes on the embryo, fetus, and children: congenital anomalies, genetic and epigenetic changes and developmental outcomes. **Birth Defects Res. C: Embryo Today**, v. 105, n. 1, p. 53-72, 2015.

- PALMA, H. E. et al. Oxidative stress parameters in blood, liver, and kidney of diabetic rats treated with curcumin and/or insulin. **Mol. Cell Biochem.**, v. 386, n. 1-2, p. 199-210, 2014.
- PANIZ, C. et al. The influence of the serum vitamin C levels on oxidative stress biomarkers in elderly women. **Clin. Biochem.**, v. 40, n. 18, p. 1367-1372, 2007.
- PENG, C. et al. Biology of ageing and role of dietary antioxidants. **Biomed. Res. Int.**, v. 2014, 2014.
- PESCOSOLIDO, N.; CAMPAGNA, O.; BARBATO, A. Diabetic retinopathy and pregnancy. **Int. Ophthalmol.** v. 34, n. 4, p. 989-997, 2014.
- PEUCHANT, E. et al. Oxidative and antioxidative status in pregnant women with either gestational or type 1 diabetes. **Clin. Biochem.**, v. 37, n. 4, p. 293-298, 2004.
- PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **Int. J. Biomed. Sci.**, v. 4, n. 2, p. 89-96, 2008.
- PIPPITT, K.; LI, M.; GURGLE, H. E. Diabetes mellitus: screening and diagnosis. **Am. Fam. Physician**, v. 93, n. 2, p. 103-109, 2016.
- POLACHINI, C. R. N. et al. Evaluation of delta-aminolevulinic dehydratase activity, oxidative stress biomarkers, and vitamin D levels in patients with multiple sclerosis. **Neurotox. Res.**, v. 29, n. 2, p. 230-242, 2015.
- RAFFA, R.B.; RAWLS, S.M.; BEYZAROV, E.P. **Atlas de Farmacologia de Netter**. Porto Alegre: Artmed, 2006. 440 p.
- RAMIRO-CORTIJO, D. et al. Maternal plasma antioxidant status in the first trimester of pregnancy and development of obstetric complications. **Placenta**, v. 47, p. 37-45, 2016.
- RAYANAGOUDAR, G. et al. Quantification of the type 2 diabetes risk in women with gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis of 95,750 women. **Diabetologia**, v. 59, n. 7, p. 1403-1411, 2016.
- ROCHA, J. B. T. et al. Aminolevulinic dehydratase (delta-ALA-D) as marker protein of intoxication with metals and other pro-oxidant situations. **Toxicol. Res.**, v. 1, p. 85-102, 2012.
- ROJAS, L. B. A.; GOMES, M. B. Metformin: an old but still the best treatment for type 2 diabetes. **Diabetol. Metab. Syndr.**, v. 5, n.1, p. 6, 2013.
- SCHAEFER-GRAF, U. et al. Diabetes in pregnancy: a new decade of challenges ahead. **Diabetologia**, v. 61, n. 5, p. 1012-1021, 2018.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da sociedade brasileira de diabetes 2017-2018**. São Paulo: Editora Clannad, 2017. 383 p.
- SOUZA, J. B. et al. Delta-aminolevulinic dehydratase ( $\delta$ -ALA-D) activity in diabetes and hypothyroidism. **Clin. Biochem.**, v. 40, n. 5-6, p. 321-325, 2007.

- 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, 2010.
- TOLJIC, M. et al. Increased oxidative stress and cytokines-block micronucleus cytome assay parameters in pregnant women with gestational diabetes mellitus and gestational arterial hypertension. **Reprod. Toxicol.**, v. 71, p. 55-62, 2017.
- VALENTINI, J. et al. Human erythrocyte  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase activity and oxidative stress in hemodialysis patients. **Clin. Biochem.**, v. 40, n. 9-10, p. 591-594, 2007.
- VIDAL, Z. E. O. et al. Oxidative stress increased in pregnant women with iodine deficiency. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 157, n. 3, p. 211-217, 2014.
- ZANINI, D. et al.  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase activity in lung cancer patients and its relationship with oxidative stress. **Biomed. Pharmacother.**, v. 68, n. 5, p. 603-609, 2014.
- ZHU, 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, 2015.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global report on diabetes**. World Health Organization. Geneva, 2016. 88 p.

## ANEXOS

### ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS (CEP).



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação de Parâmetros de Estresse Oxidativo em Gestantes com Diabetes Mellitus

**Pesquisador:** thissiane de lima gonçalves

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 33665314.4.0000.5346

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.218.984

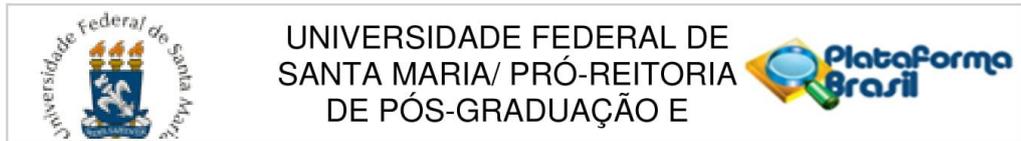
##### Apresentação do Projeto:

Trata-se da solicitação de uma emenda ao projeto original, solicitando a inclusão de um novo local de coleta para o grupo de gestantes híginas.

O DMG é considerado uma patologia grave, uma vez que pode provocar o nascimento de fetos macrossômicos, pré-eclâmpsia e ainda morte perinatal. O estresse oxidativo é um dos fatores envolvidos na fisiologia do DMG, sendo que a taxa de estresse oxidativo é medida pela relação entre as espécies reativas de oxigênio produzidas no organismo, chamados radicais livres, e antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos pela dieta. A mensuração do nível de estresse oxidativo pode ser útil na prática clínica para verificar o status da gestante e do neonato e o risco para possíveis complicações.

A emenda se justifica devido não ser possível selecionar o grupo de pacientes híginas utilizando apenas o local inicial que era o ambulatório de gestantes do pré-Natal do HUSM. O número de participantes permanecerá igual ao previsto no início do projeto.

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar  
**Bairro:** Camobi **CEP:** 97.105-970  
**UF:** RS **Município:** SANTA MARIA  
**Telefone:** (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.218.984

**Objetivo da Pesquisa:**

Estimar o status oxidativo em gestantes com Diabetes mellitus gestacional ou pré-existente atendidas no ambulatório do HUSM através da determinação de parâmetros indicadores de dano oxidativo em amostras de sangue.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

RISCO: o desconforto se resume à picada da agulha, sendo que após a coleta o local poderá ficar dolorido ou arroxado, mas não requer nenhum cuidado especial, voltando ao normal em poucos dias.

BENEFÍCIOS: indiretos, através do conhecimento gerado pela pesquisa.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Apresenta todos os termos necessários de forma adequada.

**Recomendações:**

Veja no site do CEP - <http://w3.ufsm.br/nucleodecomites/index.php/cep> - na aba "orientações gerais", modelos e orientações para apresentação dos documentos. Acompanhe as orientações disponíveis, evite pendências e agilize a tramitação do seu projeto.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

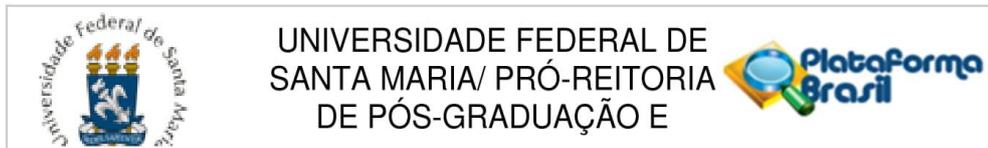
Sem pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Folha de Rosto	folha de rosto.jpg	08/07/2014		Aceito

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar  
**Bairro:** Camobi **CEP:** 97.105-970  
**UF:** RS **Município:** SANTA MARIA  
**Telefone:** (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO E

Continuação do Parecer: 1.218.984

Folha de Rosto	folha de rosto.jpg	11:15:03		Aceito
Outros	Termo de Confidencialidade Fabiane.jpg	08/07/2014 11:33:46		Aceito
Parecer Anterior	Relatório de registro no GAP.jpg	08/07/2014 11:50:49		Aceito
Parecer Anterior	Folha de aprovação DEPE HUSM.jpg	08/07/2014 11:54:50		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto ética.docx	14/08/2014 16:00:56		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE 001.JPG	14/08/2014 16:02:07		Aceito
Outros	Emenda_Fabiane_Rodrigues.jpeg	02/09/2015 11:37:23	thissiane de lima gonçalves	Aceito
Outros	AutorizacaoNepes.jpg	02/09/2015 11:40:16	thissiane de lima gonçalves	Aceito
Outros	Projeto.docx	02/09/2015 11:41:31	thissiane de lima gonçalves	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_583594 E1.pdf	02/09/2015 11:43:19		Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SANTA MARIA, 08 de Setembro de 2015

---

**Assinado por:**  
**CLAUDEMIR DE QUADROS**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar

**Bairro:** Camobi **CEP:** 97.105-970

**UF:** RS **Município:** SANTA MARIA

**Telefone:** (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com

**ANEXO B - QUESTIONÁRIO APLICADO ÀS GESTANTES.**

## QUESTIONÁRIO

Nome: \_\_\_\_\_ Data da coleta: \_\_\_\_\_

SAME: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

1. Qual é 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 a 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.

10. É fumante?

11. Costuma ingerir algum tipo de bebida alcoólica?

## ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Título do projeto:** Análise comparativa do perfil oxidativo e atividade da enzima delta-aminolevulinato-desidratase entre gestantes hígdas e gestantes com diabetes *mellitus*.

**Pesquisador responsável:** Prof<sup>a</sup> Thissiane de Lima Gonçalves Bernasconi.

**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 ANÁLISE COMPARATIVA DO PERFIL OXIDATIVO E ATIVIDADE DA ENZIMA DELTA-AMINOLEVULINATO-DESIDRATASE ENTRE GESTANTES HÍGDAS E 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 arroxado, mas não requer nenhum cuidado especial, voltando ao normal em poucos dias. O material biológico (sangue) será destinado para análises bioquímicas.

O benefício de sua participação no estudo será indireto, isto é, você estará contribuindo para maior conhecimento sobre o Diabetes *Mellitus* durante a gestação e sobre os mecanismos envolvidos nas suas complicações. Os resultados de suas análises bioquímicas, bem como as explicações sobre as mesmas, serão fornecidos pelo pesquisador quando solicitado.

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 da participante da pesquisa), RG n°: \_\_\_\_\_ declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

-----  
Prof<sup>a</sup>. Dra. Thissiane de Lima Gonçalves Bernasconi (Pesquisadora responsável)  
thissianegoncalves@yahoo.com.br

Qualquer dúvida entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa:  
Avenida Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria - 2º andar - Cidade Universitária – Bairro Camobi  
97105-900 - Santa Maria – RS  
Tel.: (55)3220-9362 - e-mail: cep.ufsm@gmail.com

**ANEXO D – TERMO DE CONFIDENCIALIDADE.****TERMO DE CONFIDENCIALIDADE**

**Título do projeto:** ANÁLISE COMPARATIVA DO PERFIL OXIDATIVO E ATIVIDADE DA ENZIMA DELTA-AMINOLEVULINATO-DESIDRATASE ENTRE GESTANTES HÍGIDAS E GESTANTES COM DIABETES *MELLITUS*

**Pesquisador responsável:** Prof<sup>a</sup> Thissiane de Lima Gonçalves Bernasconi

**Instituição/Departamento:** Universidade Federal de Santa Maria/ CCS - DACT

**Telefone para contato:** (55) 3220-8464

**Local da coleta de dados:** Unidade Básica de Saúde Wilson Paulo Noal e Hospital Universitário de Santa Maria

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade das pacientes cujos dados serão coletados na Unidade Básica de Saúde Wilson Paulo Noal e Hospital Universitário de Santa Maria. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima e serão mantidas no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, sala 1232, prédio 26 da Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima nº 1000 (local onde serão armazenados os dados) por um período de cinco anos sob a responsabilidade da Prof. Thissiane de Lima Gonçalves Bernasconi. Após este período, os dados serão destruídos. Quanto às amostras biológicas, essas serão descartadas segundo as normas de controle de descarte para materiais biológicos existentes em nosso departamento.

Este projeto de pesquisa foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM, com o número do CAAE\_\_\_\_\_.

Santa Maria, \_\_\_\_\_.

---

Pesquisadora Responsável

## ANEXO E – PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA OBTIDA DURANTE O PERÍODO DE REALIZAÇÃO DO MESTRADO:

### Manuscritos submetidos:

1. **Paula, H. L.**; Rodrigues, F.; De Lucca, L.; Vendrame, S. A.; Neme, W. S.; Gonçalves, T. L. Comparative analysis of clinical characteristics, oxidative stress markers, and  $\delta$ -aminolevulinatase dehydratase enzyme activity among pregnant women with pre-gestational type 2 and gestational diabetes *mellitus*. In: Primary Care Diabetes.

2. Vendrame, S. A.; De Lucca; **Paula, H. L.**; Stein, C.; Paz, M.; Kavalco, T.; Galarreta, F.; Moresco, R.; Gonçalves, T. L. Duration of labor interferes with markers of oxidative stress in umbilical cord blood of neonates. In: Free Radical Research.

### Trabalhos publicados em anais de eventos (resumos):

1. Nicoli, B. D.; **Paula, H. L.**; Vendrame, S. A.; De Lucca, L.; Gonçalves, T. L. Análise comparativa da peroxidação lipídica e níveis de vitamina C entre gestantes hípidas e gestantes com Diabetes *Mellitus*. In: **33ª Jornada Acadêmica Integrada da Universidade Federal de Santa Maria**, 2018, Santa Maria.

2. Wess, L. C.; Vendrame, S. A.; **Paula, H. L.**; De Lucca, L.; Konopka, C. K.; Gonçalves, T. L. Peroxidação lipídica e capacidade redutora de ferro de acordo com o tipo de parto em gestantes hípidas. In: **33ª Jornada Acadêmica Integrada da Universidade Federal de Santa Maria**, 2018, Santa Maria.

3. **Paula, H. L.**; Lucca, L.; Vendrame, S. A.; Gonçalves, T. L. Análise comparativa da atividade da enzima  $\delta$  - aminolevulinato - desidratase entre gestantes com Diabetes *Mellitus* tipo 2 pré-gestacional e gestacional. In: **III Encontro do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**, 2018, Santa Maria.

4. Vendrame, S. A.; Lucca, L.; **Paula, H. L.**; Gallarreta, F. M.P; Gonçalves, T. L. A influência de diferentes durações de trabalho de parto sobre parâmetros de estresse oxidativo em sangue de cordão umbilical. In: **III Encontro do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**, 2018, Santa Maria.