

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

**Leidiane de Lucca**

**PERFIL OXIDATIVO E ATIVIDADE DA ENZIMA DELTA-  
AMINOLEVULINATO DESIDRATASE EM GESTANTES SAUDÁVEIS  
E EM GESTANTES COM PRÉ-ECLÂMPSIA**

Santa Maria, RS  
2016

**Leidiane de Lucca**

**PERFIL OXIDATIVO E ATIVIDADE DA ENZIMA DELTA-AMINOLEVULINATO  
DESIDRATASE EM GESTANTES SAUDÁVEIS E EM GESTANTES COM PRÉ-  
ECLÂMPSIA**

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  
2016

**Leidiane de Lucca**

**PERFIL OXIDATIVO E ATIVIDADE DA ENZIMA DELTA-AMINOLEVULINATO  
DESIDRATASE EM GESTANTES SAUDÁVEIS E EM GESTANTES COM PRÉ-  
ECLÂMPSIA**

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 5 de setembro de 2016:**

---

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

---

**Guilherme Vargas Bochi, Dr. (UFSM)**

---

**Natália Brucker, Dra. (URI)**

Santa Maria, RS  
2016

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho aos meus pais, pelo amor e dedicação durante toda a minha vida, pelos sacrifícios em prol a minha felicidade, pelo apoio e motivação em todos os momentos, sendo os responsáveis por me conduzirem até aqui. Serei eternamente grata, amo muito vocês!

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus que me guiou em cada obstáculo e me fez acreditar que posso vencer todos os desafios que aparecem em meu caminho. Pelas oportunidades e a todos que Ele colocou em minha trajetória tornando essa etapa mais branda.

A minha orientadora, Thissiane, por ter acreditado em mim desde o primeiro semestre da graduação, me auxiliando tanto na formação acadêmica quanto na vida pessoal, sendo um exemplo de determinação, paciência e integridade. Muito obrigada pelo apoio e oportunidade para a realização dos meus objetivos, obrigada por todos os ensinamentos, carinho, dedicação e amizade durante todos esses anos.

Aos professores, Guilherme, Natália e André que aceitaram avaliar essa dissertação, pela disponibilidade e pelas opiniões que certamente serão muito importantes para o aprimoramento desse trabalho.

Aos meus pais Pedro e Evanice, e a minha irmã Gracielli, pela dedicação, compreensão e amor incondicional, e por tornarem cada momento juntos em um momento de tranquilidade e de renovação da minha energia, vocês são o meu porto seguro. Muito obrigada pelo apoio e por se fazerem sempre presentes em cada dia dessa caminhada, dando o melhor de vocês para tudo o que precisei para a realização desse sonho. Amo vocês!

A minha família, avós e avôs, tios e tias, primos e primas, pelo amor, carinho e apoio de sempre, agradeço especialmente a minha dinda Eunice e os meus primos amados Analice, Gabriel e Marina pelo carinho e incentivo, que mesmo de longe, foram muito presentes e importantes para eu chegar até aqui.

As minhas amigas de Ibirubá, Amanda, Daiane, Caroline, Giovana, Giseli, Lana e Maiara que mesmo distantes estão sempre presentes na minha caminhada desde os tempos do colégio. As minhas amigas e colegas farmacêuticas Alice, Ana Claudia, Fernanda, Jéssica S., Jéssica G, Marla, Mayara e Raphaela, que me apóiam desde o início da minha caminhada na UFSM e as amigas Carolina, Juliana, Juliany e Maria Eduarda que Santa Maria me trouxe. Muito obrigada pelo carinho, momentos alegres de descontração e por entenderem a minha ausência, adoro vocês! Um agradecimento especial a minha amiga irmã Nathália, que está presente no meu dia-a-dia, sempre me apoiando e escutando os meus desabafos, muito obrigada pelo carinho, dedicação e a amizade de tantos anos.

As colegas de laboratório Bárbara e Letícia pela amizade e apoio durante esses anos para a realização desse trabalho. A Gabriela que me apoiou desde o início da graduação me ensinando o quanto a pesquisa é importante, além de ser sempre muito dedicada, querida e

prestativa com todas as colegas de laboratório. Em especial a minha colega e amiga Fabiane, pela ajuda diária, pelo companheirismo e dedicação principalmente nos momentos difíceis do desenvolvimento da pesquisa.

Aos funcionários do DACT, em especial a Helena pela atenção, amizade, dedicação e disposição para ajudar na realização desse trabalho.

À UFSM e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

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

Aos funcionários do HUSM e do Posto de Saúde Erasmo Crossetti pela disponibilidade e boa vontade nos dias de coleta. Em especial aos médicos Francisco e Walter e ao enfermeiro Wendel pelo apoio, dedicação e disposição desde o início da pesquisa.

Um agradecimento muito especial a todas as voluntárias pela boa vontade e participação na pesquisa.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento do trabalho.

**MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO

### PERFIL OXIDATIVO E ATIVIDADE DA ENZIMA DELTA-AMINOLEVULINATO DESIDRATASE EM GESTANTES SAUDÁVEIS E EM GESTANTES COM PRÉ-ECLÂMPسيا

AUTORA: Leidiane de Lucca

ORIENTADORA: Thissiane de Lima Gonçalves Bernasconi

Durante a gestação, mesmo sendo um processo fisiológico, há estresse oxidativo devido a uma maior demanda metabólica e ao aumento do consumo de oxigênio nos tecidos, principalmente na placenta, em resposta ao crescimento fetal e as mudanças fisiológicas maternas. Além disso, devido ao aumento das demandas maternas para o desenvolvimento do feto também pode ocorrer uma deficiência de ferro durante o período gestacional, sendo então, indicada a suplementação com sulfato ferroso, pois a carência de ferro, além de causar anemia, pode gerar um aumento no estresse oxidativo na gestante. Outra patologia gestacional que também está envolvida no aumento do estresse oxidativo é a pré-eclâmpسيا, que é caracterizada pelo aumento na pressão arterial e na proteinúria da gestante. Essa condição apresenta etiologia desconhecida e é a maior causa de morbidade materna e fetal. O estresse oxidativo está envolvido na fisiopatologia dessa doença, causando danos as macromoléculas como DNA, lipídeos e proteínas. A enzima sulfidrílica delta-aminolevulinato-desidratase ( $\delta$ -ALA-D) pode estar inibida em situações pró-oxidantes e essa inibição resulta no acúmulo do ácido 5-aminolevulínico, estando diretamente relacionado a um aumento na produção de radicais livres. Assim, a enzima  $\delta$ -ALA-D pode ser um marcador indireto de estresse oxidativo. Considerando que o estresse oxidativo está diretamente envolvido em patologias gestacionais, o objetivo desse trabalho foi avaliar o perfil oxidativo e a atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D em gestantes com e sem suplementação com ferro e em gestantes com pré-eclâmpسيا. Foram analisados parâmetros de estresse oxidativo através da quantificação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), dos grupos tíois protéicos (P-SH) e não protéicos (NP-SH), os níveis de vitamina C, além da determinação da atividade das enzimas catalase e  $\delta$ -ALA-D em gestantes saudáveis com e sem suplementação com ferro e em gestantes com pré-eclâmpسيا. Os níveis de TBARS foram significativamente maiores em gestantes sem suplementação com ferro e em gestantes com pré-eclâmpسيا, enquanto que o sistema antioxidante das mesmas parece estar diminuído devido a redução nos níveis de P-SH, NP-SH e vitamina C, além da diminuição na atividade das enzimas catalase e  $\delta$ -ALA-D. Com base nesses resultados, podemos concluir que a suplementação com ferro pode causar um efeito protetor ao dano oxidativo causado pela gestação quando comparado a gestantes sem suplementação. Além disso, há um aumento no estado de estresse oxidativo e diminuição na atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D em gestantes com pré-eclâmpسيا quando comparado a gestantes saudáveis, sendo que isso pode estar envolvido nas complicações dessa patologia e a quantificação da atividade dessa enzima pode ser útil na avaliação dos danos provocados pela pré-eclâmpسيا.

**Palavras-chave:**  $\delta$ -ALA-D. Estresse Oxidativo. Grávidas. Suplementação com Ferro. Pré-eclâmpسيا.

## ABSTRACT

### OXIDATIVE PROFILE AND DELTA-AMINOLEVULINATE DEHYDRATASE ACTIVITY IN HEALTHY PREGNANCY AND PREGNANCY WITH PREECLAMPSIA

AUTHOR: Leidiane de Lucca

ADVISOR: Thissiane de Lima Gonçalves Bernasconi

During pregnancy, even being a physiological process, there is an increase in oxidative stress due to increased metabolic demands and increased oxygen consumption in the tissues, especially in the placenta, in response to fetal growth and maternal physiological changes. Furthermore, due to the increased maternal demands for the development of the fetus, iron deficiency can also occur during pregnancy, being then indicated supplementation with this compound because its absence may cause anemia, and generate an increased oxidative stress in pregnant women. Another gestational pathology that is also involved in increased oxidative stress is preeclampsia, which is characterized by increased blood pressure and proteinuria in pregnant women, it has unknown etiology and is the leading cause of maternal and fetal morbidity. Oxidative stress is involved in the pathophysiology of this disease, damaging macromolecules such as DNA, lipids and proteins. The sulfhydryl delta-aminolevulinic acid dehydratase enzyme ( $\delta$ -ALA-D) can be inhibited by pro-oxidant situations and such inhibition results in the accumulation of 5-aminolevulinic acid, it is directly related to increased production of free radicals, and therefore, the enzyme  $\delta$ -ALA-D can be suggested as an indirect marker of oxidative stress. Considering that oxidative stress is directly involved in pregnancy pathologies, the aim of this study was to evaluate oxidative profile and  $\delta$ -ALA-D activity in pregnant women with and without iron supplementation and in pregnant women with preeclampsia. Oxidative stress parameters were analyzed by quantification of reactive species thiobarbituric acid (TBARS), the protein thiol groups (P-SH) and non-protein (NP-SH), levels of vitamin C, in addition to determining the activity of enzymes catalase and  $\delta$ -ALA-D in healthy women with and without supplementation with iron and in pregnant women with preeclampsia. The TBARS levels were significantly higher in pregnant women without iron supplementation, and pregnant women with preeclampsia, while the antioxidant system of the same appears to be reduced due to a reduction in the levels of P-SH, NP-SH and vitamin C, as well as decrease in the activity of catalase and  $\delta$ -ALA-D enzymes. Based on these results, we conclude that iron supplementation can cause a protective effect to the oxidative damage caused by pregnancy when compared to pregnant women without supplementation. Furthermore, there is an increased state of oxidative stress and decrease in the  $\delta$ -ALA-D activity in women with preeclampsia when compared to healthy pregnant women, and it may be involved in the complications of this disease and quantification of the activity of this enzyme may be useful in assessing the damage caused by preeclampsia.

**Keywords:** Delta-aminolevulinic acid dehydratase. Oxidative stress. Pregnant women. Supplementation with iron. Preeclampsia.



## LISTA DE FIGURAS

### REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 - Formação de radicais livres através do oxigênio molecular .....	19
Figura 2- Papel das espécies reativas de oxigênio na lesão celular.....	21
Figura 3 - Etapas do processo de peroxidação lipídica.....	22
Figura 4 - Reações catalisadas pela catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase .	23
Figura 5 - Sistema antioxidante e interação entre vitamina E, vitamina C e tióis.....	24
Figura 6 - Síntese do porfobilinogênio catalisado pela enzima $\delta$ -ALA-D.....	26
Figura 7 - Mecanismo catalítico da enzima $\delta$ -ALA-D .....	27
Figura 8 - Reação de oxidação mediada pelo ferro na indução do estresse oxidativo .....	30
Figura 9 - Localização do ferro no grupamento heme da hemoglobina .....	31
Figura 10 - Alterações das arteríolas espirais uterinas na gravidez normal e na pré-eclâmpsia .....	34
Figura 11- Consequências da produção de radicais livres na pré-eclâmpsia .....	35

### MANUSCRITO

Figure A - $\delta$ -ALA-D activity in pregnant women with and without preeclampsia .....	63
Figure B - Reactivation index of $\delta$ -ALA-D enzyme in pregnant women with and without preeclampsia.....	64

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO

Table 1 - Clinical and demographic characteristics of pregnant and non-pregnant women ...	42
Table 2 - Hematological and biochemical parameters of pregnant and non-pregnant women	43
Table 3 - Oxidative stress markers in pregnant and non-pregnant women .....	43
Table 4 - Delta-aminolevulinate dehydratase activity and Reactivation Index in pregnant and non-pregnant women .....	43

### MANUSCRITO

Table A - Clinical and demographic characteristics of pregnant women with and without preeclampsia .....	62
Table B - Biochemical and hematological parameters of pregnant women with and without preeclampsia .....	62
Table C - Oxidative stress markers in pregnant women with and without preeclampsia .....	63
Table D - Correlations of $\delta$ -ALA-D activity and oxidative stress parameters in pregnant women with preeclampsia .....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALA - Ácido 5-aminolevulínico  
BMI - Body mass index  
C - Control group  
CAT - Catalase  
DNA - Ácido desoxirribonucléico  
DTNB - 5',5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico)  
DTT - Ditiotreitól  
ERNs - Espécies reativas de nitrogênio  
EROs - Espécies reativas de oxigênio  
FR - Free radicals  
GSH - Glutathiona reduzida  
GSH-Px - Glutathiona peroxidase  
GSH-Rd - Glutathiona redutase  
GSSG - Glutathiona oxidada  
H<sub>2</sub>O - Água  
HClO - Ácido hipocloroso  
HELLP - Haemolysis, elevated liver enzymes and low platelets syndrome  
IMC - Índice de massa corpórea  
MDA - Malondialdeído  
MPE - Mild preeclampsia  
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
NHBPEPWG - National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy  
NP - Non-pregnant women  
NP-SH - Non-protein thiol groups  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Radical superóxido  
OH· - Radical hidroxil  
PBG - Porfobilinogênio  
PIS - Pregnant women who were on iron supplementation  
P-SH - Protein thiol groups  
PWS - Pregnant women without supplementation  
RO· - Radical peroxil  
ROO· - Radical alcóxil  
ROOH - Hidroperóxido orgânico  
ROS - Reactive oxygen species  
SD - Standard deviation  
SOD - Superóxido dismutase  
SPE - Severe preeclampsia  
TBA - Ácido tiobarbitúrico  
TBARS - Thiobarbituric acid reactive substances  
VIT C - Vitamin C  
δ-ALA-D - Delta-aminolevulinato-desidratase  
IO<sub>2</sub> - Oxigênio singlete

## **LISTA DE ANEXOS**

<b>ANEXO A</b> – Comprovante de submissão do artigo à revista <i>Biomedicine &amp; Pharmacotherapy</i> .....	81
<b>ANEXO B</b> – Parecer consubstanciado do CEP.....	82
<b>ANEXO C</b> – Produção bibliográfica .....	85

## SUMÁRIO

<b>1 APRESENTAÇÃO</b> .....	15
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
1.1.1 Alterações fisiológicas durante a gestação.....	17
1.1.2 Estresse oxidativo.....	18
1.1.3 Enzima Delta-Aminolevulinato desidratase.....	26
1.1.4 Suplementação com ferro durante o período gestacional.....	29
1.1.5 Pré-eclâmpsia.....	31
1.2 PROPOSIÇÃO.....	36
1.2.1 Proposição Geral.....	36
1.2.2 Proposições Específicas.....	36
1.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
<b>2 ARTIGO – Oxidative Profile and <math>\delta</math>-Aminolevulinic Dehydratase Activity in Healthy Pregnant Women with Iron Supplementation</b> .....	38
<b>3 MANUSCRITO - Delta-aminolevulinic dehydratase activity and oxidative stress markers in preeclampsia</b> .....	49
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	65
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	68
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	69
<b>ANEXOS</b> .....	81

## 1 APRESENTAÇÃO

A gestação é um evento oxidativo (AGARWAL, et al., 2012), sendo um desafio fisiológico a ser cumprido pela mãe e pelo feto (AVERSA et al., 2012). Embora seja um processo fisiológico normal, é caracterizada por alterações dinâmicas em vários órgãos desencadeando mudanças no uso de substratos energéticos e um aumento do consumo basal de oxigênio que acompanham as mudanças fisiológicas maternas e o desenvolvimento fetal (HERRERO-MERCADO et al., 2011).

O estresse oxidativo é caracterizado pela perda de equilíbrio entre substâncias pró-oxidantes e antioxidantes. Esse desequilíbrio pode ocorrer devido a uma série de fatores, como o excesso da produção de radicais livres, sobrecarregando a quantidade de antioxidante disponível ou a uma diminuição de antioxidantes circulantes, levando a baixa defesa do organismo sobre os efeitos nocivos dos radicais livres (BURTON; JAUNIAUX, 2011). Tendo em vista a sua grande capacidade em oxidar irreversivelmente alguns componentes celulares como o ácido desoxirribonucléico (DNA), carboidratos, lipídios e proteínas (TANIYAMA; GRIENDLING, 2003; ZANINI et al., 2014), o estresse oxidativo é considerado um dos mais frequentes mecanismos associado a fisiopatologia de algumas doenças (ELLIOT, 2016; TANIYAMA; GRIENDLING, 2003), além de alguns eventos fisiológicos, como a gestação (ALONSO-ALVAREZ et al., 2004; SPEAKMAN, 2008).

A carência de ferro durante o período gestacional permanece prevalente em todo o mundo, onde aproximadamente 19% das gestantes possuem anemia devido à deficiência de ferro (ZHUANG; HAN; YANG, 2014). Em países em desenvolvimento a suplementação com ferro é uma prática muito comum durante a gestação (LEAL et al., 2011), sendo que a suplementação diária de ferro pode aumentar o peso do recém nascido, além de aumentar os níveis de hemoglobina materna (ZHUANG; HAN; YANG, 2014). A deficiência de ferro durante o período gestacional pode comprometer o desenvolvimento do cérebro no recém nascido (SILVA et al., 2007), além de agravar o estado de estresse oxidativo nas gestantes (DEVIRIM et al., 2006).

Outra patologia que pode agravar o estado de estresse oxidativo durante a gestação é a pré-eclâmpsia (PHIPPS et al., 2016). Alguns estudos sugerem que o estresse oxidativo está envolvido na etiologia da doença (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005; RAIJMAKERS et al., 2005), por aumentar a peroxidação lipídica nas membranas celulares, favorecendo a disfunção endotelial que faz parte da fisiopatologia da doença (MEHENDALE et al., 2008; SERDAR et al., 2003). A pré-eclâmpsia é diagnosticada somente após a 20ª semana de

gestação quando há o aparecimento de hipertensão e proteinúria (>300 mg/dia), sendo uma patologia específica do período gestacional (MOL et al., 2015). Na pré-eclâmpsia ocorre uma falha na invasão trofoblástica havendo uma perfusão sanguínea inadequada, gerando áreas de isquemia e reperfusão, aumentando assim a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (RODRIGO et al., 2005). Além disso, tem sido demonstrado que a enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidase (produtora de superóxido) está presente nos trofoblastos oriundos da placenta de gestantes com pré-eclâmpsia. Assim, esses tecidos placentários apresentam um aumento na capacidade de gerar radicais superóxido ( $O_2^-$ ) (DECHEND et al., 2003; RAIJMAKERS et al., 2004).

A enzima delta-aminolevulinato-desidratase ( $\delta$ -ALA-D) contém grupamentos sulfidrílicos e pode estar inibida em situações pró-oxidantes como durante a pré-eclâmpsia e a carência de ferro durante a gestação (DEVIRIM et al., 2006; FARINA et al., 2003; ROCHA et al., 2012). Essa enzima participa da rota biossintética do heme e sua inibição pode gerar o acúmulo do ácido 5-aminolevulínico (ALA), favorecendo a produção de EROs, contribuindo para a carga global de estresse oxidativo (BAIERLE et al., 2010; ROCHA et al., 2012). Além disso, em algumas doenças, nas quais há um aumento no estresse oxidativo, a atividade dessa enzima mostra-se diminuída, sendo sugerida como um marcador indireto de estresse oxidativo (BONFANTI et al., 2011; GONÇALVES et al., 2009).

Existem evidências que demonstram um aumento do estresse oxidativo durante a gestação saudável e em gestantes com complicações hipertensivas, no entanto, até o momento, não há na literatura relatos sobre a avaliação da atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D em gestantes saudáveis que fazem a suplementação com ferro, bem como são escassos os resultados da atividade da mesma enzima em gestantes com pré-eclâmpsia. Desta forma, é importante a avaliação do perfil oxidativo em gestantes que fazem suplementação com ferro e em gestantes com pré-eclâmpsia, principalmente através da atividade da  $\delta$ -ALA-D, a fim de investigar o papel desta enzima sobre esses fatores gestacionais verificando a resposta oxidativa e correlacionando a atividade da enzima com outros parâmetros de estresse oxidativo.

## 1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1.1 Alterações fisiológicas durante a gestação

Durante a gestação o organismo passa por uma série de transformações associadas às adaptações anatômicas, fisiológicas e metabólicas, com o objetivo de favorecer o suprimento de metabólitos e nutrientes ao feto. O acompanhamento dessas alterações deve ser realizado em todas as gestantes para melhorar a qualidade de vida da mãe e do recém nascido (GOMES, 2011; RIBAS et al., 2015).

Uma das alterações mais importantes que ocorre no organismo da gestante é a expansão de cerca de 40 a 50% do volume sanguíneo total (GOMES, 2011). Além disso, as grávidas apresentam cerca de 3 a 5% menos hematócrito entre 20 e 30 semanas de gestação (VON TEMPELHOFF et al., 2008) devido ao aumento de 30% do conteúdo plasmático e o maior fornecimento de ferro ao feto (BOTHWELL, 2000). Isso tudo ocorre para compensar as alterações oriundas da circulação intra uterina que esta aumentada durante o período gestacional (RIBAS et al., 2015), havendo uma anemia fisiológica devido a uma diluição sanguínea, através da diminuição da hemoglobina que está relacionada a um aumento no volume plasmático quando compara ao volume eritrocitário (HILL; PICKINPAUGH, 2008). Outro parâmetro que está alterado durante a gestação é o débito cardíaco que se eleva em cerca de 30-50%, seguido pela resistência moderada à insulina, aumento na frequência cardíaca e hipertrofia ventricular esquerda (GOMES, 2011; QUEIROZ; NÓBREGA, 2007).

Na gravidez saudável, mesmo com as várias alterações hemodinâmicas que poderiam gerar um aumento na pressão arterial, ocorre uma diminuição da pressão arterial sistólica e diastólica até a 20ª semana de gestação, sendo que isso ocorre devido à diminuição da resistência vascular periférica oriunda da angiogênese e vasodilatação (GOMES, 2011; MAYNARD; EPSTEIN; KARUMANCHI, 2008). No entanto, em algumas gestantes isso não acontece e as alterações metabólicas que ocorrem podem desenvolver algumas doenças, como a pré-eclâmpsia, por exemplo, podendo comprometer o crescimento fetal (RIBAS et al., 2015).

Além das alterações metabólicas que se desenvolvem normalmente durante o período gestacional, a má alimentação das gestantes favorece a baixa ingestão de nutrientes essenciais como ferro, zinco, selênio e vitaminas A, C e E, diminuindo as defesas antioxidantes no organismo. Todas essas alterações favorecem a produção de radicais livres, havendo um



aumento no estresse oxidativo e conseqüentemente um aumento no risco de desenvolvimento de outras patologias, como a hipertensão (LIMA et al., 2010; RIBAS et al., 2015).

Além disso, durante a gestação ocorre um estado de elevado grau de estresse oxidativo sendo evidenciado tanto nos seres humanos (GUPTA; AGARWAL; SHARMA, 2005) como nos animais (MARTINS; COSTA, 2008). O estresse oxidativo durante a gestação é estritamente regulado por vários mecanismos fisiológicos a fim de manter um equilíbrio contínuo entre a produção de EROs e a capacidade antioxidante materna e assim, permitir a progressão normal da gestação e o crescimento fetal (STARK et al., 2013). A placenta é a principal fonte de agentes pró-oxidantes na gestação normal, por apresentar uma intensa atividade celular, ser um ambiente rico em mitocôndrias, altamente vascularizada (MYATT, 2010) e dependente da disponibilidade de oxigênio, propiciando o desenvolvimento de estresse oxidativo (MARSEGLIA et al., 2014).

O estresse oxidativo pode desempenhar um papel significativo durante todo o período reprodutivo da vida da mulher, podendo influenciar o período gestacional e também o momento do parto (AGARWAL et al., 2012). Além disso, o estresse oxidativo pode chegar a níveis extremos durante o desenvolvimento placentário podendo estar relacionado a várias patologias na gestação (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005), desempenhando um papel no atraso do crescimento intra-uterino (MERT et al., 2012), morte fetal intra-uterina (HRACSKO et al., 2008), aborto espontâneo (WEBSTER; ROBERTS; MYATT, 2008), pré-eclâmpsia, entre outras (BURTON; JAUNIAUX, 2011).

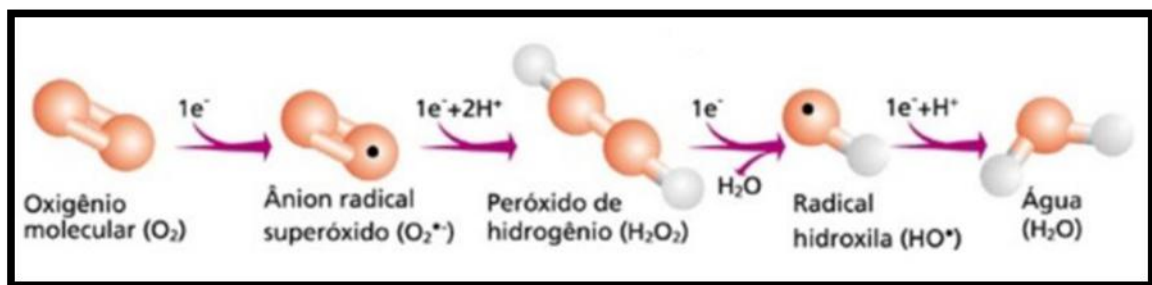
### **1.1.2 Estresse oxidativo**

O estresse oxidativo é definido como um estado de desequilíbrio entre a produção de oxidantes e a capacidade de defesa antioxidante do organismo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Ou seja, há um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) ao ponto de superar as defesas antioxidantes presentes no organismo (GILBERT et al., 2007; GUPTA et al., 2009). Além das EROs, os oxidantes também são representadas por espécies reativas de nitrogênio (ERNs), radicais sulfidrílicos centrais, entre outros. Esses compostos podem ser gerados fisiologicamente a partir de processos como em reações químicas ou enzimáticas e radiação ionizante. Nem todas essas espécies reativas são radicais, isto é, moléculas com um (ou mais) elétrons desemparelhados, mas em muitos casos as

espécies reativas não-radicais vão terminar como radicais, prejudicando biomoléculas através da oxidação (ABUJA; ALBERTINI, 2001).

As EROs são produzidas pela cadeia transportadora de elétrons, como parte do processo da fosforilação oxidativa, exercendo um papel importante na regulação da sinalização, proliferação e diferenciação celular. As moléculas de oxigênio, produzidas a partir da fosforilação oxidativa, são convertidas em radical superóxido e posteriormente, em peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (DE MARCHI et al., 2013). Além da sinalização celular, as EROs e ERNs participam dos mecanismos de controle da pressão sanguínea, apoptose entre outros papéis fisiológicos (VASCONCELOS et al., 2007). O grupo que constitui as EROs é muito amplo, incluindo radicais livres de oxigênio e alguns não radicais, como por exemplo, agentes oxidantes ou compostos que facilmente são convertidos em radicais livres de oxigênio (HALLIWELL; GUTERRIDGE, 2007a), entre eles, o carbono, o enxofre e o oxigênio (LAPPAS et al., 2011). Os derivados do oxigênio mais importantes para os seres vivos podem ser classificados em dois diferentes grupos: os radicalares e os não-radicalares. Os radicalares, também denominados como radicais livres, são representados principalmente pelo ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ) e radicais peroxil ( $RO^{\bullet}$ , alcóxil e  $ROO^{\bullet}$ ), enquanto que os não-radicalares são representados pelo oxigênio singlete ( $IO_2$ ), hidroperóxido orgânico (ROOH) e pelo ácido hipocloroso (HClO) (Figura 1) (GILLHAM; PAPACHRISTODOULOU; THOMAS, 1997; LAPPAS et al., 2011; SIES, 1997).

Figura 1 - Formação de radicais livres através do oxigênio molecular



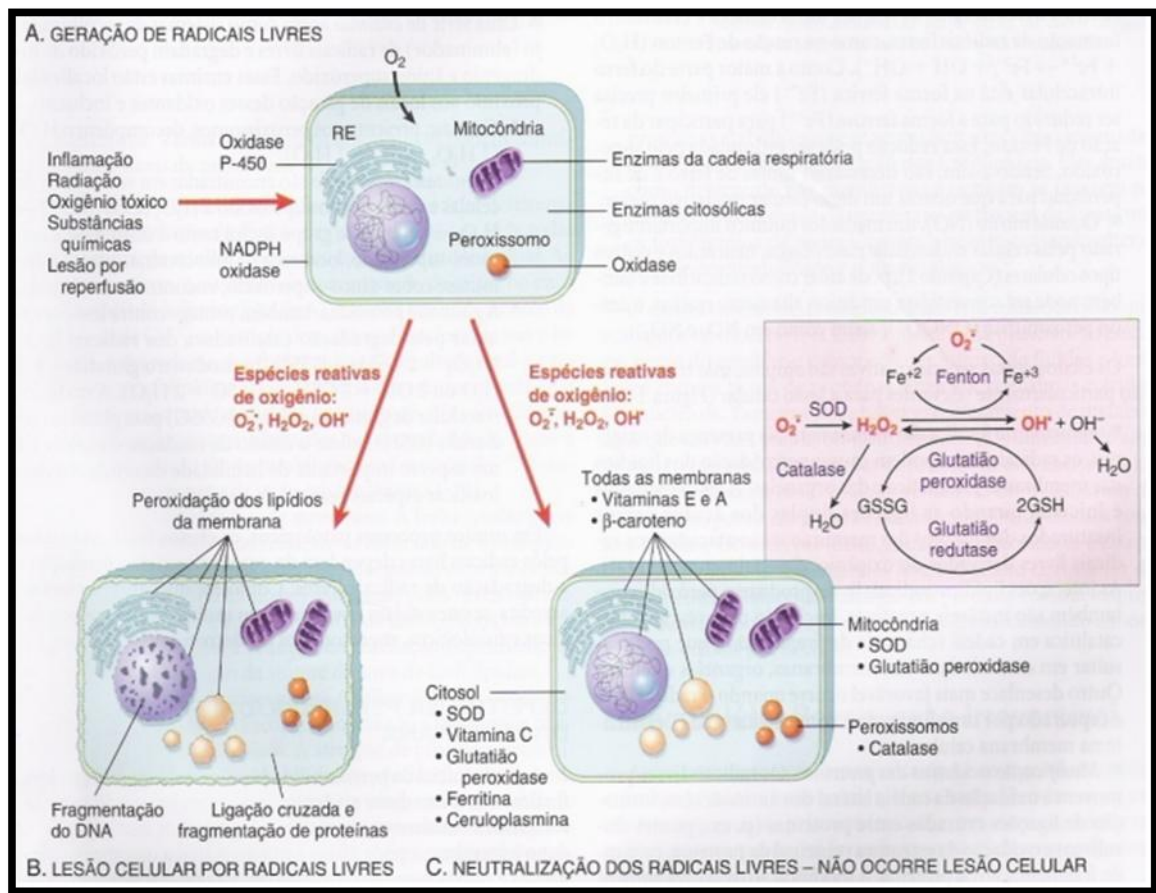
Fonte: Adaptado de AUGUSTO, 2006

O complexo enzimático presente na membrana interna das mitocôndrias, conhecido como citocromo-oxidase, é capaz de reter os átomos de oxigênio para que eles recebam elétrons do complexo citocromo C, formando água. No entanto, a redução gradual do

oxigênio à água produz uma variedade de produtos intermediários instáveis, muito reativos e potencialmente tóxicos, como por exemplo, o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil. Estas espécies parcialmente reduzidas são geradas continuamente em todas as células aeróbias como resultado de processos oxidativos. O oxigênio é uma molécula essencial para a manutenção do organismo, no entanto, seu excesso pode ser tóxico, porque o  $O_2$  também é considerado um radical livre. Os seres vivos só toleram o oxigênio do ar atmosférico, pois quando ele entra na célula se modifica rapidamente, sendo controlado inicialmente por enzimas específicas (ALBERTS et al., 2011; LAPPAS et al., 2011).

Os radicais livres são átomos, íons ou moléculas que contém um ou mais elétrons desemparelhados em sua órbita mais externa do oxigênio da estrutura (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). Definidos como qualquer espécie que consegue existir independentemente, com tendência a buscar sua estabilidade, sendo alcançada apenas quando todos os elétrons estiverem emparelhados (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007a). São caracterizados por grande instabilidade e elevada reatividade e tendem a ligar o elétron não-pareado com outros presentes em estruturas próximas de sua formação, comportando-se como receptores (oxidantes) ou doadores (redutores) de elétrons (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). O perigo desse tipo de reação é que os produtos de oxidação formados são radicais também, os quais em muitos casos são capazes de propagar a reação, levando a um dano extensivo (ABUJA; ALBERTINI, 2001). A geração desses radicais pode ocorrer por diversos mecanismos, sendo em condições fisiológicas como o metabolismo celular de prostaglandinas e ácidos graxos, como também em situações de inflamação-infecção, hipóxia-hiperóxia e isquemia-reperusão (TRINDADE; RUGOLO, 2007). Os radicais livres podem reagir com as principais classes de biomoléculas, como ácidos nucleicos, lipídios e proteínas, sendo os lipídeos os mais suscetíveis (Figura 2) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989; POLI et al., 2004).

Figura 2- Papel das espécies reativas de oxigênio na lesão celular



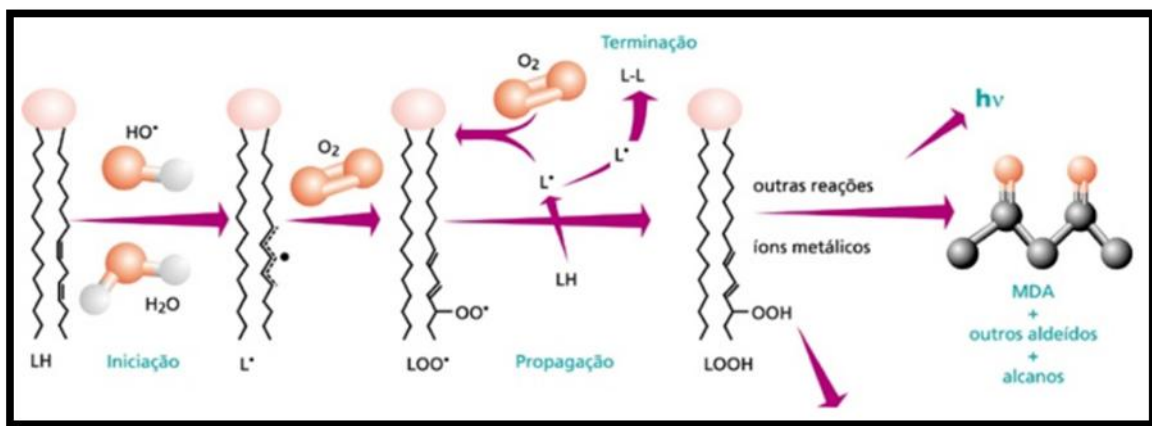
Fonte: Adaptado de ROBINS; COTRAN, 2005

Os danos causados pelas EROs podem ser caracterizados pelo início da peroxidação lipídica, sendo representado através da quantificação das moléculas de malondialdeído (MDA) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007b; LAPPAS et al., 2011). O MDA é um produto tóxico da peroxidação lipídica, sendo resultante da reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), quantificado através da técnica de TBARS (*thiobarbituric acid reactive substances*) (GROTTO et al., 2008). Assim, além do MDA ser uma molécula tóxica, é muito reativa e estável, sendo frequentemente utilizado como marcador de estresse oxidativo (LAPPAS et al., 2011).

Estudos têm demonstrado que as membranas celulares são muito suscetíveis à ação das EROs, por serem compostas principalmente por fosfolipídeos, que as predispõe a ocorrência de peroxidação lipídica, contribuindo para a ocorrência de danos celulares e de alterações na organização estrutural, bem como nas propriedades físicas dos componentes da membrana (Figura 3) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; JACOB; MASON, 2005). A

interação dos ácidos graxos das membranas com os radicais livres acaba resultando em uma perda da troca iônica, ocasionada devido à perda da característica das membranas biológicas, tornando-as mais frágeis. Ocasionalmente assim, a liberação do conteúdo das organelas, como enzimas hidrolíticas, favorecendo o trânsito de detritos celulares e metabólitos, além da formação de produtos citotóxicos como o MDA e da ruptura/lise da membrana celular (LIMA; ABDALLA, 2001; TIMBRELL, 2000).

Figura 3 – Etapas do processo de peroxidação lipídica



Fonte: Adaptado de AUGUSTO, 2006

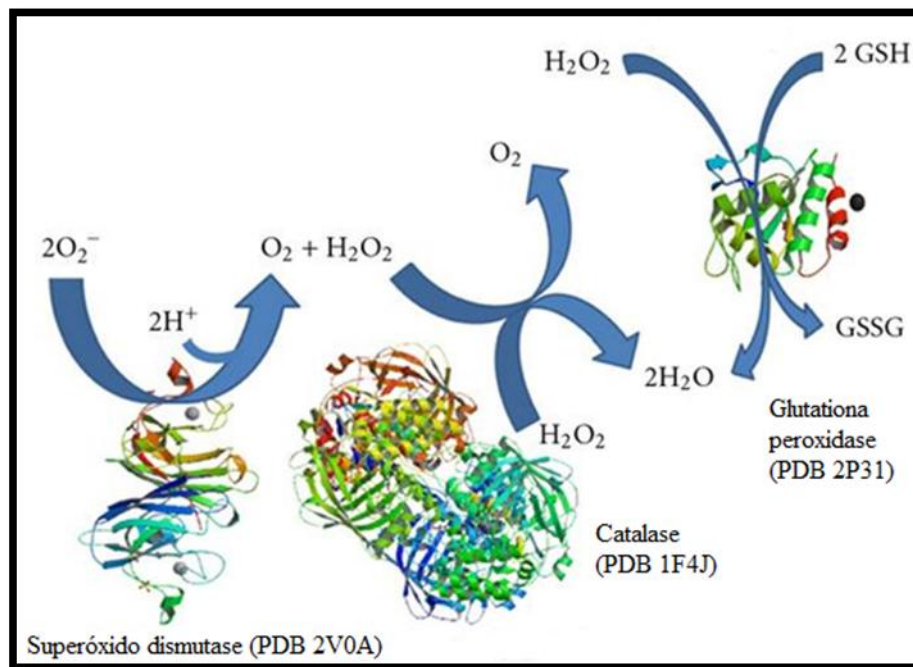
Frente a tais fenômenos, o organismo possui sistemas de defesas antioxidantes para inativar ou limitar a produção de radicais livres, para reparar o dano celular causado devido a essas espécies e até mesmo um sistema capaz de adaptar o organismo ao estresse oxidativo. Ou seja, os antioxidantes são moléculas que reagem com os radicais livres para bloquear as reações, para recuperar danos já ocorridos ou para evitar que moléculas vitais sofram algum tipo de dano, sendo um sistema capaz de neutralizar os radicais livres (DOTAN; LICHTENBERG; PINCHUK, 2004; GUPTA et al., 2005).

O corpo humano possui um importante sistema de defesa antioxidante, sendo fundamental para o organismo combater as toxinas oriundas do ambiente. O sistema antioxidante pode ser dividido em enzimático e não enzimático, podendo agir de diferentes maneiras, como por exemplo, detoxificando agentes antes que causem lesões, através de enzimas como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GSH-Px), além de compostos como a vitamina E e a glutatona reduzida (GSH). Outros como a vitamina C, a glutatona redutase (GSH-Rd) e a GSH-Px são capazes de reparar a lesão ocorrida. Esse sistema protege o organismo do dano oxidativo removendo as EROs, ligando-

se a íons metálicos que formam EROs ou inibindo a formação de EROs (DOTAN; LICHTENBERG; PINCHUK, 2004; GUPTA et al., 2005; SIES, 1997).

O sistema antioxidante enzimático possui três enzimas principais: a CAT, a SOD e a GSH-Px (Figura 4), sendo a primeira linha de defesa endógena contra as EROs. Essas enzimas atuam em conjunto, onde a SOD converte as EROs em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), a CAT e a GSH-Px convertem o  $H_2O_2$  em água e oxigênio molecular (NORDBERG; ARNER, 2001; SAWYER, 2011).

Figura 4– Reações catalisadas pela catalase, superóxido dismutase e glutaciona peroxidase



Fonte: Adaptado de MELO et al., 2011

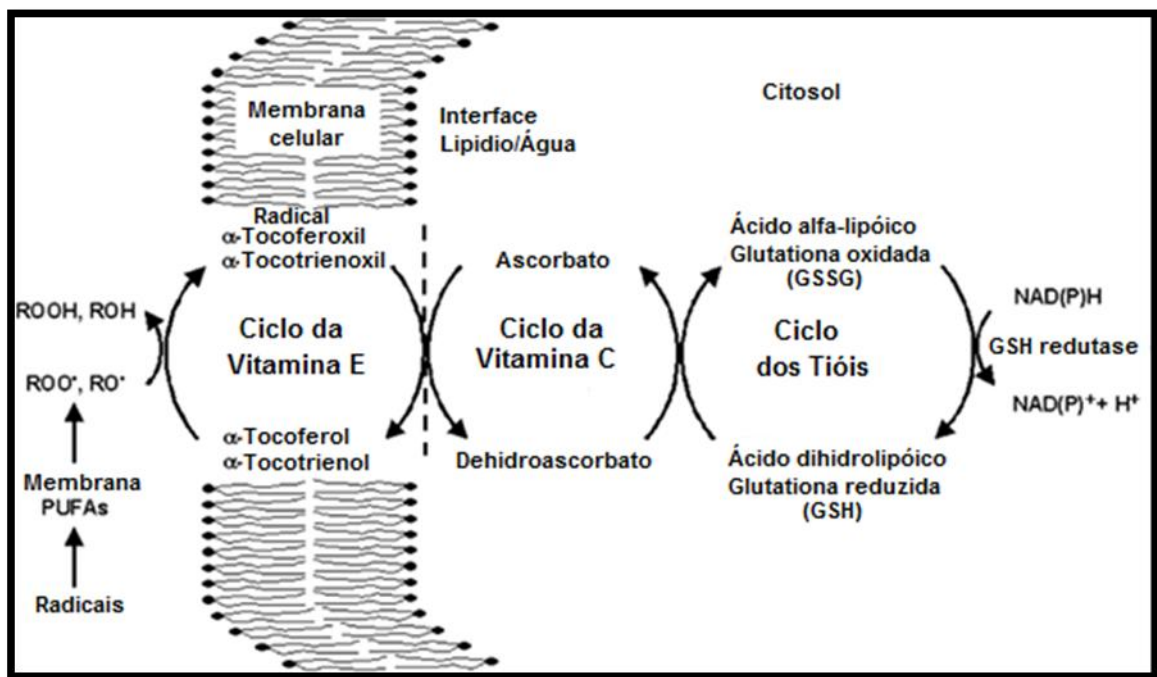
A catalase é expressa principalmente nos peroxissomos, atuando predominantemente no fígado, rins, tecido adiposo e eritrócitos. Essa enzima atua catalisando a conversão do  $H_2O_2$  em  $O_2$  e água ( $H_2O$ ). É uma enzima resistente a proteólise, desnaturação térmica e modificações de pH devido a sua estrutura tetramérica (GOYAL; BASAK, 2010). O mecanismo de ação dessa enzima pode ser dividido em duas fases:

1ª) o íon  $Fe^{3+}$  presente na enzima reage com o  $H_2O_2$  formando água e um composto intermediário I;

2ª) uma segunda molécula de  $H_2O_2$  é utilizada como redutora, regenerando a enzima, produzindo oxigênio e água. Com essa oxidação, o composto intermediário I retorna para o estágio de repouso com  $Fe^{3+}$  (ANDERSSON; DAWSON, 1991).

Os antioxidantes não enzimáticos (Figura 5) representam outra linha de defesa muito importante para o organismo, sendo representados pelas vitaminas C, E, além de compostos como GSH, ácido úrico, entre outros (VASCONCELOS et al., 2007).

Figura 5– Sistema antioxidante e interação entre vitamina E, vitamina C e tióis



Fonte: Adaptado de VAN MEETEREN et al., 2005

A vitamina C (ácido ascórbico) é um agente redutor e está presente em fluidos corporais como o plasma e citosol, capaz de reagir com radicais livres como o superóxido e hidroperóxido, funcionando como um mecanismo de primeira linha de defesa nesses locais (ATIBA et al., 2014; SIES; STAHL; SUNDQUIST, 1992). É considerado o antioxidante nutricional hidrossolúvel mais potente e mais importante, encontrado em frutas e vegetais (NAZIROG˘LU et al., 2010; TARIQ, 2007). A vitamina C atua diretamente através da doação de elétrons para as EROs, neutralizando-as antes que reajam com as lipoproteínas e membranas, evitando a peroxidação lipídica, diminuindo o estresse oxidativo (BONI et al., 2010). Além disso, atua como antioxidante indireto por regenerar a forma ativa de alguns compostos como a vitamina E, flavonóides, glutathiona e  $\beta$ -caroteno (BONI et al., 2010;

FANG; YANG; WU, 2002). Fredstrom (2002) sugere que a vitamina C pode favorecer a vasodilatação sanguínea e prevenir a disfunção endotelial em algumas patologias como a hipertensão arterial, aterosclerose e hipercolesterolemia.

A glutatona reduzida (GSH) é uma das moléculas antioxidantes não enzimáticas mais importantes. É um tripeptídeo com um grupamento sulfidrila responsável pela sua capacidade antioxidante, porque se oxida facilmente sendo muito eficiente na desintoxicação de peróxidos e EROs. Quando ocorre a reação com esses compostos a molécula de GSH se transforma em glutatona oxidada (GSSG), onde posteriormente através da ação da GSH-Rd é reduzida novamente a GSH, formando um complexo antioxidante muito eficiente para o organismo (AUGUSTO, 2006; POMPELLA et al., 2003). Esta biomolécula encontra-se predominantemente dentro dos eritrócitos, cerca de 99,5%, sendo a forma mais abundante encontrada no sangue. No entanto, pode aparecer ligada as proteínas na forma de PSSG e também na forma oxidada (GSSG) (MILLS; LANG, 1996; NOZAL et al., 1997).

O grupamento tiol (-SH ou sulfidrílico) exerce um importante papel em diversas funções fisiológicas e em algumas patologias, devido ao seu potencial de quelação, redução e proteção contra danos causados devido ao estresse oxidativo (HU, 1994; YANG; GUAN, 2015). A quantificação dos grupamentos -SH ocorre através da reação com o 5',5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB), podendo representar a quantidade de GSH presente no sangue. Os tióis protéicos dosados no plasma refletem o nível das proteínas que possuem os grupamentos -SH e também o status sulfidrílico, no entanto, quando dosados nos eritrócitos, que são os tióis não protéicos, pode representar cerca de 90% de GSH no sangue, sendo um teste mais específico (BOYNE; ELLMAN, 1972; JACQUES-SILVA et al., 2001).

O ácido úrico está entre os compostos antioxidantes mais importantes presente no plasma (MARION et al., 2011), é resultante da metabolização das purinas, formado principalmente no fígado a partir da enzima xantina oxidase e 90% do ácido úrico é reabsorvido após passar pela filtração renal (FRANZINI et al., 2012). Ele pode atuar como protetor contra o estresse oxidativo, dano oxidativo, envelhecimento, além de melhorar o sistema vascular, a função cardíaca e as células neuronais (STOCKER; KEANEY, 2004). No entanto, há controvérsias, havendo estudos que sugerem que alguns compostos antioxidantes podem tornar-se pró-oxidantes quando estiverem em níveis extremos no sangue. Assim, em situação de hiperuricemia a atividade antioxidante é superada pela pró-oxidante e pelos efeitos pró-inflamatórios causados devido ao excesso de EROs (MARION et al., 2011).

A xantina oxidase promove um aumento na produção de EROs e ácido úrico em situações de isquemia tecidual, sendo que essas EROs podem induzir a disfunção endotelial e

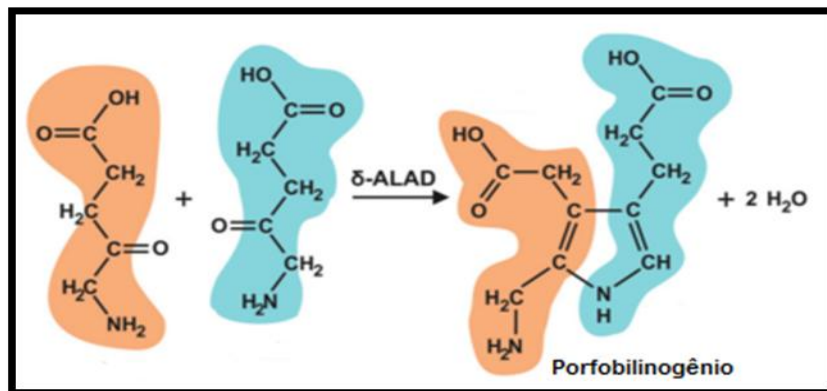


o ácido úrico poderia exercer seu papel antioxidante, diminuindo a produção dessas EROs (MARION et al., 2011). No entanto, Khosla e colaboradores (2005) sugerem que a hiperuricemia pode prejudicar a vasodilatação endotelial. Assim, o ácido úrico pode agir como protetor ou como um fator de risco, dependendo da concentração na qual se encontra no organismo, onde em altas concentrações afeta o endotélio e a função cardiovascular, já em concentrações normais exerce o seu efeito antioxidante, agindo como protetor do sistema cardiovascular (MARION et al., 2011).

### 1.1.3 Enzima Delta-Aminolevulinato desidratase

A enzima Delta-aminolevulinato desidratase (E.C. 4.2.1.24), também denominada porfobilinogênio sintase ou 5-aminolevulinato hidrolase é uma enzima citosólica que atua como uma metaloproteína catalisando a formação do composto monopirrólico porfobilinogênio (PBG), através da condensação assimétrica de duas moléculas do ácido aminolevulínico, com a perda de duas moléculas de água (Figura 6). Essa reação é fundamental na rota de síntese de tetrapirróis como as bilinas, clorofilas, corrinas e hemes, que são compostos muito importantes porque fazem parte dos grupos prostéticos de algumas proteínas. O grupamento heme, também conhecido como ferroprotoporfirina, esta presente na estrutura de proteínas responsáveis pelo transporte de oxigênio (hemoglobina e mioglobina), biotransformação de xenobióticos (citocromo P450), transporte de elétrons (citocromos a, b e c) e em enzimas responsáveis pela proteção contra peróxidos (catalase e peroxidases) (JAFFE et al., 1995).

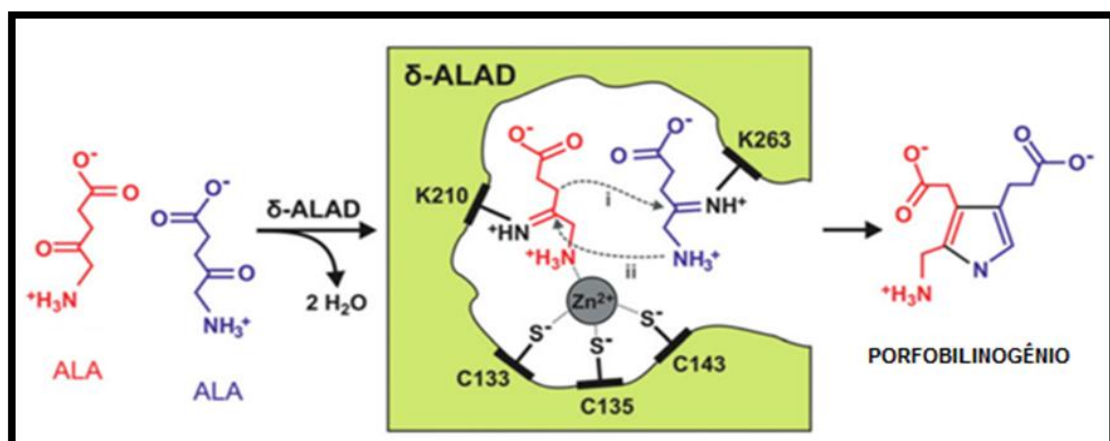
Figura 6-Síntese do porfobilinogênio catalisado pela enzima  $\delta$ -ALA-D



A  $\delta$ -ALA-D é uma enzima fundamental para os seres vivos porque esta envolvida no processo de fixação do  $\text{CO}_2$  e participa do metabolismo aeróbico, além de ter ampla distribuição na natureza, onde a via para a biossíntese de porfirinas é semelhante nos animais, bactérias e também nos vegetais (JAFÉ, 2000; SHOOLINGIN-JORDAN, 1998; WARREN et al., 1998). Devido a isso, metabólitos ou agentes tóxicos que interferem na síntese de compostos tetrapirrólicos alteram profundamente o metabolismo celular (HEINEMANN; JAHN; JAHN, 2008). Os tecidos que apresentam maior atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D são os hematopoiéticos, hepático e renal (GIBSON; NEUBERGER; SCOTT, 1955). Além disso, as propriedades catalíticas da enzima são similares nos animais, bactérias e nas plantas, somente algumas diferenças na estrutura primária, na sensibilidade dos grupamentos tiólicos e na necessidade de íon metálico têm sido observadas após a purificação das diversas enzimas purificadas (KONUK; CIĞERCI; KORCAN, 2010).

Independente de sua fonte, a enzima  $\delta$ -ALA-D é de origem sulfidrílica, sendo que nos mamíferos é uma enzima dependente de zinco ( $\text{Zn}^{2+}$ ) (Figura 7) e possui um pH ótimo na faixa de 6,3-7,1 (SHEMIN, 1976). Os grupos tióis da enzima estão envolvidos na coordenação dos íons  $\text{Zn}^{2+}$  e isso torna a enzima sensível à oxidação. Além disso, o zinco também está envolvido na estabilização dos grupos tiólicos e a sua remoção por agentes quelantes favorecem a auto-oxidação enzimática. Com isso, compostos que oxidam os grupamentos tiólicos, com alta afinidade por grupos  $-\text{SH}$  ou os que competem com o sítio da ligação do zinco podem interferir na atividade da  $\delta$ -ALA-D, através da inibição da atividade enzimática (ROCHA et al., 2012).

Figura 7 – Mecanismo catalítico da enzima  $\delta$ -ALA-D



Quando ocorre a inibição da enzima  $\delta$ -ALA-D podem ocorrer danos a rota biossintética do heme, diminuindo a sua produção e causar alterações patológicas no organismo (GOERING, 1993; ROCHA et al., 2012; SASSA; FUJITA; KAPPAS, 1989). Além disso, com a inibição da enzima, pode ocorrer o acúmulo do substrato ALA no sangue que, entre pH 7-8, sofre reação de enolização promovendo a formação de radicais hidroxil e superóxido (NEAL et al., 1997). Logo, o substrato ALA tem o potencial de favorecer a peroxidação lipídica e de aumentar a produção de EROs no organismo, que podem provocar consequências patológicas inespecíficas, devido a produção exagerada de EROs que podem atuar nas organelas celulares e em diferentes órgãos (BECHARA et al., 1993; SASSA et al., 1989). Tal enzima pode ser sugerida como um marcador indireto de estresse oxidativo, porque a modulação da atividade desta enzima contribui significativamente para a carga global de estresse oxidativo (BECHARA, 1996; COSTA et al., 1997).

Para reverter a inibição da atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D *in vitro* pode-se utilizar Zn ou ativadores dos grupamentos tiólicos como o ditioneitol (DTT), obtendo-se assim, o índice de reativação enzimático. Através da adição de Zn é possível reverter o decréscimo da atividade enzimática que foi causada devido ao deslocamento, quelação ou interação com o íon metálico presente no centro ativo da enzima. Por outro lado, com a adição de DTT é possível manter os grupamentos tiólicos da enzima em seu estado reduzido, devido ao fato do DTT ser um ditiol com habilidade de evitar a oxidação desses grupamentos (EMANUELLI et al., 1996, ROCHA et al., 2012). Devido a isso, o índice de reativação tem sido usado atualmente em alguns estudos para avaliar o envolvimento dos grupos tióis na inibição da atividade dessa enzima, obtendo um resultado significativo com relação à avaliação do estresse oxidativo (BONFANTI, 2011; GONÇALVES et al., 2005; GROTO, 2010).

A atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D é usada clinicamente como um importante biomarcador para diagnóstico de intoxicação por chumbo em animais ou em humanos, devido a inibição da atividade da enzima quando há exposição ao metal (PAPPAS et al., 1995; PIRES; MIEKELEY; DONANGELO, 2002), estando relacionada a anemia intensa e acompanhada ao aumento na produção do substrato ALA (OSKARSSON, 1989). No entanto, pode ser um indicador inespecífico em intoxicações simultâneas com outros metais, devido ao potencial de modulação da atividade da enzima que outros metais possuem, como por exemplo, o mercúrio, cobre e a prata (THOMPSON; JONES; BEASLEY, 1977).

A diminuição da atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D tem sido utilizada como um marcador em potencial para avaliar algumas patologias, principalmente patologias no qual o estresse oxidativo está envolvido. Por ser uma enzima sensível, estando inibida em pacientes com

diabetes tipo 1 e 2, câncer, em pacientes após transplante de medula óssea, em hemodialisados, pacientes intoxicados por metais, entre outros (BONFANTI et al., 2011; GONÇALVES et al., 2005; GONÇALVES et al., 2009; VALENTINI et al., 2008). Além disso, esta diminuída em modelos animais com hipotireoidismo, intoxicação com paracetamol, hiperglicêmicos, entre outros (FOLMER; SOARES; ROCHA, 2002; GRAVINA et al., 2007; OLALEYE; ROCHA, 2008). Nesse contexto, baseado em resultados de estudos descritos na literatura, a avaliação da atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D pode ser considerada um bom marcador de estresse oxidativo.

### **1.1.4 Suplementação com ferro durante o período gestacional**

A anemia ferropriva possui uma alta incidência mundial, principalmente em países em desenvolvimento, como o Brasil, sendo a deficiência nutricional mais frequente nas gestações. Ocorre principalmente devido a uma dieta inadequada durante esse período onde há uma maior utilização do ferro para exercer as funções fisiológicas (BRANDÃO; CABRAL; CABRAL, 2011; SILVA et al., 2007). A deficiência desse nutriente está diretamente relacionada com o agravamento da morbidade e mortalidade materna, diminuição do peso ao nascer, parto prematuro, entre outros (BRANDÃO; CABRAL; CABRAL, 2011).

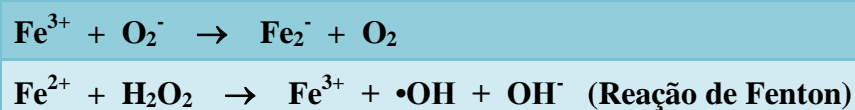
A anemia por deficiência de ferro durante a gestação é diagnosticada quando a concentração de hemoglobina está abaixo de 11 g/dL no primeiro e terceiro trimestres, ou abaixo de 10,5 g/dL no segundo trimestre (CDC, 1988). Os limites de referências são inferiores do que em mulheres não gestantes (12 g/dL) devido à hemodiluição que ocorre fisiologicamente durante o período gestacional (BRANDÃO; CABRAL; CABRAL, 2011). Devido a isso, a Organização Mundial de Saúde sugere uma dose diária para todas as gestantes de suplemento de ferro (ferro elementar 30-60 mg), sendo que as gestante anêmicas devem receber a suplementação diária de 120 mg de ferro elementar até que a concentração de hemoglobina atinja o nível normal. Após a normalização sugere-se a suplementação com a dose pré-natal padrão, evitando assim a recorrência da anemia (WHO, 2012).

Fisiologicamente, o ferro pode ser encontrado na forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ou férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ), podendo funcionar como agente oxidante e/ou redutor. Pode ser encontrado no organismo ligado às proteínas de transporte ou de armazenamento ou como componente funcional de metaloenzimas e de compostos heme (CANÇADO; CHIATTONE, 2010). Participa de vários processos metabólicos, incluindo síntese de DNA, transporte de elétrons e metabolismo de catecolaminas (SILVA et al., 2007). Além disso, é um elemento fundamental da hemoglobina

e mioglobina, responsável por funções importantes como proliferação celular, transporte e distribuição de oxigênio, hidroxilação, transferência de elétrons, entre outros. Assim, a deficiência deste nutriente provoca fadiga, diminuição da capacidade cognitiva, física e mental por afetar o metabolismo energético. Por ser constituinte de enzimas responsáveis por uma série de reações metabólicas no cérebro, no recém nascido é muito importante para o desenvolvimento do sistema nervoso central (BRANDÃO; CABRAL; CABRAL, 2011; MEDOTTI et al., 2015; ZIMMERMANN; HURRELL, 2007).

O ferro quando ingerido em excesso por gestantes, principalmente associado à suplementação com vitamina C, exerce um papel pró-oxidante. Isso ocorre através do ciclo de Haber-Weiss, que envolve a reação de Fenton (Figura 8), onde o ferro livre (metal de transição) catalisa a produção de hidroxila que decompõem os lipídeos hidropéroxidos nas formas de radicais como alcóxil, peróxil e outros. Esses radicais livres interagem com os fosfolipídios insaturados dos ácidos graxos formando os peroxidolipídios levando a danos nas membranas celulares, além de provocar outros danos no organismo (AL-GUBORY; FOWLER; GARREL, 2010; BRANDÃO; CABRAL; CABRAL, 2011; LACHILI et al., 2001). Devido a isso, há um aumento no estresse oxidativo sendo danoso ao metabolismo da gestante (CASANUEVA; VITERI, 2003), favorecendo o desenvolvimento de complicações na gestação, como a pré-eclâmpsia (YOUNG et al., 2010) e o Diabetes Mellitus Gestacional (GARCIA et al., 2012).

Figura 8 – Reação de oxidação mediada pelo ferro na indução do estresse oxidativo

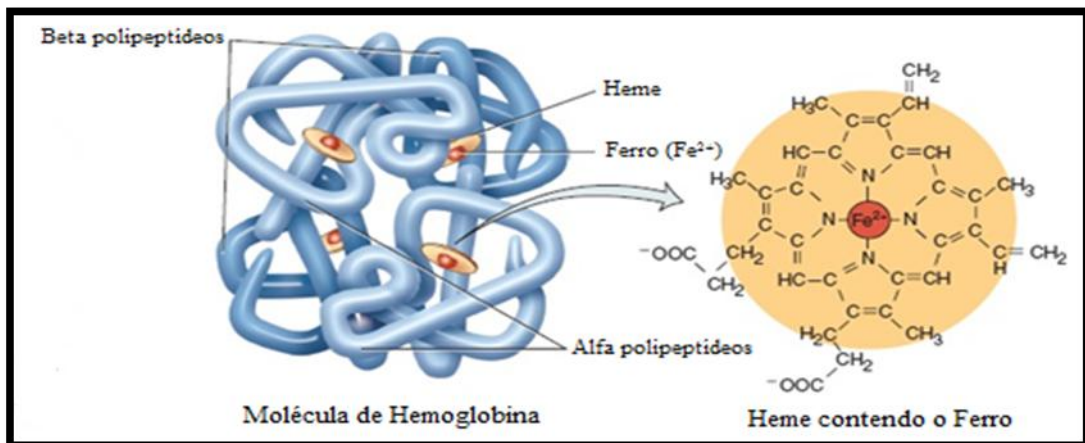


Fonte: Adaptado de BRANDÃO; CABRAL; CABRAL, 2011

Em contrapartida, alguns estudos sugerem que o ferro é um mineral muito importante obtido através da dieta por agir no combate aos radicais livres (BARREIROS; DAVID, 2006; KURTOGLU et al., 2003). No entanto, os níveis de ferro necessários no segundo e terceiro trimestre de gestação não são supridos somente pela ingestão através da dieta, sendo necessária a suplementação com ferro logo no início do período gestacional (MILMAN, 2006). Além disso, a suplementação com ferro em doses corretas melhora o sistema hematológico e o estresse oxidativo em gestantes anêmicas, através da diminuição de alguns

parâmetros de estresse oxidativo (HAN et al., 2011). O ferro é um mineral que pode agir como um antioxidante não enzimático indiretamente, além de ser essencial para a homeostase celular e um importante co-fator de enzimas antioxidantes, devido à facilidade de receber e doar elétrons (ABBASPOUR; HURRELL; KELISHADI, 2014; KURTOGLU et al., 2003). Ademais, o ferro está presente na composição de diversas proteínas e é fundamental para a formação do grupamento heme (Figura 9), sendo que quando esta na forma de hemoproteína promove a geração de energia, participa do transporte de oxigênio e desintoxicação (ABBASPOUR; HURRELL; KELISHADI, 2014).

Figura 9 – Localização do ferro no grupamento heme da hemoglobina



Fonte: Adaptado de MOZZARELLI; BETTATI, 2011

### 1.1.5 Pré-eclâmpsia

Entre todas as causas de complicações durante o período gestacional, as síndromes hipertensivas são responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade tanto maternas quanto fetais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). No Brasil, representa aproximadamente 37% dos óbitos das gestantes (CAVALLI et al., 2009). Segundo o *National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy – NHBPEPWG*, essas síndromes são classificadas como hipertensão arterial crônica, hipertensão arterial gestacional, pré-eclâmpsia/eclâmpsia e pré-eclâmpsia sobreposta à hipertensão arterial crônica (NHBPEPWG, 2000).

A pré-eclâmpsia é uma complicação hipertensiva transitória, específica do período gestacional e afeta cerca de 3-5% de todas as gestações e ocorre principalmente em gestantes

que residem em países de baixa renda (ALZATE; HERRERA-MEDINA; PINEDA, 2015; MOL et al., 2015; SALEEM et al., 2014). É uma das mais intrigantes patologias para a obstetrícia devido à ausência de um diagnóstico precoce, e também por ser uma doença multissistêmica com etiologia pouco conhecida. Além disso, possui um caráter heterogêneo e um alto índice de mortalidade e morbidade fetal/materna, podendo causar prematuridade do feto devido às complicações que ocorrem durante a patologia (ALZATE; HERRERA-MEDINA; PINEDA, 2015; KHAN et al., 2006; MOL et al., 2015; SALEEM et al., 2014).

Clinicamente, a pré-eclâmpsia é definida por valores pressóricos acima de 140/90 mmHg em dois momentos com intervalo de 6 horas, acompanhada por proteinúria acima de 300 mg/24 h após 20 semanas de gestação (MOL et al., 2015). A patologia é classificada como grave quando a gestante apresenta um ou mais dos seguintes sintomas: pressão sistólica  $\geq 160$  mmHg ou pressão diastólica  $\geq 110$  mmHg; plaquetopenia ( $< 100.000$  plaquetas/ $\mu\text{L}$ ); função renal prejudicada; edema pulmonar; fortes dores de cabeça; confusão mental; distúrbios visuais e cerebrais; entre outros (ROBERTS et al., 2013).

As complicações maternas mais comuns dessa síndrome são hemólise, elevação de enzimas hepáticas e plaquetopenia, conhecida como coagulopatia/síndrome de HELLP (*haemolysis, elevated liver enzymes and low platelets syndrome*), afetando cerca de 10 a 20% das gestantes (MACHADO et al., 2013). Ainda é desconhecida a exata causa da HELLP, mas o principal problema causado por essa síndrome é a ativação geral da cascata de coagulação, levando ao consumo de plaquetas e a uma anemia hemolítica microangiopática (HLADUNEWICH et al., 2007). Além dessas complicações, as grávidas com essa patologia podem desenvolver edema pulmonar (2-5%), insuficiência renal (1-5%), descolamento prematuro da placenta (1-4%), além de outras complicações (MACHADO et al., 2013). Contudo, as complicações mais frequentes no recém nascido de gestantes com pré-eclâmpsia são redução do líquido amniótico, restrição de crescimento intra-uterino, prematuridade, sofrimento fetal agudo, além de possuírem um maior risco de desenvolver paralisia cerebral e displasia broncopulmonar, sendo causadas devido a prematuridade e a restrição do crescimento (MACHADO et al., 2013; MOL et al., 2015).

Atualmente, mesmo com muitos estudos, ainda não foi identificado nenhum marcador biológico para a realização de um diagnóstico precoce da pré-eclâmpsia e nenhuma causa específica foi identificada, apenas algumas relações com genes envolvidos na inflamação, sistema renina-angiotensina, trombofilia e estresse oxidativo (MOL et al., 2015). No entanto, existem alguns fatores de risco para o desenvolvimento da patologia, como por exemplo,

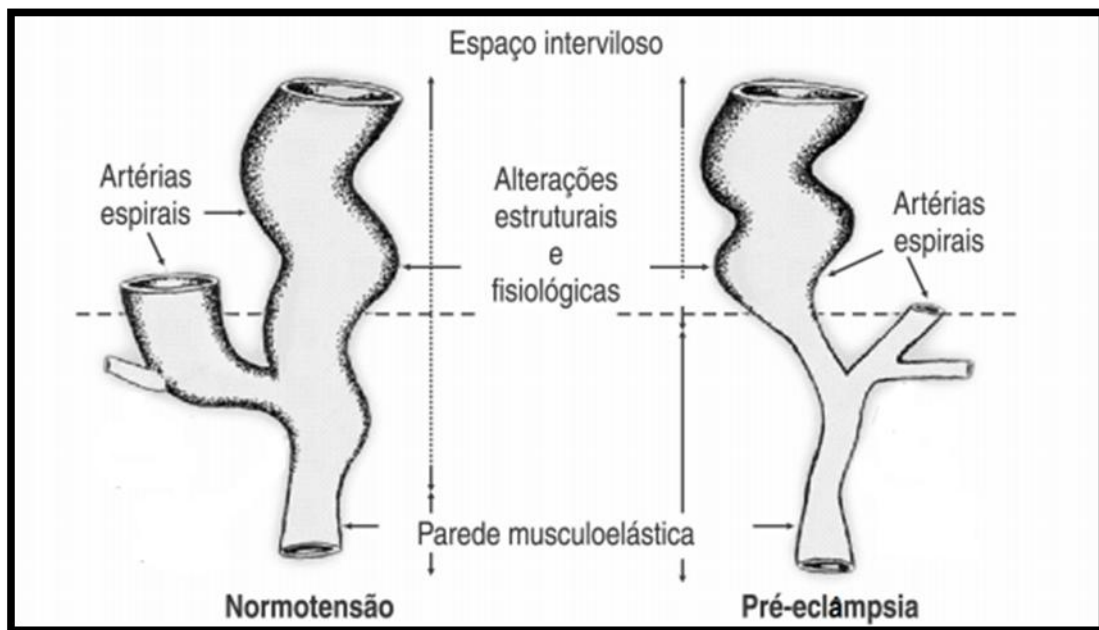
nuliparidade, primigestação, índice de massa corpórea (IMC) elevado antes da gestação, idade materna  $<20$  ou  $\geq 40$  anos, história familiar da doença, pré-eclâmpsia em gestação prévia, gestação gemelar, diabetes pré-existente, doença renal, trombofilia, entre outros (NORIS et al., 2005; HUTCHEON et al., 2011).

A principal responsável pelo fornecimento de nutrientes e oxigênio para o feto é a placenta e a placentação começa entre a 8ª e a 18ª semana de gestação. Em uma gestação normal, é nessa fase que uma camada de células trofoblásticas invade a parede uterina, para ocorrer a modificação da estrutura das artérias espiraladas da gestante (Figura 10). A camada muscular das artérias espiraladas é substituída por uma camada fibróide através das células trofoblásticas, ocorrendo um aumento no diâmetro do vaso e uma diminuição na resistência vascular, permitindo assim, uma adequada perfusão sanguínea ao feto (PIJNENBORG et al., 1983). Assim, a invasão trofoblástica, altera a hemodinâmica uterina que era um sistema de baixo fluxo com alta resistência para um sistema de alto fluxo e baixa resistência, sendo que alterações nesse sistema podem ocasionar complicações como o crescimento intra-uterino restrito e pré-eclâmpsia (WILSON et al., 2003).

A pré-eclâmpsia pode ser dividida em duas fases, a assintomática na primeira fase, que é caracterizada pelo crescimento placentário anormal durante o primeiro trimestre da gestação, produzindo uma grande quantidade de materiais placentários na circulação materna (REYNA et al., 2009). Sendo que a segunda fase da pré-eclâmpsia ocorre devido à circulação desses fatores, a qual passa a ser sintomática sendo caracterizada pelo aparecimento da hipertensão (CARTY et al., 2010; SIBAI et al., 2005). A hipertensão acontece porque há uma falha na segunda onda de invasão trofoblástica entre a 16ª e 20ª semana de gestação, levando a preservação da camada muscular das arteríolas criando um fluxo sanguíneo de alta resistência (LYALL, 2003). Devido ao aporte de oxigênio estar comprometido ocorre a hipoxia útero-placentária, associada a isquemia, não havendo irrigação adequada no espaço intervilosos. Assim, a oxigenação e a perfusão sanguínea dos vilos estão em quantidades diminuídas, podendo comprometer o endotélio vascular e o trofoblasto (MAYHEW; CHARNOCK-JONES; KAUFMANN, 2004). Essa isquemia resulta nas características clínicas da doença, hipertensão e proteinúria, porque promove a liberação de alguns fatores, ativando cascatas de eventos moleculares e celulares na circulação da gestante (AMASH et al., 2007).



Figura 10 – Alterações das arteríolas espirais uterinas na gravidez normal e na pré-eclâmpsia

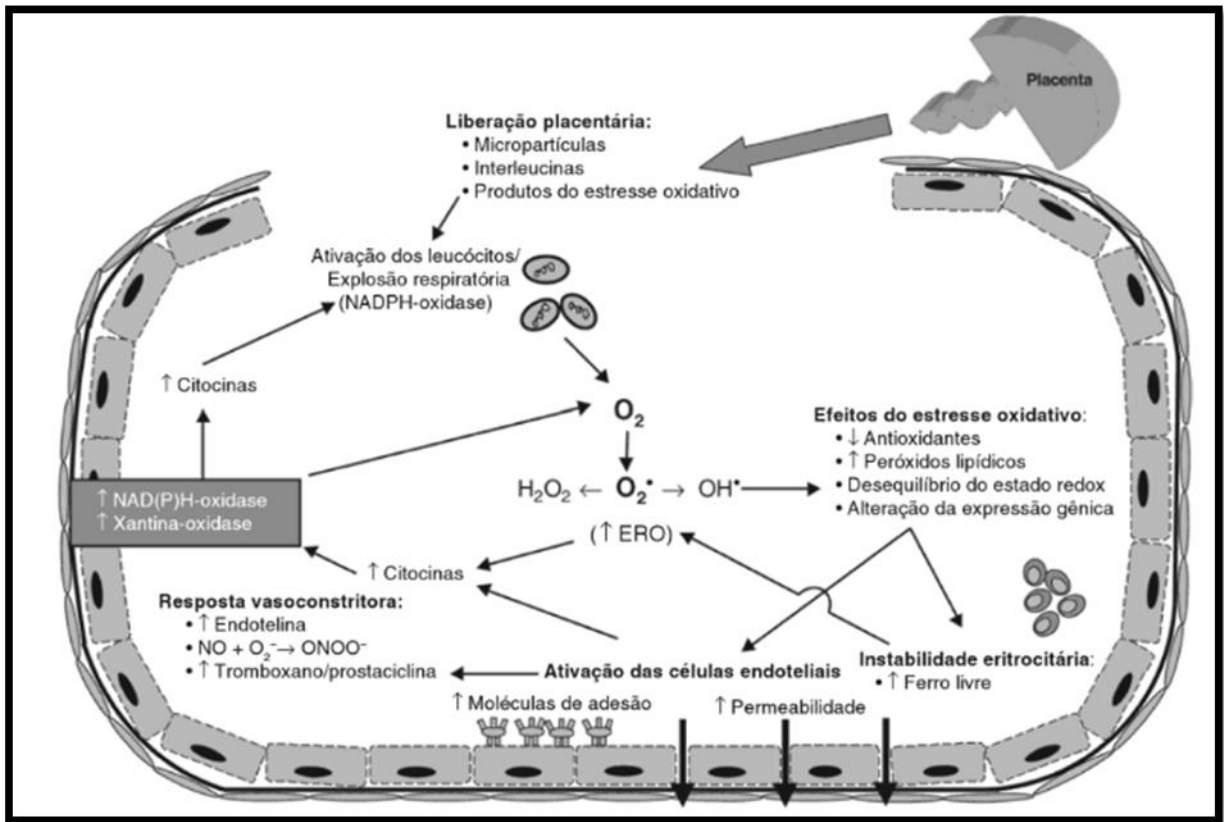


Fonte: Adaptado de BORTOLOTTI; BORTOLOTTI; ZUGAIB, 2008

Além do mais, devido a hipóxia ocorre uma perfusão sanguínea inadequada levando a áreas de isquemia e reperfusão que aumentam o estresse oxidativo através do aumento na promoção de EROs e provocam ativação de leucócitos, principalmente os neutrófilos. A ERO mais comum é o superóxido, sendo gerado nas células pela xantina oxidase, NADPH oxidase e enzimas presentes na mitocôndria responsáveis pela cadeia transportadora de elétrons. Outras enzimas que podem estar alteradas durante a pré-eclâmpsia são as enzimas antioxidantes que parecem estar diminuídas, entre elas a catalase, superóxido dismutase, glutatona redutase, glicose-6-fosfato-desidrogenase, glutatona S-transferase, entre outras, aumentando o estado de estresse oxidativo nessas gestantes (GITTO et al., 2002).

Rodrigo et al. (2005) demonstraram que neutrófilos isolados de mulheres com pré-eclâmpsia sintetizam mais superóxido que gestantes normais, sendo mediado pela NADPH oxidase. Além disso, alguns estudos sugerem que o estresse oxidativo aumentado nessa patologia é sistêmico, por ocorrer devido à liberação de citocinas pró-inflamatórias e micropartículas do sinciciotrofoblasto, além da disfunção endotelial gerada pelos peroxilípidios (HUNG et al., 2004; MATTHIESEN et al., 2005; ROBERTS; HUBEL, 1999; SCHMIDT et al., 2008; WALSH, 1998), estando diretamente relacionado a fisiopatologia da doença, por causar lesão endotelial (Figura 11) (REIN et al., 2003; TAKAGI et al., 2004).

Figura 11 – Consequências da produção de radicais livres na pré-eclâmpsia



Fonte: Adaptado de LYALL; BELFORT, 2009

Não existe cura para a pré-eclâmpsia durante a gestação (FARAG et al., 2004), assim, as gestantes com pressão arterial maior ou igual a 160 x 110 mmHg são tratadas com hipotensores para amenizar os sintomas, sendo a Hidralazina ou Nifedipina as drogas de primeira escolha. Quando há necessidade de manutenção se utiliza a Metildopa, enquanto que o Sulfato de Magnésio é utilizado para prevenir e tratar convulsões nas gestantes, podendo ser utilizado durante o trabalho de parto (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Sem um tratamento adequado a gestante pode evoluir para um estado convulsivo conhecido como eclâmpsia (NORIS et al., 2005). Por fim, a cura da pré-eclâmpsia somente ocorre após o nascimento com a retirada da placenta (FARAG et al., 2004).

## 1.2 PROPOSIÇÃO

### 1.2.1 Proposição Geral

Esse trabalho teve como objetivo verificar o perfil oxidativo, a atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D e possíveis efeitos da suplementação com ferro em gestantes saudáveis. Além disso, investigar uma possível relação entre o status oxidativo, com a avaliação da resposta antioxidante em gestantes com e sem pré-eclâmpsia, através da determinação de parâmetros de dano oxidativo.

### 1.2.2 Proposições Específicas

Em gestantes saudáveis com e sem suplementação com ferro e em gestantes com pré-eclâmpsia, objetiva-se:

- Avaliar a peroxidação lipídica através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- Avaliar os protetores de estresse oxidativo: a enzima catalase, a vitamina C e grupamentos tióis protéicos e não-proteicos;
- Avaliar a atividade da enzima sulfidrídica delta-aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -ALA-D), bem como seu índice de reativação;
- Avaliar os parâmetros hematológicos (hemograma completo) e bioquímicos (glicemia, ácido úrico, proteinúria);
- Avaliar as possíveis correlações entre as variáveis, através dos resultados obtidos.

### 1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um artigo e um manuscrito, os quais se encontram aqui organizados. O artigo encontra-se publicado na revista *International Journal of Environmental Research and Public Health*, enquanto o manuscrito foi submetido para a avaliação na revista *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios artigo e manuscrito.

**2 ARTIGO – Oxidative Profile and  $\delta$ -Aminolevulinate Dehydratase Activity in Healthy Pregnant Women with Iron Supplementation**

Artigo publicado na revista International Journal of Environmental Research and Public Health

Leidiane De Lucca, Fabiane Rodrigues, Letícia B. Jantsch, Walter S. Neme, Francisco M. P. Gallarreta and Thissiane L. Gonçalves



Article

# Oxidative Profile and $\delta$ -Aminolevulinate Dehydratase Activity in Healthy Pregnant Women with Iron Supplementation

Leidiane De Lucca <sup>1</sup>, Fabiane Rodrigues <sup>1</sup>, Leticia B. Jantsch <sup>1</sup>, Walter S. Neme <sup>2</sup>,  
Francisco M. P. Gallarreta <sup>2</sup> and Thissiane L. Gonçalves <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Clinical and Toxicology Analysis, Center of Healthy Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria 97105-900, Brazil; leidi\_lucca@hotmail.com (L.D.L.); fabianeufsm@gmail.com (F.R.); letii\_jantsch@hotmail.com (L.B.J.)
- <sup>2</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria 97105-900, Brazil; wsneme@yahoo.com.br (W.S.N.); fmgallarreta@msn.com (F.M.P.G.)
- \* Correspondence: thissianegoncalves@yahoo.com.br; Tel.: +55-55-3220-8749; Fax: +55-55-3220-8018

Academic Editor: Paul B. Tchounwou

Received: 29 March 2016; Accepted: 28 April 2016; Published: 3 May 2016

**Abstract:** An oxidative burst occurs during pregnancy due to the large consumption of oxygen in the tissues and an increase in metabolic demands in response to maternal physiological changes and fetal growth. This study aimed to determine the oxidative profile and activity of  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase ( $\delta$ -ALA-D) in pregnant women who received iron supplementation. Oxidative stress parameters were evaluated in 25 pregnant women with iron supplementation, 25 pregnant women without supplementation and 25 non-pregnant women. The following oxidative stress parameters were evaluated: thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), protein thiol groups (P-SH), non-protein thiol levels (NP-SH), vitamin C levels, catalase and  $\delta$ -ALA-D activity. Markers of oxidative stress and cell damage, such as TBARS in plasma were significantly higher in pregnant women without supplementation. Levels of P-SH, NP-SH and  $\delta$ -ALA-D activity were significantly lower in pregnant women without supplementation compared to non-pregnant and pregnant women with supplementation, while vitamin C levels were significantly lower in pregnant women without supplementation when compared to non-pregnant women. The increase in the generation of oxidative species and decrease of antioxidants suggest the loss of physiological oxidative balance during normal pregnancy, which was not observed in pregnant women with iron supplementation, suggesting a protective effect of iron against oxidative damage.

**Keywords:** iron; oxidative stress; antioxidant;  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase; pregnant women

## 1. Introduction

Pregnancy is a physiological challenge to be met by the mother and fetus, because of the high metabolic demand and increased amount of oxygen in tissues, such as the placenta [1]. This increase in the oxygen demands, even in a normal pregnancy, is associated with an increase in the generation of reactive oxygen species (ROS) and, consequently, the presence of oxidative stress [2], defined as loss of balance between pro-oxidants and antioxidants [3]. This imbalance can occur due to a number of factors, such as excessive production of free radicals, overloading the amount of available antioxidants, leading to lowered defense against the harmful effects of free radicals [4,5].

The maintenance of homeostasis to the physiological functions depends on the balance between the generation of free radicals and antioxidant status of the organism. The antioxidants react rapidly with free radicals to prevent the progression of auto-oxidation, detoxify the excess ROS and thereby maintaining the balance between oxidants and antioxidants [6]. These antioxidant mechanisms

include the enzymes catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase [7] and exogenous antioxidants as vitamin C and vitamin E [4]. The sulfhydryl delta-aminolevulinic acid dehydratase enzyme ( $\delta$ -ALA-D) is responsible for catalyzing the synthesis of tetrapyrrolic compounds, such as heme [8], which sulfhydryl groups in pro-oxidant conditions become susceptible to oxidation, leading to inhibition of enzyme. Inhibition of  $\delta$ -ALA-D mainly affects heme biosynthesis, resulting in the accumulation of the substrate, 5-aminolevulinic acid (ALA), which contributes directly to ROS production and oxidative stress overall charge [9].

Oxidative stress can influence the entire reproductive period of a woman's life and can play a significant role during pregnancy, normal childbirth and premature delivery [10]. During placental development, oxidative stress can reach excessive levels and is associated with various diseases during pregnancy [6].

Because of the high prevalence of iron deficiency during pregnancy [11] iron supplementation, especially in developing countries, is a fairly routine practice during gestation [12]. Maternal iron deficiency during pregnancy can compromise the development of the newborn brain and it may cause damage to physical and mental development [13]. In addition, Drevim *et al.* showed a worsening in oxidative stress related to iron deficiency in pregnant women [14].

In view of evidence highlighting increased oxidative stress during healthy pregnancies, the objective of the study was to verify the oxidative profile and the  $\delta$ -ALA-D enzyme activity in pregnant women taking iron supplementation compared with pregnant women who were not taking supplementation and non-pregnant women in order to establish an understanding of this adaptation of the woman's body to pregnancy and better understand the redox state of the reproductive phase of women.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Population

The study population consisted of healthy pregnant women receiving care at the basic health unit José Erasmo Crossetti in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, and healthy non-pregnant women from the Federal University of Santa Maria, with 25 healthy pregnant women who were on iron supplementation (PIS) at concentrations of 40–120 mg/day, according to medical guidance, 25 healthy pregnant women without supplementation (PWS), and 25 non-pregnant healthy women (NP).

Healthy pregnant women were in their third trimester of pregnancy were included in the experimental group, while in the non-pregnant group, healthy women in the same age group were included. Pregnant and non-pregnant women with chronic conditions such as smoking, drinking, asthma, hypertension, preeclampsia, diabetes mellitus, infectious diseases, thyroid disease, cancer or any other chronic condition or that used medication or supplementation, with the exception of iron, were excluded due to the possibility of bias in the results.

Blood collections from the pregnant women were conducted every Tuesday from July 2015 to January 2016 at the prenatal clinic of the health center. The samples of non-pregnant women were collected in the same period. Pregnant women taking iron supplementation were those who had altered hemoglobin levels below 11 g/dL in the early months of pregnancy.

All participants gave written informed consent to participate in this study. The study was approved by the Human Ethical Committee of the Federal University of Santa Maria, under protocol number 22771613.6.0000.5346 and was in accordance with the Declaration of Helsinki (2000) of the World Medical Association.

### 2.2. Sample Collection

Blood samples were collected by venipuncture, following fasting for 8 hours and the tests were processed immediately after blood collection. 16 mL were collected in vacuum tubes; 1 containing EDTA (4 mL) was used for a complete blood count and another containing sodium fluoride (4 mL) was used for the determination of glucose levels. Two tubes containing heparin anticoagulant (4 mL) were

used to obtain whole blood, plasma and erythrocytes. The plasma was separated by centrifugation at 3000 rpm for 10 min and then the erythrocytes were washed three times with 0.9% NaCl.

### 2.3. Hematological, Biochemical and Clinical Parameters

Hematological parameters were evaluated with a Sysmex XE 5000 automated cell counter. Fasting blood glucose was measured in plasma by a standard method with a commercial kit (Bioclin, Minas Gerais, Brasil). Clinical parameters were also evaluated, including blood pressure of the participants, which was measured using an aneroid sphygmomanometer. The body mass index (BMI) was calculated by dividing weight by squared height ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ).

### 2.4. Thiobarbituric Acid Reactive Substances

Lipid peroxidation in plasma was evaluated by measuring thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) according to the method of Lapenna *et al.* [15] using 1% phosphoric acid and 0.6% thiobarbituric acid. The reaction product was measured spectrophotometrically at 532 nm and the results were expressed in n mol TBARS/mL of plasma.

Lipid peroxidation in red cells was also assessed by measuring TBARS according to the method of Lapenna *et al.* [15] using 1.2% thiobarbituric acid. The reaction product was measured spectrophotometrically at 532 nm and the results were expressed in nmol TBARS/mL of erythrocytes.

### 2.5. Protein Thiol Groups

Protein thiols groups (P-SH) were quantified in plasma by the method of Boyne and Ellman [16] modified by Jacques Silva *et al.* [17], which consists of reducing 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) in 0.3 M phosphate buffer (pH 7.0) measured at 412 nm. The results were expressed as nmol of P-SH/mL plasma.

### 2.6. Non-Protein Thiol Groups

Erythrocyte non-protein thiols groups (NP-SH) were determined as described by Boyne and Ellman [16] and modified by Jacques Silva *et al.* [17]. The erythrocytes obtained after centrifugation of whole blood were hemolyzed with a 10% solution of triton for 10 min. Then, the protein fraction was precipitated with 20% trichloroacetic acid, followed by centrifugation. The colorimetric assay was performed in 1 M phosphate buffer (pH 7.4). The NP-SH levels were measured at 412 nm and expressed as nmol of NP-SH/mL erythrocytes.

### 2.7. Vitamin C

Vitamin C in plasma (VIT C) was evaluated as described by Galley *et al.* [18] with some modifications by Jacques-Silva *et al.* [17]. The precipitate was isolated fresh plasma with trichloroacetic acid solution 5%, followed by centrifugation. An aliquot of the supernatant was homogenized with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) and 13.3% trichloroacetic acid followed by incubation for 3 h at 37 °C. Then, 1 mL of sulfuric acid 65% was added to the medium and the orange-red compound was measured at 520 nm. The ascorbic acid content was calculated using a standard curve (1.5–4.5 mmol/L of ascorbic acid freshly prepared in sulfuric acid) and expressed as  $\mu\text{g}$  VIT C/mL plasma.

### 2.8. Activity of Catalase

Catalase activity was determined as described by Aebi *et al.* [19], based on  $\text{H}_2\text{O}_2$  decomposition, determined spectrophotometrically at 240 nm using  $\text{H}_2\text{O}_2$  as substrate, with results expressed in K/mg·Hb.



### 2.9. $\delta$ -ALA-D Activity and Reactivity Index

$\delta$ -ALA-D activity was determined in whole blood by the method of Berlin and Schaller [20], measuring the formation rate of porphobilinogen in 1 h at 37 °C. The enzyme reaction was started after 10 min pre-incubation of blood by the addition of  $\delta$ -ALA to a final concentration of 4 mM in a phosphate buffered solution. The reaction product was determined using a modified Ehrlich's reagent at 555 nm with a molar absorption coefficient of  $6.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  for Ehrlich-porphobilinogen salt. Results were expressed in U/L (PBG nmol/h/mg·Hb). In order to determine whether changes in  $\delta$ -ALA-D activity are related to the oxidation of thiol groups, a set of tubes was assayed using a similar incubation medium except that 2 mM of the reducing agent dithiothreitol (DTT) was added for the reactivation index. The reactivation index was estimated using:  $A-B/A \times 100$ , where A = absorbance assay with DTT and B = without DTT absorbance assay.

### 2.10. Statistical Analysis

Data analysis was performed using the software Graph Pad Prism v.5. (Harvey Motulsky, San Diego, CA, USA). Shapiro-Wilk test was used to test the distribution of samples. The One-Way analysis of variance (ANOVA) was used for comparison between groups with normally distributed variables and the data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). When there was a statistically significant difference, the analysis was complemented by the Tukey test. Non-parametric results were determined by Kruskal-Wallis test and represented as median (interquartile range). A  $p$  value  $< 0.05$  was considered statistically significant for all analyses.

## 3. Results

The clinical and demographic characteristics of the 75 pregnant and non-pregnant volunteer women who participated in this study are shown in Table 1.

Table 1. Clinical and demographic characteristics of pregnant and non-pregnant women.

Characteristics of Subjects	NP ( $n = 25$ )	PWS ( $n = 25$ )	PIS ( $n = 25$ )
Age (years)	26.50 (23.75–29.00)	26.00 (22.25–30.00)	23.00 (20.00–28.00)
Height (cm)	164.80 $\pm$ 6.08	161.90 $\pm$ 5.48	160.70 $\pm$ 6.50
Weight (kg)	60.00 (56.00–68.25)	78.00 (67.50–90.77) <sup>1</sup>	73.20 (66.10–87.48) <sup>1</sup>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.23 (21.17–24.86)	28.06 (26.87–34.55) <sup>1</sup>	28.70 (26.60–32.59) <sup>1</sup>
Gestational age (weeks)	-	32.94 $\pm$ 3.13	33.55 $\pm$ 2.85
Systolic pressure (mmHg)	110.00 (110.00–120.00)	110.00 (102.50–120.00)	110.00 (100.00–110.00)
Diastolic pressure (mmHg)	70.00 (60.00–80.00)	70.00 (70.00–77.50)	70.00 (60.00–70.00)

Parametric results were determined by ANOVA followed by Tukey test and represented as mean  $\pm$  standard deviation and non-parametric results were determined by Kruskal-Wallis and represented as median (interquartile range). <sup>1</sup>  $p < 0.05$  when compared with the group of non-pregnant women; NP: non-pregnant women; PWS: pregnant women without supplementation with iron; PIS: pregnant women with iron supplementation.

There were no significant differences between groups in terms of age, height, gestational age, systolic pressure and diastolic pressure. However, as expected, there was a significant difference in weight and BMI between the group of non-pregnant women and the group of pregnant women with and without iron supplementation.

Hematological and biochemical parameters were analyzed, though some were not statistically significant between the groups of pregnant and non-pregnant women. However, other parameters were statistically significant between the groups as shown in Table 2.

With regard to hematological parameters, there was a significant decrease in erythrocytes, hematocrit and hemoglobin in the two groups of pregnant women when compared to the group of non-pregnant women, as can be seen in Table 2. On the other hand, there was no significant difference between the groups for glucose values and platelets.

**Table 2.** Hematological and biochemical parameters of pregnant and non-pregnant women.

Parameter	NP ( <i>n</i> = 25)	PWS ( <i>n</i> = 25)	PIS ( <i>n</i> = 25)
Erythrocytes (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	4.66 ± 0.31	3.91 ± 0.24 <sup>1</sup>	4.13 ± 0.30 <sup>1</sup>
Hematocrit (%)	40.85 (38.60–43.55)	35.00 (33.93–36.90) <sup>1</sup>	36.40 (35.20–38.15) <sup>1</sup>
Hemoglobin (g/dL)	13.25 (12.60–14.07)	11.60 (11.23–12.25) <sup>1</sup>	11.90 (11.43–13.20) <sup>1</sup>
Platelets (MIL/mm <sup>3</sup> )	248.50 (215.50–282.80)	239.00 (191.50–263.80)	218.00 (203.00–241.00)
Glucose (mg/dL)	77.88 ± 5.43	74.38 ± 6.60	75.90 ± 6.93

Parametric results were determined by ANOVA followed by Tukey test and represented as mean ± standard deviation and non-parametric results were determined by Kruskal-Wallis and represented as median (interquartile range). <sup>1</sup> *p* < 0.05 when compared with the group of non-pregnant women; NP: non-pregnant women; PWS: pregnant women without supplementation with iron; PIS: pregnant women with iron supplementation

With respect to oxidative stress markers, shown in Table 3, the TBARS levels in plasma were significantly higher in pregnant women without supplementation, whereas P-SH and NP-SH were significantly lower in pregnant women without supplementation when compared to pregnant women with iron supplementation and non-pregnant women, while vitamin C levels were significantly lower in pregnant women without supplementation when compared to non-pregnant women. TBARS in erythrocytes and catalase were not significantly different between pregnant and non-pregnant women.

**Table 3.** Oxidative stress markers in pregnant and non-pregnant women.

Parameter	NP ( <i>n</i> = 25)	PWS ( <i>n</i> = 25)	PIS ( <i>n</i> = 25)
TBARS plasma (nmol/mL)	3.45 ± 1.39	4.86 ± 1.47 <sup>1,2</sup>	3.59 ± 1.37
TBARS erythrocytes (nmol/mL)	13.37 ± 4.86	14.13 ± 4.96	15.71 ± 4.96
P-SH (nmol P-SH/mL)	149.60 ± 14.40	128.90 ± 22.34 <sup>1,2</sup>	150.10 ± 20.66
NP-SH (nmol NP-SH/mL)	927.90 ± 163.40	694.90 ± 150.40 <sup>1,2</sup>	829.50 ± 155.90
VITAMIN C (µgvit C/mL)	18.94 ± 5.69	14.30 ± 5.87 <sup>1</sup>	14.83 ± 6.18
CATALASE (K/mg·Hb)	49.32 ± 7.65	48.04 ± 8.04	53.85 ± 9.01

Data expressed as mean ± standard deviation. The statistically significant differences were determined by ANOVA followed by Tukey test. <sup>1</sup> *p* < 0.05 for comparisons with the group of non-pregnant women; <sup>2</sup> *p* < 0.05 when comparing with the group of pregnant women with iron supplementation; NP: non-pregnant women; PWS: pregnant women without supplementation with iron; PIS: pregnant women with iron supplementation. TBARS: thiobarbituric acid reactive substances, P-SH: thiol groups of proteins in the plasma, NP-SH: non-protein thiol groups in erythrocytes.

δ-ALA-D activity in the blood was significantly lower in pregnant women without supplementation when compared to non-pregnant women and pregnant women with supplementation, and the same was observed in the presence of DTT (Table 4). In addition, the enzyme reactivation index was higher in pregnant women without supplementation when compared to non-pregnant and pregnant women with supplementation (Table 4).

**Table 4.** Delta-aminolevulinate dehydratase activity and Reactivation Index in pregnant and non-pregnant women.

Parameter	NP ( <i>n</i> = 25)	PWS ( <i>n</i> = 25)	PIS ( <i>n</i> = 25)
δ-ALA-D (U/L)	56.67 (46.66–68.73)	41.18 (26.36–45.73) <sup>1,2</sup>	47.67 (65.67–39.21)
δ-ALA-D + DTT (U/L)	73.70 (63.91–86.27)	53.54 (41.05–61.70) <sup>1,2</sup>	65.34 (59.98–84.04)
Reactivation Index (%)	16.10 (13.17–27.00)	31.84 (29.39–34.71) <sup>1,2</sup>	24.30 (21.50–29.30)

Data expressed as median (interquartile range). Statistically significant differences were determined by Kruskal-Wallis. <sup>1</sup> *p* < 0.05 when compared with the group of non-pregnant women; <sup>2</sup> *p* < 0.05 when compared with the group of pregnant women with iron supplementation; NP: non-pregnant women; PWS: pregnant women without supplementation with iron; PIS: pregnant women with iron supplementation; δ-ALA-D: delta-aminolevulinate dehydratase; DTT: dithiothreitol.

#### 4. Discussion

In normal pregnancy there are physiological and anatomical adjustments that cause changes in the mother's body, such as changes in hormones and in humoral and figurative elements of blood [21]. Usually there is a physiological anemia with decreased hemoglobin, due to increased plasma volume in relation to erythrocyte volume, resulting in a physiological blood dilution. During pregnancy, hematocrit usually ranges from 32% to 34% compared to non-pregnant women, and the transition from iron to the fetus may further aggravate this anemia. Due to platelet aggregation, the amount of platelets may be lower during pregnancy, even while it may remain within the reference values [22]. Hematological data of the volunteers in this study corroborate those from the literature, as shown in Table 2.

Some studies suggest that contact of cell membranes with ROS can lead to lipid peroxidation, promoting cell damage due to changes in the physical properties and structural organization of membrane components, resulting in loss of ion exchange selectivity, release of organelle content, such as lysosomal hydrolytic enzymes, and production of cytotoxic products, including malondialdehyde [23–25]. During normal pregnancy, lipid peroxidation is higher when compared with non-pregnancy in healthy women [26], which was confirmed in our study by increased levels of TBARS in plasma (Table 3), suggesting an increase of lipid membrane damage in pregnant women without supplementation when compared to non-pregnant women.

The thiol functional group (-SH) present in biomolecules performs a significant role in various physiological functions and pathological conditions by reducing properties, chelation of protein and protecting against oxidative stress, being susceptible to oxidative damage [27,28]. This study showed a decrease of thiol groups in plasma and erythrocytes of pregnant women without supplementation (Table 3) which may indicate lowered defense against oxidative damage.

Vitamin C was significantly lower in the pregnant women without supplementation when compared to non-pregnant women (Table 3). This result is consistent with data from other studies suggesting that in pregnant women, ascorbate may be used to compensate for the disturbance in cells mediated by free radicals to maintain normal homeostasis during pregnancy [29,30].

The  $\delta$ -ALA-D enzyme is the second enzyme in the heme biosynthetic pathway used to maintain the hemoglobin content of erythrocytes [31]. Its inhibition leads to the accumulation of ALA in the blood, which is related to the overproduction of ROS [32]. ALA undergoes autoxidation at physiological pH resulting in the formation of  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  and ALA free radicals [33], causing oxidative DNA damage, lipid peroxidation and depletion of the cellular antioxidant defense system [34]. The reduction of  $\delta$ -ALA-D activity observed in pregnant women without supplementation in the present study (Table 4) suggests that inhibition of this enzyme may contribute to the overall levels of ROS in these pregnant women which is in accordance with the study by Ademuyiwa *et al.* [35], who found similar results, which may also be related to lower hemoglobin and hematocrit values. Furthermore, studies have shown that this enzyme protein is a marker of oxidative stress situations [9,36].

The analysis of *in vitro* activity of  $\delta$ -ALA-D was performed by incubation with dithiothreitol, which is a reducing agent used both to reverse and to prevent oxidation of thiol groups (-SH) of the enzyme [37]. An index of greater enzymatic reactivation was observed in pregnant women without supplementation when compared to non-pregnant women and pregnant women with supplementation (Table 4), showing a possible involvement of the groups (SH), through partial restoration of  $\delta$ -ALA-D activity in the presence of DTT. The portion that was not restored may be related to the oxidation of other groupings or even due to a decrease in its biosynthesis.

Iron deficiency during pregnancy mainly occurs due to inadequate dietary intake in this period where there is a greater need for this nutrient [38]. Despite the wide use of iron supplementation during pregnancy due to the high incidence of iron deficiency anemia, few studies have evaluated the effect of supplementation to the mother and the neonate, however, its use has been shown to improve hematological indices as noted in the study of Lunardi-Maia *et al.* [11].

Iron, used in low doses, is an essential mineral for cellular homeostasis and a cofactor in numerous biological reactions due to its ability to donate and receive electrons. In addition, it participates in

the formation of several proteins and is essential for the formation of heme. When in the form of hemeprotein, it is essential for transporting oxygen, detoxification and energy generation [39]. Mitochondria are critical for iron metabolism because they are where the biosynthesis of Fe-S clusters and heme biosynthesis occur. Iron intake in the mitochondria is not yet fully understood. Frataxin, a protein which is located in the matrix and in the inner mitochondrial membrane, regulates iron utilization after being transported through the mitochondrial membrane, allocating it to the genesis of Fe-S clusters or to the synthesis of heme. By forming a complex with iron, frataxin prevents the formation of free radicals in the mitochondrion [40].

Iron supplementation during pregnancy is a conflicting subject in the literature. Some studies have shown that iron, in excess, can lead to increased oxidative stress [41,42], harming the metabolism of pregnant women and leading to complications, such as preeclampsia [43] and Gestational Diabetes Mellitus [44]. In contrast, other studies have suggested that iron is one of the most important micronutrients able to trap free radicals [45]. Iron supplementation can improve the hematological system, helping to normalize hematocrit and hemoglobin and to reduce the state of oxidative stress in anemic pregnant women. Considering the decline of some oxidative stress parameters caused due to anemia [46,47], it is a mineral which may act indirectly as a non-enzymatic antioxidant and thus an important cofactor of antioxidant enzymes [48]. This was confirmed in this study, where there was an improvement in the state of oxidative stress in pregnant women receiving supplementation with iron as shown in Table 3, through the reduction in plasma TBARS levels, along with increased levels of antioxidants such as thiol groups both in plasma and in the erythrocytes and an increase in  $\delta$ -ALA-D activity.

## 5. Conclusions

The loss of normal physiological balance between generation of oxidative species and antioxidant capacity in the maternal organism during pregnancy, observed by increased oxidative substances, by falling antioxidant levels and inhibition of  $\delta$ -ALA-D enzyme activity, suggests an increased oxidative profile in pregnant women who do not use iron supplementation when compared with pregnant women who are using supplementation and non-pregnant women. Iron supplementation may promote a protective effect against oxidative damage produced during pregnancy. However, other studies involving a larger number of patients are needed to confirm these findings.

**Acknowledgments:** The authors thank Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE), Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) and the Federal University of Santa Maria (UFSM), Rio Grande do Sul, Brazil, for support in this study. Also, we thank all the volunteers who participated in this study.

**Author Contributions:** Leidiane De Lucca, Fabiane Rodrigues, Letícia B. Jantsch and Thissiane L. Gonçalves performed the experiments; Leidiane De Lucca, Walter S. Neme, Francisco M. P. Gallarreta and Thissiane L. Gonçalves analyzed the data; Walter S. Neme, Francisco M. P. Gallarreta and Thissiane L. Gonçalves contributed reagents/materials/analysis tools, Fabiane Rodrigues collected samples, Leidiane De Lucca, Fabiane Rodrigues, Letícia B. Jantsch and Thissiane L. Gonçalves wrote the paper.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

ALA	5-aminolevulinic acid
BMI	body mass index
DTT	dithiothreitol
NP	non-pregnant women
NP-SH	non-protein thiol groups
PIS	pregnant women who were on iron supplementation

P-SH	Protein thiol groups
PWS	pregnant women without supplementation
ROS	reactive oxygen species
SD	standard deviation
TBARS	thiobarbituric acid reactive substances
VIT C	vitamin C
δ-ALA-D	delta-aminolevulinate dehydratase

## References

1. Aversa, S.; Pellegrino, S.; Barberi, I.; Reiter, R.J.; Gitto, E. Potential utility of melatonin as an antioxidant during pregnancy and in the perinatal period. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* **2012**, *25*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Gitto, E.; Pellegrino, S.; Gitto, P.; Barberi, I.; Reiter, R.J. Oxidative stress of the newborn in the pre-and postnatal period and the clinical utility of melatonin. *J. Pineal Res.* **2009**, *46*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Al-Gubory, K.H.; Fowler, P.A.; Garrel, C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2010**, *42*, 1634–1650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Burton, G.J.; Jauniaux, E. Oxidative stress. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2011**, *25*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Balsano, C.; Alisi, A. Antioxidant effects of natural bioactive compounds. *Curr. Pharm. Des.* **2009**, *15*. [[CrossRef](#)]
6. Agarwal, A.; Aponte-Mellado, A.; Premkumar, B.J.; Shaman, A.; Gupta, S. The effects of oxidative stress on female reproduction: A review. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2012**, *10*, 49–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. *Reactive Species Can Be Poisonous, in Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed.; Oxford University Press: Oxford, UK, 2007.
8. Valentini, J.; Grotto, D.; Paniz, C.; Roehrs, M.; Burg, G.; Garcia, S.C. The influence of the hemodialysis treatment time under oxidative stress biomarkers in chronic renal failure patients. *Biomed. Pharmacother.* **2008**, *62*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Rocha, J.B.T.; Saraiva, R.A.; Garcia, S.C.; Gravina, F.S.; Nogueira, C.W. Aminolevulinate dehydratase (d-ALA-D) as marker protein of intoxication with metals and other pro-oxidant situations. *Toxicol. Res.* **2012**, *1*. [[CrossRef](#)]
10. Agarwal, A.; Gupta, S.; Sharma, R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2005**, *3*, 28–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Lunardi-Maia, T.; Schuelter-Trevisol, F.; Galato, D. Medication use during the first trimester of pregnancy: Drug safety and adoption of folic acid and ferrous sulphate. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* **2014**, *36*, 541–547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Leal, C.A.; Schetinger, M.R.; Leal, D.B.; Morsch, V.M.; da Silva, A.S.; Rezer, J.F.; de Baires, A.V.; Jaques, J.A. Oxidative stress and antioxidant defences in pregnant women. *Redox Rep.* **2011**, *16*, 230–236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Silva, L.S.V.; Thiapó, A.P.; Souza, G.G.; Saunders, C.; Ramalho, A. Micronutrients in pregnancy and lactation. *Rev. Bras. Saude Matern. Infant.* **2007**, *7*, 237–244.
14. Devrim, E.; Tarhan, I.; Ergüder, I.B.; Durak, I. Oxidant/antioxidant status of placenta, blood, and cord blood samples from pregnant women supplemented with iron. *J. Soc. Gynecol. Investig.* **2006**, *13*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Lapenna, D.; Ciofani, G.; Pierdomenico, S.D.; Giamberardino, M.A.; Cuccurullo, F. Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid peroxides in human plasma. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *31*, 331–335. [[CrossRef](#)]
16. Boyne, A.F.; Ellman, G.L. A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. *Anal. Biochem.* **1972**, *46*, 639–653. [[CrossRef](#)]
17. Jacques-Silva, M.C.; Nogueira, C.W.; Broch, L.C.; Flores, E.M.; Rocha, J.B. Diphenyl diselenides and ascorbic acid changes deposition of selenium and brain of mice. *Pharmacol. Toxicol.* **2001**, *88*, 119–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Galley, H.; Davies, M.J.; Webster, N.R. Ascorbil radical formation in patients with sepsis: Effects of ascorbate loading. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20*, 139–143. [[CrossRef](#)]
19. Aebi, H. Catalase *in vitro*. *Meth. Enzymol.* **1984**, *105*, 121–126. [[PubMed](#)]
20. Berlin, K.; Schaller, H. European standardized method for the determination of δ-aminolevulinic dehydratase activity in blood. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* **1974**, *12*, 389–390. [[PubMed](#)]

21. Souza, A.I.; Filho, M.B.; Ferreira, L.O.C. Hematological changes and pregnancy. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **2002**, *24*. [CrossRef]
22. Hill, C.; Pickinpaugh, J. Physiologic changes in pregnancy. *Surg. Clin. N. Am.* **2008**, *88*, 391–401. [CrossRef] [PubMed]
23. Cavalcante, A.G.M.; Bruin, P.F.C. The role of oxidative stress in COPD: Current concepts and perspectives. *J. Bras. Pneumol.* **2009**, *35*, 1227–1237. [PubMed]
24. Jacob, R.F.; Mason, R.P. Lipid peroxidation induces cholesterol domain formation in model membranes. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*. [CrossRef] [PubMed]
25. Lima, E.S.; Abdalla, D.S.P. Lipid peroxidation: Mechanisms and evaluation in biological samples. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **2001**, *37*, 293–303.
26. Chamy, V.M.; Lepe, J.; Catalán, A.; Retamal, D.; Escobar, J.A.; Madrid, E.M. Oxidative stress is closely related to clinical severity of pre-eclampsia. *Biol. Res.* **2006**, *39*. [CrossRef]
27. Hu, M.L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol.* **1994**, *233*. [CrossRef]
28. Yang, Y.; Guan, X. Rapid and thiol-specific high-throughput assay for simultaneous relative quantification of total thiols, protein thiols, and non-protein thiols in cells. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 649–655. [CrossRef] [PubMed]
29. Suhail, M.; Patil, S.; Khan, S.; Siddiqui, S. Antioxidant vitamins and lipoperoxidation in non-pregnant, pregnant, and gestational diabetic women: Erythrocytes osmotic fragility profiles. *J. Clin. Med. Res.* **2010**, *2*, 266–273. [CrossRef] [PubMed]
30. Hassan, G.I.; Onu, A.B. Total serum vitamin C concentration in pregnant women: Implications for a healthy pregnancy. *Rev. Bras. Saude Matern. Infant.* **2006**, *6*, 293–296. [CrossRef]
31. Bloom, J.C.; Brandt, J.T. Toxic responses of the blood. In *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 6th ed.; Klaassen, C.D., Ed.; McGrawHill: New York, NY, USA, 2001; pp. 405–408.
32. Ahamed, M.; Siddiqui, M.K.J. Environmental lead toxicity and nutritional factors. *Clin. Nutr.* **2007**, *26*, 400–408. [CrossRef] [PubMed]
33. Costa, C.A.; Trivelato, G.C.; Pinto, A.M.; Bechara, E.J. Correlation between plasma 5-aminolevulinic acid concentrations and indicators of oxidative stress in lead-exposed workers. *Clin. Chem.* **1997**, *43*, 1196–1202. [PubMed]
34. Gurer, H.; Ercal, N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *29*, 927–945. [CrossRef]
35. Ademuyiwa, O.; Odusoga, O.L.; Adebawo, O.O.; Ugbaja, R. Endogenous antioxidant defences in plasma and erythrocytes of pregnant women during different trimesters of pregnancy. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **2007**, *86*, 1175–1182. [CrossRef] [PubMed]
36. Sauer, E.; Moro, A.M.; Brucker, N.; Nascimento, S.; Gauer, B.; Fracasso, R.; Gioda, A.; Beck, R.; Moreira, J.C.F.; Eifler-Lima, V.L.; et al. Liver  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity is inhibited by neonicotinoids and restored by antioxidant agents. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2014**, *11*, 11676–11690. [CrossRef] [PubMed]
37. Gabriel, D.; Pivetta, L.; Folmer, V.; Soares, J.C.; Augusti, G.R.; Nogueira, C.W.; Zeni, G.; Rocha, J.B. Human erythrocyte  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase inhibition by monosaccharides is not mediated by oxidation of enzyme sulfhydryl groups. *Cell Biol. Int.* **2005**, *29*, 669–674. [CrossRef] [PubMed]
38. Ministry of Health. Attention to Prenatal Low Risk. Available online: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cadernos\\_atencao\\_basica\\_32\\_prenatal.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cadernos_atencao_basica_32_prenatal.pdf) (accessed on 10 January 2016).
39. Abbaspour, N.; Hurrell, R.; Kelishadi, R. Review on iron and its importance for human health. *J. Res. Med. Sci.* **2014**, *19*, 164–174. [PubMed]
40. Grotto, H.Z.W. Iron physiology and metabolism. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **2010**, *32*, 8–17. [CrossRef]
41. Casanueva, E.; Viteri, F.E. Iron and oxidative stress in pregnancy. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 1700S–1708S. [PubMed]
42. Lachili, B.; Hininger, I.; Faure, H.; Arnaud, J.; Richard, M.J.; Favier, A.; Roussel, A.M. Increased lipid peroxidation in pregnant women after iron and Vitamin C supplementation. *Biol. Trace Elem. Res.* **2001**, *38*, 103–110. [CrossRef]
43. Young, B.C.; Levine, R.J.; Karumanchi, S.A. Pathogenesis of preeclampsia. *Annu. Rev. Pathol.* **2010**, *5*, 173–192. [CrossRef] [PubMed]
44. Garcia, A.C.; Roschel, H.; Ramos, S.; Benatti, F.B. Iron supplementation and its association with the incidence of gestational diabetes mellitus. *J. Braz. Soc. Food Nutr.* **2012**, *37*, 215–226.

45. Barreiros, A.L.B.S.; David, J.M. Oxidative stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Quim. Nova* **2006**, *29*, 113–123. [[CrossRef](#)]
46. Han, X.X.; Sun, Y.Y.; Ma, A.G.; Yang, F.; Zhang, F.Z.; Jiang, D.C.; Li, Y. NaFeEDTA, iron and oxidative stress in pregnancy. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **2011**, *20*, 514–520. [[PubMed](#)]
47. Kurtoglu, E.; Ugur, A.; Baltaci, A.K.; Undar, L. Effect of iron supplementation on oxidative stress and antioxidant status in iron-deficiency anemia. *Biol. Trace Elem. Res.* **2003**, *96*, 117–123. [[CrossRef](#)]
48. Papas, A.M. Diet and antioxidant status. *Food Chem. Toxicol.* **1999**, *37*, 999–1007. [[CrossRef](#)]



© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**3 MANUSCRITO - Delta-aminolevulinate dehydratase activity and oxidative stress markers in preeclampsia**

Manuscrito submetido para publicação na revista Biomedicine and Pharmacotherapy

Leidiane de Lucca, Fabiane Rodrigues, Letícia B. Jantsch, Helena Kober, Walter S. Neme,  
Francisco M. P. Gallarreta, Thissiane L. Gonçalves.



## **Delta-aminolevulinatase dehydratase activity and oxidative stress markers in preeclampsia**

Leidiane de Lucca<sup>1</sup>, Fabiane Rodrigues<sup>1</sup>, Letícia B. Jantsch<sup>2</sup>, Helena Kober<sup>2</sup>, Walter S. Neme<sup>3</sup>, Francisco M. P. Gallarreta<sup>3</sup>, Thissiane L. Gonçalves<sup>1</sup>.

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

<sup>2</sup>Department of Clinical and Toxicological Analysis, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, 97105-900, Brazil

<sup>3</sup>Departament of Obstetrics and Gynecology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, 97105-900 Brazil

Corresponding author: Thissiane de Lima Gonçalves, Av. Roraima, nº 1000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria-RS-Brasil. CEP: 97105-900, Prédio 26 – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Fax: +55 55 3220 8018, Phone: +55 55 32208749. Email: thissianegoncalves@yahoo.com.br

**Abstract:** Preeclampsia is an important pregnancy-specific multisystem disorder characterized by the onset of hypertension and proteinuria. It is of unknown etiology and involves serious risks for the pregnant women and fetus. One of the main factors involved in the pathophysiology of preeclampsia is oxidative stress, where excess free radicals produce harmful effects, including damage to macromolecules such as lipids, proteins and DNA. In addition, the sulfhydryl delta-aminolevulinatase enzyme ( $\delta$ -ALA-D) that is part of the heme biosynthetic pathway in pro-oxidant conditions can be inhibited, which may result in the accumulation of 5-aminolevulinic acid (ALA), associated with the overproduction of free radicals, suggesting it to be an indirect marker of oxidative stress. As hypertensive pregnancy complications are a major cause of morbidity and mortality maternal and fetal where oxidative stress appears to be an important factor involved in preeclampsia, the aim of this study was to evaluate the activity of  $\delta$ -ALA-D and classic oxidative stress markers in the blood of pregnant women with mild and severe preeclampsia. The analysis and quantification of the following oxidative stress markers were performed: thiobarbituric acid-reactive species (TBARS); presence of protein and non-protein thiol group; quantification of vitamin C; Catalase and  $\delta$ -ALA-D activities in samples of blood of pregnant women with mild preeclampsia (n=25), with severe preeclampsia (n=30) and in a control group of healthy pregnant women (n=30). TBARS was significantly higher in women with preeclampsia, while the presence of thiol groups, levels of vitamin C, catalase and  $\delta$ -ALA-D activity were significantly lower in groups of pregnant women with preeclampsia compared with healthy

women. In addition, the results showed no significant difference between groups of pregnant women with mild and severe preeclampsia. The data suggest a state of increased oxidative stress in pregnant women with preeclampsia compared to healthy pregnant women, which may be related to the complications of this disease.

**Keywords:** delta-aminolevulinate dehydratase, oxidative stress, pregnant women, preeclampsia

The following abbreviations are used in this manuscript: ALA: 5-aminolevulinic acid; BMI: body mass index; C: control group; DTT: dithiothreitol; FR: Free radicals; MPE: mild preeclampsia; NP: non-pregnant women; NP-SH: non-protein thiol groups; P-SH: Protein thiol groups; ROS: reactive oxygen species; SD: standard deviation; SPE: severe preeclampsia; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; VIT C: vitamin C;  $\delta$ -ALA-D: delta-aminolevulinate dehydratase

## 1. Introduction

Preeclampsia is a specific clinical condition of pregnancy, characterized by the onset of hypertension and proteinuria (> 300 mg/day) after 20 weeks of gestation [1]. It is a multisystem pathology whose etiology is little known and a leading cause of maternal fetal and neonatal morbidity and mortality, affecting 3-5% of pregnancies mainly in low and middle income countries [1–3]. The most frequent maternal complications of this syndrome are hemolysis, elevated liver enzymes and low platelet count, known as coagulopathy/HELLP syndrome, affecting about 10-20% of pregnant women. Other complications include pulmonary edema (2-5%), kidney failure (1-5%) and abruptio placentae (1-4%) [4,5]. Children born to women with preeclampsia have a higher risk of developing bronchopulmonary dysplasia and cerebral palsy related to premature birth and fetal growth restriction [1].

Oxidative stress is characterized by an imbalance of the endogenous antioxidant status and free radical generation, related to the physiopathology of some diseases [6,7]. Free radicals (FR) are atoms, ions or molecules with an unpaired electron, characterized by high instability and great reactivity, where the unpaired electron can easily connect with others, behaving as an oxidizer or reducer [8]. The problem created by this kind of reaction is that the products formed are also radicals, most of which are able to propagate the reaction, leading to extensive damage [9]. Furthermore, the FR have a high capacity to generate irreversible damage to important biomolecules in the body, such as DNA molecules, proteins and lipid membranes, due to their potential to induce biochemical changes [7,10].

Some studies have suggested that oxidative stress is one of the main factors involved in the etiology of preeclampsia [11,12] and can influence the entire pregnancy [13] by producing lipid peroxidation of cell membranes, contributing to endothelial dysfunction, which is one characteristic of the disease [14,15]. In preeclampsia, there is inadequate blood perfusion due to a failure in the trophoblast invasion, causing ischemia and reperfusion, generating an increase in the production of reactive oxygen species (ROS) [16]. Furthermore, placental tissue from women with preeclampsia showed an increased ability to form  $O_2^-$  [17]. Another parameter that has been associated with serious complications of preeclampsia, including perinatal death, is the accumulation of uric acid [18] which is considered a marker of oxidative stress in addition to being a marker of renal dysfunction and tissue damage [19].

In pro-oxidant situations, the enzyme  $\delta$ -ALA-D can be inhibited [20,21], as it is an enzyme containing sulfhydryl groups that are extremely sensitive to oxidizing agents [22]. This enzyme has a primary role in most aerobic organisms, because it participates in the biosynthesis of the heme group of hemoglobin [21]. The decrease in the activity of this enzyme is due to oxidation of the sulfhydryl groups, impairing biosynthesis of heme and leading to an accumulation of the substrate 5-aminolevulinic acid (ALA), thus contributing to an increase in the production of ROS [20,21,23]. In an attempt to remove these free radicals from the body, antioxidant enzymes such as catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, along with antioxidant compounds from the diet such as vitamin C and vitamin E, work together to transform these toxic oxygen molecules into harmless substances [13,24].

Free radicals are an important mechanism involved in tissue damage, playing a significant role in several diseases [7]. As hypertensive complications during pregnancy have become increasingly recurrent and are now considered a major public health problem and considering the scarcity of related studies, this study aims to evaluate the oxidative stress parameters mainly by evaluating  $\delta$ -ALA-D activity in pregnant women with mild and severe preeclampsia and to correlate its activity with other parameters of oxidative stress.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Population Study**

The study population consisted of 85 pregnant women, including 30 healthy pregnant women in the control group (C), 25 pregnant women with mild preeclampsia (MPE) and 30 pregnant women with severe preeclampsia (SPE), classified according to the severity criteria [25]. Prenatal care for the control group was provided at the basic health unit José Erasmo

Crossetti in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, where the blood samples were collected. The women from the two Preeclampsia groups received prenatal care at the University Hospital of Santa Maria, as they are at risk.

All pregnant women in the survey received medical care, were in their third trimester of pregnancy and were in the same age group. The study excluded pregnant women with chronic diseases, infectious diseases, cancer, thyroid dysfunction or any other disease, as well as smokers, drinkers or anyone using any kind of medication, except for pregnant women with preeclampsia who were using antihypertensives, such as hydralazine, methyldopa and nifedipine.

Voluntary pregnant women participating in the study signed a free and informed consent form and the study was approved by the Ethics Committee for Research on Human Beings of the Federal University of Santa Maria (22771613.6.0000.5346.)

## **2.2. Sample collection**

Blood samples were collected after 8 hours of fasting in vacuum tubes containing heparin, EDTA, sodium fluoride and one without anticoagulant. The whole blood plasma and erythrocytes were obtained from heparinized blood, where the plasma was separated by centrifugation at 3000 rpm and the erythrocytes were washed with 0.9% NaCl. All tests were processed immediately after collection.

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

Blood pressure was assessed in an aneroid sphygmomanometer and body mass index (BMI) was calculated by dividing weight by height squared ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Fasting blood glucose measured in plasma and uric acid measured in serum were assessed by standard method with a commercial kit (Bioclin). Urine protein levels were measured using the Siemens Dimension Xpand plus HM Clinical Analyzer and proteinuria was calculated by urine protein (mg/dl) x collected urine volume (ml) in 24 hours/100. Hematological parameters (erythrocytes, hemoglobin, hematocrit and platelets) were determined with an automatic counter Sysmex XE 5000 cells.

## **2.4. Oxidizing substances**

Lipid peroxidation was assessed in plasma and erythrocytes by measuring thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) according to the method of Lapenna et al (2001) [26], using thiobarbituric acid and a standard curve of different concentrations of malondialdehyde (MDA), where the reaction product was measured spectrophotometrically at

532 nm and the results were expressed in nmol MDA/ml plasma and in nmol MDA/ml of erythrocytes.

## **2.5. Antioxidants**

Protein thiol groups (P-SH) were quantified in plasma and non-protein thiol groups (NP-SH) in erythrocytes by the method of Ellman & Boyne (1972) [27] modified by Jacques-Silva et al (2001) [28], which consists of reducing acid 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) in phosphate buffer measured at 412 nm. The results were expressed as nmol of P-SH/ml plasma and NP-SH nmol/ml erythrocytes.

Vitamin C (VIT C) in plasma was estimated as described by Galley et al. (1996) [29] with some modifications by Jacques-Silva et al. (2001) [28], where the orange-red compound formed was measured at 520 nm and results were expressed in  $\mu\text{g vit C/ml plasma}$ .

## **2.6. Enzymatic activity**

Catalase activity was determined spectrophotometrically by the method of Aebi et al [30], at 240 nm using hydrogen peroxide as substrate. The method is based on the decomposition of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and the results were expressed in K/mg Hb.

$\delta$ -ALA-D activity was determined in whole blood by the method of Berlin and Schaller (1974) [31], measuring the porphobilinogen (PBG) formation rate at 1 h at  $37^\circ\text{C}$ , where the reaction product was determined at 555 nm and results were expressed in U/L (nmol PBG/h/mgHb). To verify that changes in enzyme activity were related to the oxidation of thiol groups, a set of similar tubes was incubated, except for the addition of 2 mM dithiothreitol (DTT) as a reducing agent, to obtain the reactivation index using  $A-B/A*100$ , where A = DTT absorbance assay and B = no DTT absorbance assay.

## **2.7. Statistical analysis**

The software Graph Pad Prism v.5. (San Diego, California) was used to analyze the data. The Shapiro-Wilk test was used to test for sample distribution. When the groups were normally distributed, we used the One-Way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for comparison between groups and data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). For analysis of non-parametric data, we used the Kruskal-Wallis test and the results were presented as median (interquartile range). For correlation, we used Spearman's correlation coefficient for nonparametric data, where values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant for all analyses.

### 3. Results

A total of eighty-five voluntary pregnant women participated in this study. The clinical and demographic characteristics of the women with and without preeclampsia are shown in Table A. As expected, patients with preeclampsia presented increased systolic and diastolic pressure. Pregnant women with severe preeclampsia presented higher systolic and diastolic blood pressure than women with mild preeclampsia and controls. The other clinical and demographic characteristics were not significantly different among the groups.

The biochemical and hematological parameters evaluated are shown in Table B. Uric acid was higher in patients with severe preeclampsia when compared to pregnant controls and pregnant women with mild preeclampsia and platelets were lower in patients with severe preeclampsia when compared to pregnant controls.

Markers of oxidative stress in the present study were altered in pregnant women with PE, as shown in Table C. TBARS levels present in plasma and erythrocytes were significantly higher in pregnant women with preeclampsia, while protein thiol groups, non-protein thiol groups, the amount of Vitamin C and catalase activity were significantly lower in the group of pregnant women with preeclampsia when compared to pregnant controls. However, there were no significant differences in these markers between the groups of pregnant women with mild and severe preeclampsia.

$\delta$ -ALA-D activity in the blood was significantly lower in women with preeclampsia compared to pregnant controls and the same was observed in the presence of DTT (Figure A), with no significant difference between pregnant women with mild and severe preeclampsia. In addition, the enzyme reactivation index was higher in patients with preeclampsia when compared to the group of pregnant controls (Figure B), however, the same was not observed when comparing the groups of pregnant women with mild and severe preeclampsia.

With respect to the correlation between  $\delta$ -ALA-D activity and the other parameters of oxidative stress, as can be seen in Table D, there was a weak positive correlation between  $\delta$ -ALA-D activity and SH erythrocytes, vitamin C and catalase activity. In addition, there was a weak negative correlation between plasma TBARS levels and  $\delta$ -ALA-D activity.

### 4. Discussion

Despite numerous studies attempting to identify mechanisms that induce preeclampsia, no specific cause has been identified, but rather only a few associations between preeclampsia and some variants of genes involved in inflammation, the rennin-angiotensin system,

thrombophilia and oxidative stress [1,4]. In this study, there was an increase in the levels of oxidative stress, a decrease in antioxidant defenses and the first time demonstrated a decrease in  $\delta$ -ALA-D activity in pregnant women with mild and severe preeclampsia.

Preeclampsia is characterized by an increase in systolic and diastolic pressure, accompanied by increased proteinuria after the 20th week of pregnancy and maternal disorders such as renal failure and hematological complications [1]. Our data corroborate this, with increased blood pressure, proteinuria, and uric acid and decreased platelets in pregnant women with preeclampsia when compared to the control (Table A and B).

In addition to being a marker of kidney dysfunction, uric acid is also a marker of tissue damage and oxidative stress [19]. As can be seen in Table B, uric acid was higher in women with preeclampsia, especially in those with severe preeclampsia, confirming findings from other studies [19,32]. The final product of the purine metabolism is uric acid, which is synthesized by xanthine oxidase, and ischemia/hypoxia of the placenta and cytokines increase the expression of xanthine oxidase, thus increasing the production of uric acid in pregnant women with preeclampsia [19].

The main products generated by oxidative stress in preeclampsia are from lipid peroxidation and lipid damage can be assessed by measuring MDA. The final product of lipid peroxidation is MDA degradation of polyunsaturated fatty acids, which can be measured by the TBARS assay [33]. Shaker & Sadik [19] suggest that the placenta is a major source of increased MDA and that this increase involves lipid peroxidation in preeclampsia. An increase of lipid damage in women with preeclampsia was observed in this study by the increase in TBARS levels in plasma and erythrocytes of these women compared to pregnant controls (Table C).

There was also a decrease of thiol groups in plasma and erythrocytes of pregnant women with preeclampsia (Table C), which are antioxidant molecules that contain the sulfhydryl (-SH) group bound to a carbon atom and are effective against damage caused by free radicals. They play key roles in the function and structure of proteins, antioxidant protection and regulation of enzyme activity, with the sulfhydryl groups being the main agent in the antioxidant effect of proteins [34]. An additional parameter evaluated was vitamin C level, which was significantly lower in the group of women with preeclampsia when compared to the pregnant controls (Table C). Vitamin C is an antioxidant and acts as a reducing agent reacting with superoxide radicals and hydroperoxides and its decrease may be due to its action to eliminate some free radicals, which are increased in preeclampsia [35]. The catalase enzyme is part of the antioxidant system and acts to protect cells against

oxidative stress by degrading hydrogen peroxide [36]. The decrease in catalase activity observed in women with preeclampsia (Table C) can impair the development of the placenta and reflects a change in the antioxidant system due to increased reactive oxygen species, resulting in an increase in protein peroxidation [37]. Thus, with the decreases in thiol groups, vitamin C and catalase activity demonstrate a depletion in antioxidant system of pregnant women with preeclampsia.

$\delta$ -ALA-D is the second enzyme in the heme biosynthetic pathway [13] and may be critical as a marker of oxidative stress, in conjunction with other markers [36]. There was an increased inhibition of this enzyme in women with preeclampsia when compared to pregnant controls (Figure A). This inhibition generates ALA accumulation, which undergoes auto-oxidation at the physiological pH, affecting the formation of  $H_2O_2$ ,  $O_2$  and ALA free radicals, generating an increase in lipid peroxidation and oxidative DNA damage and a decrease in the antioxidant system [13,23].

After incubation with the reducing agent dithiothreitol (DTT), alterations in the basal activity of  $\delta$ -ALA-D were observed (Figure A), where DTT was able to prevent the oxidation of thiol groups of the enzyme [38]. DTT is used to reverse the inhibition of  $\delta$ -ALA-D activity as it is responsible for maintaining the thiol groups of the enzyme in a reduced state, thereby providing the enzyme reactivation index [21,39]. Some studies have used the enzyme reactivation index to evaluate the involvement of thiol groups in the inhibition of  $\delta$ -ALA-D activity, demonstrating significant results regarding the evaluation of oxidative stress in different pathologies [40–42]. In this study, we observed a higher reactivation rate in pregnant women with preeclampsia when compared to pregnant controls (Figure B), showing a possible involvement of thiols in the restoration of enzyme activity in the presence of DTT *in vitro*. This would explain the weak positive correlation observed between the activity of  $\delta$ -ALA-D and thiol groups in erythrocytes, shown in Table D, suggesting an additive effect of preeclampsia in relation to reactivation of the enzyme.

The low level of  $\delta$ -ALA-D activity observed in women with preeclampsia in this study suggests that inhibition of this enzyme may contribute to the overall level of ROS in women with this condition and may be a key factor in endothelial changes which are usually observed in this condition [13]. This may account for the weak negative correlation between the activity of  $\delta$ -ALA-D and plasma TBARS levels observed in the study (Table D).

The inhibition of  $\delta$ -ALA-D activity can lead to auto-oxidation of ALA, generating an increase in ROS and a depletion of the antioxidant system, as there is a disturbance in the cellular balance of pro-oxidants and antioxidants [21]. Added to this, endogenous vitamin C



acts in the protective oxidation of thiol groups [36], and when there is a decrease in plasma concentrations of antioxidants, there is a consequent increase in the oxidation of these groups [43]. That is, the decrease in vitamin C levels observed in women with preeclampsia may impair the protection against oxidation of thiols, which may be related to the weak positive correlation observed in Table D. According to Paniz et al. [43] this correlation demonstrates that vitamin C levels may be associated with  $\delta$ -ALA-D levels found in the blood because it is a thiol-dependent enzyme, which may represent the current oxidative status. Furthermore, Fredstrom [44] suggests that vitamin C may promote blood vasodilation and prevent endothelial dysfunction in some pathologies such as hypertension, atherosclerosis and hypercholesterolemia, thus the decrease in this important antioxidant defense may promote a deterioration of the clinical condition of pregnant women with preeclampsia.

$\delta$ -ALA-D is responsible for catalyzing the condensation of two ALA molecules to form porphobilinogen polypyrrole (PBG), which then forms tetrapyrrole molecules, key components of some proteins, and cytochromes, hemoglobin and some enzymes, such as catalase [10]. Furthermore, the decrease in antioxidant enzyme activity may be promoted by changes in the structure of the proteins that compose them, which can change the functions of these enzymes, influencing the antioxidant response of the body [45]. Thus, as can be seen by the weak positive correlation in Table D, the decrease in  $\delta$ -ALA-D activity in pregnant women with preeclampsia may be directly related to decreased catalase activity, another important antioxidant enzyme, and this may be due to decreased production of the tetrapyrrole molecule that is part of the structure of this enzyme [45,46].

## 5. Conclusion

The present study reports the levels of oxidative stress in pregnant women with preeclampsia, highlighting  $\delta$ -ALA-D activity and its possible association with changes in other markers of oxidative stress in pregnant women with preeclampsia. Since oxidative stress and changes in the antioxidant capacity related to this pathology may influence fetal growth and development, these results are very important to contribute to a better understanding of the complex mechanisms involved in the pathogenesis of this disease.

**Acknowledgments:** The authors thank all the volunteers who participated in this study. Also, we thank Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE), Federal University of Santa Maria (UFSM) and the

Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), Rio Grande do Sul, Brazil, for support in this study.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

### References

- [1] B.W.J. Mol, C.T. Roberts, S. Thangaratinam, L.A. Magee, C.J.M. de Groot, G.J. Hofmeyr, Pre-eclampsia, *Lancet*. (2015) 999–1011. doi:10.1016/S0140-6736(15)00070-7.
- [2] A. Alzate, R. Herrera-Medina, L.M. Pineda, Preeclampsia prevention: a case-control study nested in a cohort, *Colomb. Med.* 46 (2015) 156–161. <http://colombiamedica.univalle.edu.co/index.php/comedica/article/view/1887>.
- [3] S. Saleem, E.M. McClure, S.S. Goudar, A. Patel, F. Esamai, A. Garces, E. Chomba, F. Althabe, J. Moore, B. Kodkany, O. Pasha, J. Belizan, A. Mayansyan, R.J. Derman, P.L. Hibberd, E.A. Liechty, N.F. Krebs, K.M. Hambidge, P. Buekens, W.A. Carlo, L.L. Wright, M. Koso-Thomas, A.H. Jobe, R.L. Goldenberg, A prospective study of maternal, fetal and neonatal deaths in low- and middle-income countries., *Bull. World Health Organ.* 92 (2014) 605–12. doi:10.2471/BLT.13.127464.
- [4] L. De Lucca, F.M.P. Gallarreta, T.L. Gonçalves, Oxidative stress markers in pregnant women with preeclampsia, *Am. J. Med. Biol. Res.* 3 (2015) 68–73. doi:10.12691/ajmbr-3-3-1.
- [5] S. Machado, M. Neves, L. Freitas, M. Campos, Diagnosis, pathophysiology and management of pre-eclampsia: a review, *Port. J. Nephrol. Hypertens.* 27 (2013) 153–161. doi:https://dx.doi.org/10.2147/VHRM.S20181.
- [6] M.G. Elliot, Oxidative stress and the evolutionary origins of preeclampsia, *J. Reprod. Immunol.* 114 (2016) 75–80. doi:10.1016/j.jri.2016.02.003.
- [7] Y. Taniyama, K.K. Griendling, Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms, *Hypertension.* 42 (2003) 1075–1081. doi:10.1161/01.HYP.0000100443.09293.4F.
- [8] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Free radical in biology and medicine: Oxford Universit Press, 2nd ed., New York, 1989.
- [9] P.M. Abuja, R. Albertini, Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins, *Clin. Chim. Acta.* 306 (2001) 1–17. doi:10.1016/S0009-8981(01)00393-X.
- [10] D. Zanini, L.P. Pelinson, R. Schmatz, L. Belmonte Pereira, C. Curry Martins, J. Baldissareli, G. Pires Amaral, F.A. Antunes Soares, L.G. Brenner Reetz, M. do C. Araújo, J. Chiesa, V.M. Morsch, D. Bitencourt Rosa Leal, M.R.C. Schetinger, d-aminolevulinatase dehydratase activity in lung cancer patients and its relationship with oxidative stress, *Biomed. Pharmacother.* 68 (2014) 603–609. doi:10.1016/j.biopha.2014.04.005.
- [11] A. Agarwal, S. Gupta, R.K. Sharma, Role of oxidative stress in female reproduction., *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3 (2005) 28. doi:10.1186/1477-7827-3-28.
- [12] M.T. Raijmakers, W.H. Peters, E.A. Steegers, L. Poston, Amino thiols, detoxification and oxidative stress in pre-eclampsia and other disorders of pregnancy, *Curr. Pharm. Des.* 11 (2005) 711–734. doi:10.2174/1381612053381837.
- [13] O. Ademuyiwa, O.L. Odusoga, O.O. Adebawo, R. Ugbaja, Endogenous antioxidant defences in plasma and erythrocytes of pregnant women during different trimesters of pregnancy., *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 86 (2007) 1175–1182.

- doi:10.1080/00016340701515357.
- [14] Z. Serdar, E. Gür, M. Colakoethullary, O. Develioethlu, E. Sarandöl, Lipid and protein oxidation and antioxidant function in women with mild and severe preeclampsia., *Arch. Gynecol. Obstet.* 268 (2003) 19–25. doi:10.1007/s00404-002-0302-y.
- [15] S. Mehendale, A. Kilari, K. Dangat, V. Taralekar, S. Mahadik, S. Joshi, Fatty acids, antioxidants, and oxidative stress in pre-eclampsia, *Int. J. Gynecol. Obstet.* 100 (2008) 234–238. doi:10.1016/j.ijgo.2007.08.011.
- [16] R. Rodrigo, M. Parra, C. Bosco, V. Fernández, P. Barja, J. Guajardo, R. Messina, Pathophysiological basis for the prophylaxis of preeclampsia through early supplementation with antioxidant vitamins, *Pharmacol. Ther.* 107 (2005) 177–197. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.03.001.
- [17] R. Dechend, C. Viedt, D.N. Müller, B. Ugele, R.P. Brandes, G. Wallukat, J.K. Park, J. Janke, P. Barta, J. Theuer, A. Fiebeler, V. Homuth, R. Dietz, H. Haller, J. Kreuzer, F.C. Luft, AT1 receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients stimulate NADPH oxidase, *Circulation.* 107 (2003) 1632–1639. doi:10.1161/01.CIR.0000058200.90059.B1.
- [18] C.M. Koopmans, M.G. Van Pampus, H. Groen, J.G. Aarnoudse, P.P. Van Den Berg, B.W.J. Mol, Accuracy of serum uric acid as a predictive test for maternal complications in pre-eclampsia: Bivariate meta-analysis and decision analysis, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 146 (2009) 8–14. doi:10.1016/j.ejogrb.2009.05.014.
- [19] O.G. Shaker, N. a H. Sadik, Pathogenesis of preeclampsia: Implications of apoptotic markers and oxidative stress., *Hum. Exp. Toxicol.* 32 (2013) 1170–8. doi:10.1177/0960327112472998.
- [20] T.L. Gonçalves, D.M. Benvegnu, G. Bonfanti, A. V Frediani, J.B.T. Rocha, Delta-ALA-D activity is a reliable marker for oxidative stress in bone marrow transplant patients, *BMC Cancer.* 9 (2009) 138. doi:1471-2407-9-138 [pii]r10.1186/1471-2407-9-138.
- [21] J.B.T. Rocha, R.A. Saraiva, S.C. Garcia, F.S. Gravina, C.W. Nogueira, Aminolevulinatase dehydratase (delta-ALA-D) as marker protein of intoxication with metals and other pro-oxidant situations, *Toxicol. Res. (Camb).* 1 (2012) 85–102. doi:10.1039/c2tx20014g.
- [22] M. Farina, R. Brandão, F.S. Lara, F.A. Soares, D.O. Souza, J.B.T. Rocha, Mechanisms of the inhibitory effects of selenium and mercury on the activity of delta-aminolevulinatase dehydratase from mouse liver, kidney and brain., *Toxicol. Lett.* 139 (2003) 55–66. doi:10.1016/S0378-4274(02)00454-X.
- [23] L. De Lucca, F. Rodrigues, L. Jantsch, W. Neme, F. Gallarreta, T. Gonçalves, Oxidative profile and  $\delta$ -aminolevulinatase dehydratase activity in healthy pregnant women with iron supplementation, *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 13 (2016) 463. doi:10.3390/ijerph13050463.
- [24] V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, N. Chandra, Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health., *Pharmacogn. Rev.* 4 (2010) 118–26. doi:10.4103/0973-7847.70902.
- [25] J.M. Roberts, M. Druzin, P.A. August, R.R. Gaiser, G. Bakris, J.P. Granger, J.R. Barton, A. Jeyabalan, I.M. Bernstein, D.D. Johnson, S.A. Karamanchi, C.Y. Spong, M.D. Lindheiner, E. Tsingas, M.Y. Owens, J.N. Martin Jr, G.R. Saade, B.M. Sibai, ACOG Guidelines: Hypertension in pregnancy, 2013. doi:10.1097/01.AOG.0000437382.03963.88.
- [26] D. Lapenna, G. Ciofani, S.D. Pierdomenico, M.A. Giamberardino, F. Cuccurullo, Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid peroxides in human plasma, *Free Radic. Biol. Med.* 31 (2001) 331–335.

- doi:10.1016/S0891-5849(01)00584-6.
- [27] A.F. Boyne, G.L. Ellman, A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components, *Anal. Biochem.* 46 (1972) 639–653. doi:10.1016/0003-2697(72)90335-1.
- [28] M.C. Jacques-Silva, C.W. Nogueira, L.C. Broch, E.M. Flores, J.B. Rocha, Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice., *Pharmacol. Toxicol.* 88 (2001) 119–125. doi:10.1034/j.1600-0773.2001.d01-92.x.
- [29] H.F. Galley, M.J. Davies, N.R. Webster, Ascorbyl radical formation in patients with sepsis: Effect of ascorbate loading, *Free Radic. Biol. Med.* 20 (1996) 139–143. doi:10.1016/0891-5849(95)02022-5.
- [30] H. Aebi, Catalase in vitro, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121–126. doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
- [31] A. Berlin, K. Schaller, European standardized method for the determination of  $\delta$ -aminolevulinic dehydratase activity in blood, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 12(8) (1974) 389–90. <http://edoc.hu-berlin.de/oa/degruyter/cclm.1974.12.8.389.pdf>.
- [32] N. Aleksandra, C. Velibor, M.A. Novakov, J. Ana, S. Zoran, Ceruloplasmin and antioxidative enzymes in pre-eclampsia, *J. Matern. Neonatal Med.* 23 (2015) 1–7. doi:10.3109/14767058.2015.1111333.
- [33] Y. Dotan, D. Lichtenberg, I. Pinchuk, Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress, *Prog. Lipid Res.* 43 (2004) 200–227. doi:10.1016/j.plipres.2003.10.001.
- [34] C.M. Da Costa, R.C.C. Dos Santos, E.S. Lima, A simple automated procedure for thiol measurement in human serum samples, *J. Bras. Patol. E Med. Lab.* 42 (2006) 345–350. doi:10.1590/S1676-24442006000500006.
- [35] A.S. Atiba, F.M. Abbiyesuku, T.A. 'Niran-atiba, D.P. Oparinde, O.A. Ajose, R.A. Akindede, Free radical attack on membrane lipid and antioxidant vitamins in the course of pre-eclamptic pregnancy., *Ethiop. J. Health Sci.* 24 (2014) 35–42. doi:10.4314/ejhs.v24i1.5.
- [36] C.R.N. Polachini, R.M. Spanevello, D. Zanini, J. Baldissarelli, L.B. Pereira, M.R.C. Schetinger, I.B.M. da Cruz, C.E. Assmann, M.D. Bagatini, V.M. Morsch, Evaluation of delta-aminolevulinic dehydratase activity, oxidative stress biomarkers, and vitamin D levels in patients with multiple sclerosis, *Neurotox. Res.* (2015) 1–13. doi:10.1007/s12640-015-9584-2.
- [37] A.S. Sahay, D.P. Sundrani, G.N. Wagh, S.S. Mehendale, S.R. Joshi, Regional differences in the placental levels of oxidative stress markers in pre-eclampsia, *Int. J. Gynecol. Obstet.* 129 (2015) 213–218. doi:10.1016/j.ijgo.2015.03.001.
- [38] D. Gabriel, L. Pivetta, V. Folmer, J.C.M. Soares, G.R. Augusti, C.W. Nogueira, G. Zeni, J.B.T. Rocha, Human erythrocyte d-aminolevulinate dehydratase inhibition by monosaccharides is not mediated by oxidation of enzyme sulfhydryl groups, *Cell Biol. Int.* 29 (2005) 669–674. doi:10.1016/j.cellbi.2005.03.017.
- [39] T. Emanuelli, J.B. Rocha, M.E. Pereira, L.O. Porciuncula, V.M. Morsch, A.F. Martins, D.O. Souza, Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on delta-aminolevulinate dehydratase from brain, liver and kidney of adult mice., *Pharmacol. Toxicol.* 79 (1996) 136–143. doi:10.1111/j.1600-0773.1996.tb00257.x.
- [40] G. Bonfanti, R.B. Ceolin, T. Valcorde, K.S. De Bona, L. De Lucca, T.L. Gonçalves, M.B. Moretto,  $\delta$ -Aminolevulinate dehydratase activity in type 2 diabetic patients and its association with lipid profile and oxidative stress, *Clin. Biochem.* 44 (2011) 1105–1109. doi:10.1016/j.clinbiochem.2011.06.980.
- [41] T.L. Gonçalves, F. Erthal, C.L.D. Corte, L.G. Muller, C.M. Piovezan, C.W. Nogueira, J.B.T. Rocha, Involvement of oxidative stress in the pre-malignant and malignant states

- of cervical cancer in women, *Clin. Biochem.* 38 (2005) 1071–1075. doi:10.1016/j.clinbiochem.2005.09.008.
- [42] D. Grotto, J. Valentini, M. Fillion, C.J.S. Passos, S.C. Garcia, D. Mergler, F. Barbosa, Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon, *Sci. Total Environ.* 408 (2010) 806–811. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.10.053.
- [43] C. Paniz, A. Bairros, J. Valentini, M. Charão, R. Bulcão, A. Moro, T. Grune, S.C. Garcia, The influence of the serum vitamin C levels on oxidative stress biomarkers in elderly women, 40 (2007) 1367–1372. doi:10.1016/j.clinbiochem.2007.08.013.
- [44] S. Fredstrom, Nitric oxide, oxidative stress, and dietary antioxidants, *Nutrition.* 18 (2002) 537–539. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0899-9007(02)00758-X.
- [45] N.B. Bottari, R.E. Mendes, M.D. Baldissera, G. V Bochi, R.N. Moresco, M.L.R. Leal, V.M. Morsch, M.R.C. Schetinger, R. Christ, L. Gheller, É.J. Marques, A.S. Da Silva, *AC SC, Exp. Parasitol.* (2016) 1–26. doi:10.1016/j.exppara.2016.03.012.
- [46] S. Sassa, D. Ph, *ALAD Porphyria*, 18 (1998) 94–101. doi:10.1055/s-2007-1007145.

## Appendices

**Table A:** Clinical and demographic characteristics of pregnant women with and without preeclampsia.

Characteristics of Subjects	C (n=30)	MPE (n=25)	SPE (n=30)
Age (years)	26.67 ± 4.42	28.50 ± 6.80	28.72 ± 6.33
Gestational age (weeks)	32.50 (31.00-36.75)	35.00 (28.00-36.00)	32.00 (29.00-35.75)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	29.75 (27.33-33.79)	29.33 (25.78-32.42)	31.74 (29.34-34.48)
Systolic pressure (mmHg)	110.00 (100.00-110.00)	130.00 (120.00-140.00) <sup>1</sup>	160.00 (145.00-170.00) <sup>1,2</sup>
Diastolic pressure (mmHg)	70.00 (60.00-70.00)	80.00 (80.00-100.00) <sup>1</sup>	100.00 (90.00-110.00) <sup>1,2</sup>

Parametric results were determined by ANOVA followed by Tukey's test and represented as mean ± standard deviation and nonparametric results were determined by Kruskal-Wallis and represented as median (interquartile range).

<sup>1</sup>p <0.05 when compared to the group of pregnant controls; <sup>2</sup>p <0.05 when compared to the group of pregnant women with mild preeclampsia; BMI: Body Mass Index; C: Control group; MPE: Mild preeclampsia; SPE: Severe preeclampsia.

**Table B:** Biochemical and hematological parameters of pregnant women with and without preeclampsia.

Parameter	C (n=30)	MPE (n=25)	SPE (n=30)
Uric acid (mg/dL)	3.48 ± 0.78	4.60 ± 0.89	5.95 ± 1.81 <sup>1,2</sup>
Glucose (mg/dL)	75.50 (69.25-80.00)	81.00 (63.00-86.00)	80.00 (69.00-88.50)
Proteinuria (mg/24 h)	--	381.50 (326.30-482.30)	1801.00 (709.50-4995.00) <sup>2</sup>
Erythrocytes (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	4.00 ± 0.30	3.95 ± 0.41	4.05 ± 0.31
Hematocrit (%)	35.20 (34.09-37.28)	33.30 (31.55-36.05)	36.00 (34.13-37.08)
Hemoglobin (g/dL)	11.81 ± 0.93	11.21 ± 1.03	11.83 ± 0.89
Platelets (MIL/mm <sup>3</sup> )	231.50 (209.80-252.30)	213.00 (171.00-252.00)	184.00 (155.30-234.30) <sup>1</sup>

Parametric results were determined by ANOVA followed by Tukey's test and represented as mean ± standard deviation and nonparametric results were determined by Kruskal-Wallis and represented as median (interquartile range).

<sup>1</sup>p <0.05 when compared to the group of pregnant controls; <sup>2</sup>p <0.05 when compared to the group of pregnant women with mild preeclampsia; BMI: Body Mass Index; C: Control group; MPE: Mild preeclampsia; SPE: Severe preeclampsia.

**Table C:** Oxidative stress markers in pregnant women with and without preeclampsia.

Parameter	C (n=30)	MPE (n=25)	SPE (n=30)
TBARS erythrocytes (nmol/mL)	12.62 (7.72-16.45)	20.67 (14.20-33.63) <sup>1</sup>	27.84 (12.45-32.02) <sup>1</sup>
TBARS plasma (nmol/mL)	3.19 (2.39-3.75).	3.54 (3.28-5.73) <sup>1</sup>	4.11 (3.45-5.31) <sup>1</sup>
NP-SH (nmol NP-SH/mL)	859.10 ± 118.70	775.60 ± 130.80 <sup>1</sup>	739.40 ± 104.00 <sup>1</sup>
P-SH (nmol P-SH/mL)	144.10 ± 21.69	126.60 ± 25.38 <sup>1</sup>	112.20 ± 26.24 <sup>1</sup>
VITAMIN C (µg vit C/mL)	18.01 (12.75-27.08)	10.74 (8.88-15.78) <sup>1</sup>	11.68 (9.18-16.40) <sup>1</sup>
CATALASE (K/mg Hb)	54.05 (47.16-59.11)	38.18 (23.56-51.45) <sup>1</sup>	27.29 (20.28-53.99) <sup>1</sup>

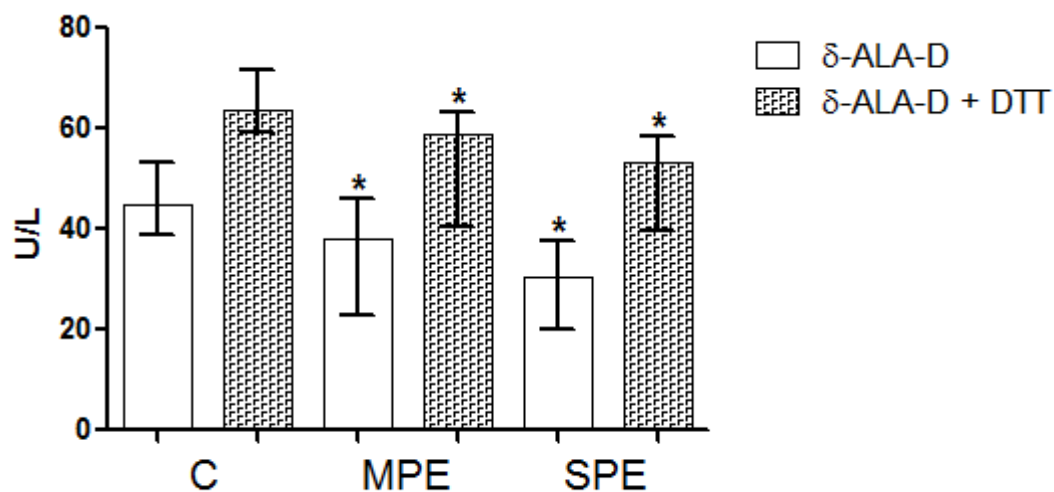
Parametric results were determined by ANOVA followed by Tukey's test and represented as mean ± standard deviation and nonparametric results were determined by Kruskal-Wallis and represented as median (interquartile range).

<sup>1</sup>p <0.05 when compared to the group of pregnant controls; C: Control group; MPE: Mild preeclampsia; SPE: Severe preeclampsia; TBARS: thiobarbituric acid-reactive substances; NP-SH: non-protein thiol groups; P-SH: protein thiol groups.

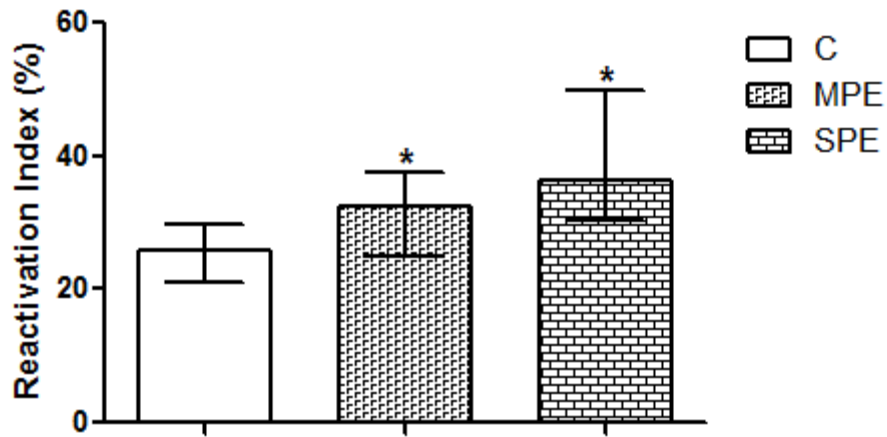
**Table D:** Correlations of  $\delta$ -ALA-D activity and oxidative stress parameters in pregnant women with preeclampsia.

Correlations	Spearman r	p
$\delta$ -ALA-D versus TBARS erythrocytes	-0.1797	0.2229
$\delta$ -ALA-D versus TBARS plasma	-0.3475	0.0116*
$\delta$ -ALA-D versus NP-SH	0.3400	0.0240*
$\delta$ -ALA-D versus P-SH	0.1570	0.2663
$\delta$ -ALA-D versus Vitamin C	0.3524	0.0097*
$\delta$ -ALA-D versus Catalase	0.3962	0.0152*

Correlation of data performed using Spearman correlation coefficient. \*p <0.05 was considered statistically significant for all analyses.  $\delta$ -ALA-D: delta-aminolevulinate dehydratase enzyme; TBARS: thiobarbituric acid-reactive substances; NP-SH: non-protein thiol groups; P-SH: protein thiol groups.

**Figure A:**  $\delta$ -ALA-D activity in pregnant women with and without preeclampsia. Data are presented as median (interquartile range) and expressed in U/L. Statistically significant differences were determined by Kruskal-

Wallis. \* $p < 0.05$  when compared to the control group.  $\delta$ -ALA-D: delta-aminolevulinatase dehydratase enzyme; DTT: dithiothreitol; C: Control group; MPE: Mild preeclampsia; SPE: Severe preeclampsia.



**Figure B:** Reactivation index of  $\delta$ -ALA-D enzyme in pregnant women with and without preeclampsia. Data are presented as median (interquartile range) and expressed in %. The statistically significant differences were determined by Kruskal-Wallis. \* $p < 0.05$  when compared to the control group. C: Control group; MPE: Mild preeclampsia; SPE: Severe preeclampsia.

## 4 DISCUSSÃO

Durante a gestação ocorrem alterações fisiológicas e anatômicas responsáveis por mudanças no organismo da gestante, como alterações metabólicas, nos elementos humorais e figurados do sangue, além das alterações hormonais (HILL; PICKINPAUGH, 2008). Além disso, a gestação é uma condição caracterizada por um aumento no estresse oxidativo, porque na placenta há um grande número de mitocôndrias que consomem oxigênio e, conseqüentemente, aumentam a produção de EROs (GITTO et al., 2009). Através dos resultados obtidos no presente estudo foi possível observar essas alterações tanto em gestantes saudáveis quanto em gestantes com pré-eclâmpsia, no qual os níveis de estresse oxidativo estão aumentados e as defesas antioxidantes estão diminuídas em gestantes sem suplementação com ferro e em gestantes com pré-eclâmpsia, sendo demonstrado através do aumento no nível de TBARS, diminuição nos grupamentos tióis, vitamina C e na atividade das enzimas catalase e  $\delta$ -ALA-D.

A peroxidação lipídica é favorecida através da exposição das membranas celulares as EROs, ocorrendo alterações nas propriedades físicas e componentes das membranas, favorecendo o dano celular e formação de produtos tóxicos como o MDA, que pode ser medido através da técnica de TBARS (DOTAN; LICHTENBERG; PINCHUK, 2004; LIMA; ABDALLA, 2001). Devido a isso, a placenta é uma fonte considerável de produção de MDA e conseqüentemente, a peroxidação lipídica está aumentada durante a gestação quando comparado a mulheres saudáveis, não gestantes (CHAMY et al., 2006; SHAKER; SADIK, 2013). Além disso, na pré-eclâmpsia os principais compostos gerados devido ao estresse oxidativo são os originados durante a disfunção endotelial que está envolvida na fisiopatologia da doença (DOTAN; LICHTENBERG; PINCHUK, 2004).

O baixo nível dos grupamentos tiólicos, dos níveis de vitamina C e a diminuição na atividade da catalase demonstrados no presente estudo, sugerem uma diminuição no sistema antioxidante dessas gestantes. Os grupos tióis são moléculas sensíveis aos danos oxidativos, atuando através da quelação ou redução protegem as proteínas contra o estresse oxidativo, além de atuarem na regulação da atividade de algumas enzimas (DA COSTA; DOS SANTOS; LIMA, 2006; HU, 1994; YANG; GUAN, 2015). A vitamina C age como um agente redutor, sendo utilizada para compensar os danos causados devido a radicais livres como superóxido e hidroperóxidos, a fim de recuperar a homeostase materna, podendo assim, estar diminuída durante a gestação e em outras patologias, como a pré-eclâmpsia (ATIBA et al., 2014; HASSAN; ONU, 2006; SUHAIL et al., 2010). Somado a isso, a catalase é uma



enzima que faz parte do sistema antioxidante enzimático e atua protegendo as células através da degradação do peróxido de hidrogênio, sendo assim, ocorre o acúmulo desse composto no organismo quando há uma redução na atividade dessa enzima (POLACHINI et al, 2015). Devido a diminuição de todo esse sistema antioxidante, há uma redução no combate as EROs, favorecendo a peroxidação lipídica e assim, acaba ocorrendo alterações no desenvolvimento da placenta (SAHAY et al., 2015).

A enzima  $\delta$ -ALA-D é sugerida como um marcador de estresse oxidativo porque além de atuar em conjunto com outros marcadores (POLACHINI et al, 2015), quando inibida, gera o acúmulo do ALA, com efeitos pró-oxidantes, por sofrer a auto-oxidação em pH fisiológico, promovendo a formação de  $H_2O_2$ ,  $O_2$  e de radicais livres ALA, favorecendo a peroxidação lipídica, danos oxidativos ao DNA e diminuição no sistema antioxidante (ADEMUYIWA et al., 2007). Logo, pode haver um aumento no estresse oxidativo e diminuição do sistema antioxidante nessas gestantes devido à inibição dessa enzima que foi observada no presente estudo. Além da sua inibição, foi observado um aumento no índice de reativação dessa enzima, estando mais oxidada nas gestantes sem suplementação com ferro e em gestantes com pré-eclâmpsia, sugerindo o envolvimento dos grupos tióis no mecanismo de inibição.

A deficiência materna de ferro ou doses elevadas deste nutriente durante o período gestacional pode provocar um agravamento no estado de estresse oxidativo (DEVIRIM et al., 2006), no entanto, de acordo com os resultados encontrados no presente estudo, indica que a suplementação com ferro realizada de forma correta durante a gestação pode promover um efeito protetor, sendo capaz de amenizar esse estado de estresse oxidativo. Alguns estudos defendem que este elemento é capaz de interceptar radicais livres (BARREIROS; DAVID, 2006), além de melhorar o sistema hematológico e o estresse oxidativo em gestantes anêmicas, com a diminuição de alguns parâmetros de estresse oxidativo (HAN et al., 2011), o que foi confirmado no presente estudo. Em contrapartida, quando há uma suplementação de ferro em excesso, ocorre uma maior quantidade de ferro livre na placenta, favorecendo o estresse oxidativo, sendo uma condição que prejudica a invasão trofoblástica e é promotora de dano endotelial, podendo então, favorecer o desenvolvimento da pré-eclâmpsia (YOUNG; LEVINE; KARUMANCHI, 2010).

Nossos resultados demonstram que há uma perda no equilíbrio entre a capacidade antioxidante e a geração de EROs, sugerindo um perfil oxidativo maior durante a gestação, sendo agravado na patologia da pré-eclâmpsia. Isso pode ser observado através do aumento na produção de substâncias oxidativas, diminuição nos níveis de antioxidantes e pela inibição da atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D. Como essa enzima é muito sensível em situações pró-

oxidantes, a sua quantificação pode ser útil na avaliação de danos provocados pela gestação, principalmente em gestantes com pré-eclâmpsia. Assim, pode-se indicar os parâmetros estudados para o acompanhamento das gestantes, a fim de diminuir as morbidades e mortalidades maternas e fetais, além de melhorar o crescimento e desenvolvimento fetal, melhorando a qualidade de vida tanto da mãe quanto do feto.

## 5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados nessa dissertação, podemos inferir o seguinte:

1) Os níveis de estresse oxidativo estão aumentados em gestantes sem suplementação com ferro e em gestantes com pré-eclâmpsia;

2) As defesas antioxidantes, como grupos tiólicos, vitamina C e catalase estão diminuídos em gestantes sem suplementação com ferro e em gestantes com pré-eclâmpsia;

3) A atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D está inibida em gestantes sem suplementação com ferro e em gestantes com pré-eclâmpsia, sendo que essa inibição pode provocar prejuízo na síntese do grupamento heme, além de ocorrer um acúmulo de substâncias com efeitos pró-oxidantes;

4) O índice de reativação da enzima  $\delta$ -ALA-D está aumentado em amostras de gestantes sem suplementação com ferro e em gestantes com pré-eclâmpsia, sugerindo que a enzima é mais oxidável nesses grupos de gestantes;

5) A relação da atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D com outros parâmetros de estresse oxidativo em gestantes com pré-eclâmpsia, relata a eficiência dessa enzima em demonstrar os danos oxidativos causados pela patologia.

## REFERÊNCIAS

- ABBASPOUR, N.; HURRELL, R.; KELISHADI, R. Review on iron and its importance for human health. **J. Res. Med. Sci.**, v. 19, p. 164–174, 2014.
- ABUJA P. M.; ALBERTINI R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. **Clinica Chimica Acta**, v. 306, p. 1-17, 2001.
- ADEMUYIWA, O. et al. Endogenous antioxidant defences in plasma and erythrocytes of pregnant women during different trimesters of pregnancy. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, v. 86, p. 1175–1182, 2007.
- AGARWAL, A. et al. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v.10, n. 49, p. 1-31, 2012.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v. 3, p. 28-48, 2005.
- ALBERTS, B. et al. **Conversão de energia: mitocôndrias e cloroplastos**. In: *Biologia molecular da célula*. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2011. p. 813-78.
- AL-GUBORY, K.H.; FOWLER, P.A.; GARREL C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. **Int. J. Bioch. Cell. Biol.**, v. 42, p. 1624-1650, 2010.
- ALONSO-ALVAREZ, C., et al. Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. **Ecology Letters**, v. 7, n. 5, p. 363-368, 2004.
- ALZATE, A.; HERRERA-MEDINA, R.; PINEDA, L.M. La prevención de la preeclampsia : un estudio de casos y controles anidado en una cohorte. **Colomb. Med.**, v.46, p. 156–161, 2015.
- AMASH, A. et al. Preeclampsia as a maternal vascular disease. **Harefuah**, v. 146, n. 9, p. 707-712, 2007.
- ANDERSSON, L. A.; DAWSON, J. H. EXAFS spectroscopy of heme containing oxygenases and peroxidases. **Structure and Bonding**, v. 74, n. 1, p.1–40, 1991.
- ATIBA, A.S. et al. Free radical attack on membrane lipid and antioxidant vitamins in the course of pre-eclamptic pregnancy. **Ethiop. J. Health Sci.**, v. 24, p. 35–42, 2014.
- AUGUSTO, O. **Radicais livres: bons, maus e naturais**. São Paulo: Oficina de Textos, 2006, 114p.
- AVERSA, S. et al. Potential utility of melatonin as an antioxidant during pregnancy and in the perinatal period. **J. Matern. Fetal Neonatal Med.**, v. 25, p. 207-221, 2012.
- BAIERLE, M. et al. Possíveis efeitos do cobre sanguíneo sobre os parâmetros hematológicos em idosos. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 46, p. 463-470, 2010.

- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím. Nova.**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- BECHARA, E.J. Oxidative stress in acute intermittent porphyria and lead poisoning may be triggered by 5-aminolevulinic acid. **Braz. J. Med. Biol.**, v. 29, p. 841-51, 1996.
- BECHARA, E.J.H. et al. Free Radical Hypothesis of Lead Poisoning and Inborn Porphyrins Associated with 5-Aminolevulinic Acid Overload. **Quím. Nova**, v. 16, p. 385-392, 1993.
- BONFANTI, G. et al.  $\delta$ -Aminolevulinic acid 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.
- BONI, A. et al. Vitaminas antioxidantes e prevenção da arteriosclerose na infância. **Rev. Paul. Pediatr.**, v. 28, n. 4, p. 373-380, 2010.
- BORTOLOTTI, M.R.F.L.; BORTOLOTTI, L.A.; ZUGAIB, M. Hypertension and pregnancy: pathophysiology. **Hipertensão**, v. 11, n. 1, p. 9–13, 2008.
- BOTHWELL, T.H. Iron requirements in pregnancy and strategies to meet them. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 72, p. 257-264, 2000.
- BOYNE, A.F.; ELLMAN, G.L. A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. **Anal Biochem.**, v. 46, p. 639–653, 1972.
- BRANDÃO, A.H.F.; CABRAL, M.A.; CANRAL, A.C.V. A suplementação de ferro na gravidez: orientações atuais. **Femina**, v. 39, n. 5, p. 285-289, 2011.
- BURTON, G.J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.**, v. 25, p. 287–299, 2011.
- CANÇADO, R.D.; CHIATTONE, C.S. Anemia ferropênica no adulto – causas, diagnóstico e tratamento. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.32, n.3, p. 240-246, 2010.
- CARTY, D.M.; DELLES, C.; DOMINICZAK, A.F. Preeclampsia and future maternal health. **J Hypertens.**, v. 28, p. 1349-1355, 2010.
- CASANUEVA, E.; VITERI, F.E. Iron and oxidative stress in pregnancy. **J Nutr.**, v. 133, p. 1700S-1708S, 2003.
- CAVALLI, R.C. et al. Predição de pré-eclâmpsia. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** v. 31, n. 1, p. 1-4, 2009.
- CDC. Center for Disease Control and Prevention: Recommendation to prevent and control iron deficiency anemia in the United States. **MMWR**. v. 47, p.1-11, 1988.
- CHAMY, V.M. et al. Oxidative stress is closely related to clinical severity of pre-eclampsia. **Biol Res.**, v. 39, p. 229-236, 2006.

- COSTA, C.A. et al. Correlation between plasma 5-aminolevulinic acid concentrations and indicators of oxidative stress in lead-exposed workers. **Clin. Chem.**, v. 43, p. 1196-1202, 1997.
- DA COSTA, C.M.; DOS SANTOS, R.C.C.; LIMA, E.S. A simple automated procedure for thiol measurement in human serum samples. **Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 42, p. 345–350, 2006.
- DE MARCHI, E. Oxidative stress in cardiovascular diseases and obesity: role of p66Shc and protein kinase C. **Oxid. Med. Cell. Longev.**, ID: 564961, p. 1-11, 2013.
- DECHEND, R. et al. AT1 receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients stimulate NADPH oxidase, **Circulation.**, v. 107, p. 1632–1639, 2003.
- DEVIRIM, E. et al. Oxidant/antioxidant status of placenta, blood, and cord blood samples from pregnant women supplemented with iron. **J. Soc. Gynecol. Investig.**, v. 13, p. 502-505, 2006.
- DOTAN, Y.; LICHTENBERG, D.; PINCHUK, I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. **Prog. Lipid Res.**, v. 43, p. 200–227, 2004.
- ELLIOT, M.G. Oxidative stress and the evolutionary origins of preeclampsia. **J. Reprod. Immunol.**, v. 114, p. 75–80, 2016.
- EMANUELLI, T. et al. Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on delta-aminolevulinic acid dehydratase from brain, liver and kidney of adult mice. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 79, p. 136-143, 1996.
- FANG, Y.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v. 18, n. 10, p. 872–879, 2002.
- FARAG K.; HASSAN I.; LEDGER W.L. Prediction of preeclampsia; can it be achieved?. **Obstet. Gynecol. Surv.**, v. 59, p. 464-438, 2004.
- FARINA, M. et al. Mechanisms of the inhibitory effects of selenium and mercury on the activity of delta-aminolevulinic acid dehydratase from mouse liver, kidney and brain. **Toxicol. Lett.**, v. 139, p. 55–66, 2003.
- FOLMER, V.; SOARES, J.C.M.; ROCHA, J.B.T. Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content of the diet. **Int.J. Biochem. Cell Biol.**, v. 34, p. 1279-1285, 2002.
- FRANZINI, L. et al. Food selection based on high total antioxidant capacity improves endothelial function in a low cardiovascular risk population. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, v. 22, n. 1, p. 50-57, 2012.
- FREDSTROM, M.S. Nitric oxide, oxidative stress, and dietary antioxidants. **Nutrition**, v. 18, n. 6, p. 537-539, 2002.
- GARCIA, A.C. et al. Ferro e diabetes gestacional. **J. Brazilian Soc. Food Nutr.**, v. 37, n. 2, p. 215-226, 2012.

GIBSON, K.D.; NEUBERGER, A.; SCOTT, J.J. The purification and properties of deltaaminolevulinic acid dehydratase. **Biochem. J.**, v. 61, p. 618-629, 1955.

GILBERT et al. Pathophysiology of Hypertension during Preeclampsia: Linking Placental Ischemia with Endothelial Dysfunction. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 294, n. 2, p. H541-550, 2007.

GILLHAM, B.; PAPACHRISTODOULOU, D.K.; THOMAS, J.H. **Wills' Biochemical Basis of Medicine**. 3. ed. Oxford: Reed Educational and Professional Publishing Ltd, 1997. p. 196-202.

GITTO, E. et al. Causes of Oxidative Stress in the Pre- and Perinatal Period. **Biol. Neonate**, v. 81, p. 146-157, 2002.

GITTO, E. et al. Oxidative stress of the newborn in the pre- and postnatal period and the clinical utility of melatonin. **J. Pineal. Res.**, v. 46, p. 128-139, 2009.

GOERING, P.L. Lead protein interactions as a basis for lead toxicity. **Neurotoxicology**, v. 14, p. 45-60, 1993.

GOMES, F.G. **Comparação dos níveis circulantes de marcadores de estresse oxidativo e óxido nítrico entre gestantes sadias e com doenças hipertensivas da gravidez**. 2011. 60 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Hospital Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, Belo Horizonte, 2011.

GONÇALVES, T.L. et al. Delta-ALA-D activity is a reliable marker for oxidative stress in bone marrow transplant patients. **BMC Cancer**. v. 9, n. 138, p. 1-10, 2009.

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, p. 1071-1075, 2005.

GOYAL, M.M.; BASAK, A. Human catalase: looking for complete identity. **Protein Cell.**, v. 1, n. 10, p. 888-897, 2010.

GRAVINA, F.S. et al. Experimental hypothyroidism inhibits delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in neonatal rat blood and liver. **Exp. Biol. Med. (Maywood)**, v. 232, n. 8, p. 1021-1026, 2007.

GROTTO, D. et al. Avaliação da estabilidade do marcador plasmático do estresse oxidativo – malondialdeído. **Quim. Nova**, v. 2, p. 275-279, 2008.

GROTTO, D. et al. Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon. **Sci. Total Environ.**, v. 408, n. 4, p. 806-811, 2010.

GUPTA, S. et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in preeclampsia: a systematic review. **Obstet. Gynecol. Surv.**, v. 64, n. 11, p.750-759, 2009.

GUPTA, S.; AGARWAL A.; SHARMA, R.K. The role of placental oxidative stress and lipid peroxidation in preeclampsia. **Obstet. Gynecol. Surv.**, v. 60, n. 12, p. 807-816, 2005.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen is a toxic gas – an introduction to oxygen toxicity and reactive oxygen species. **In Free Radicals in Biology and Medicine**. New York: Oxford University Press; 2007a, p. 1-29.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. The chemistry of free radicals and related reactive species. **In Free Radicals in Biology and Medicine**. New York: Oxford University Press; 2007b, p. 30-78.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, JMC. **Free radical in biology and medicine**: Oxford Universit Press, 3ed, New York, 1999.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, JMC. **Free radical in biology and medicine**: Oxford Universit Press, 2ed, New York, 1989.

HAN, X.X. et al. Moderate NaFeEDTA and ferrous sulfate supplementation can improve both hematologic status and oxidative stress in anemic pregnant women. **Asia Pac. J. Clin. Nutr.**, v. 20, n. 4, p. 514-520, 2011.

HASSAN, G.I.; ONU, A.B. Total serum vitamin C concentration in pregnant women: implications for a healthy pregnancy. **Rev. Bras. Saude Mater. Infant.**, v. 6, n. 3, p. 293-296, 2006.

HEINEMANN, I.U.; JAHN, M.; JAHN, D. The biochemistry of heme biosynthesis. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 474, n. 2, p. 238-251, 2008.

HERRERO-MERCADO, M. et al. Organochlorine pesticide gradient levels among maternal adiposetissue, maternal blood serum and umbilical blood serum. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 86, p. 289–293, 2011.

HILL, C.; PICKINPAUGH, J. Physiologic Changes in Pregnancy. **Surg. Clin. North Am.**, v. 88, p. 391-401, 2008.

HLADUNEWICH, M.; KARUMANCHI, S.A.; LAFAYETTE, R. Pathophysiology of the clinical manifestations o pre-eclampsia. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v.2, n. 3, p. 543-549, 2007.

HRACSKO, Z. et al. Evaluation of oxidative stress markers in neonates with intra-uterine growth retardation. **Redox Rep.**, v. 13, n. 1, p. 11-16, 2008.

HU, M.L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. **Methods Enzymol.**, v. 233, p. 380–385, 1994.

HUNG, T.H. et al. Secretion of tumor necrosis factor-alpha from human placental tissues induced by hypoxia-reoxygenation causes endothelial cell activation in vitro: a potential mediator of the inflammatory response in preeclampsia. **Am. J. Pathol.**, v. 164, n. 3, p. 1049-1061, 2004.

HUTCHEON, J.A. et al. Epidemiology of pre-eclampsia and the other hypertensive disorders of pregnancy. **Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.**, v. 25, p. 391-403, 2011.



- JACOB, R.F.; MASON, R.P. Lipid peroxidation induces cholesterol domains formation in model membranes. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 39380-39387, 2005.
- JACQUES-SILVA, M.C. et al. Dyphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and brain of mice. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 88, p. 119–125, 2001.
- JAFFE E. K. et al. Characterization of the Role of the Stimulatory Magnesium of Escherichia-Coli Porphobilinogen Synthase. **Biochemistry**, v. 34, p. 244-251, 1995.
- JAFFE, E.K. The porphobilinogen synthase family of metalloenzymes. **Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.**, v. 56, p. 115-128, 2000.
- KHAN et al. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. **Lancet**, v. 367, p. 1066–1074, 2006.
- KHOSLA, U.M. et al. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction. **Kidney Int.**, v. 67, n. 5, p. 1739-1742, 2005.
- KONUK M.; CIĞERCI, I.H.; KORCAN, S.E. ALAD ( $\delta$ -aminolevulinic Acid Dehydratase) as Biosensor for Pb Contamination. **Intelligent and Biosensors**, Vernon S. Somerset (Ed.), Croatia: InTech, 2010, 386p.
- KURTOGLU E., et al. Effect of iron supplementation on oxidative stress and antioxidant status in iron–deficiency anemia. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 96, p. 117–123, 2003.
- LACHILI, B. et al. Increased lipid peroxidation in pregnant women after iron and vitamin C supplementation. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 83, p. 103-110, 2001.
- 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.
- LEAL, C. A. et al. Oxidative stress and antioxidant defences in pregnant women. **Redox Report.**, v. 16, p. 230-236, 2011.
- LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.
- LIMA, T.M.G. et al. Uso de antioxidantes em gestantes adolescentes com síndrome hipertensiva específica da gestação. **Saúde e Ambiente**, v. 3, p. 33-38, 2010.
- LYALL, F. Development of the utero-placental circulation: the role of ca monoxide and nitric oxide in trophoblast invasion and spiral artery transformation. **Microsc. Res. Tec.**, v. 60, p. 402-411, 2003.
- LYALL, F.; BELFORT, M. **Pré-eclâmpsia: Etiologia e prática clínica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda., 2009.
- MACHADO, S. et al. Diagnosis, pathophysiology and management of pre-eclampsia : a review, **Rev. Port. Nefrol. E Hipertens.**, v. 27, p. 153–161, 2013.

- MARION, M. et al. Uric acid as a risk factor for cardiovascular diseases and metabolic syndrome. **Rev. Bras. Farm.**, v. 92, n. 1, p. 3-8, 2011.
- MARSEGLIA, A. et al. Oxidative stress-mediated aging during the fetal and perinatal periods. **Oxid. Med. Cell. Longev.**, v. 2014, p. 358-375, 2014.
- MARTINS, T.D.D.; COSTA, A.N. Performance and behaviour of lactating sows raised in tropical climates. **Arch. Zootec.**, v. 57, p. 77-88, 2008.
- MATTHIESEN, L. et al. Immunology of preeclampsia. **Chem. Immunol. Allergy.**, v. 89, p. 49-61, 2005.
- MAYHEW, T.M.; CHARNOCK-JONES, D.S.; KAUFMANN, P. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. III. Changes in complicated pregnancies. **Placenta**, v. 25, n. 2-3, p. 127-39, 2004.
- MAYNARD, S.; EPSTEIN, H.F.; KARUMANCHI, S.A. Preeclampsia and Angiogenic Imbalance. **Annu. Rev. Med.**, v. 59, p. 437-454, 2008.
- MEDOTTI, M.T.C.F. et al. Iron deficiency anemia in pregnancy: controversies in iron supplementation. **Medicina**, v. 48, n. 4, p. 401-407, 2015.
- MEHENDALE, S. et al. Fatty acids, antioxidants, and oxidative stress in pre-eclampsia. **Int. J. Gynecol. Obstet.**, v. 100, p. 234-238, 2008.
- MELO, A. et al. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: Mechanisms and Therapeutic Perspectives. **Oxid. Med. Cell. Longev.**, ID: 467180, p. 1-14, 2011.
- MERT, I. et al. Role of oxidative stress in preeclampsia and intrauterine growth restriction. **J. Obstet. Gynaecol. Res.**, v. 38, p. 658-664, 2012.
- MILLS, B.J.; LANG, C.A. Differential distribution of free and bound glutathione and cyst(e)ine in human blood. **Biochem. Pharmacol.**, v. 52, p. 401-406, 1996.
- MILMAN, N. Iron prophylaxis in pregnancy-general or individual and which dose?. **Ann. Hematol.**, v. 85, p. 821-828, 2006.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Atenção ao pré-natal de baixo risco. **Cadernos de Atenção Básica**, n.32, p. 88-92, 2012.
- 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. 302 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos)
- MOL, B.W.J. et al. Pre-eclampsia. **Lancet**, v. 387, n. 10022, p. 999-1011, 2015.
- MOZZARELLI, A.; BETTATI, S. **Chemistry and Biochemistry of Oxygen Therapeutics: From Transfusion to Artificial Blood**. 2011, John Wiley & Sons, Inc. United Kingdom.

MYATT, L. Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. **Placenta**, v. 31, p. 66 -69, 2010.

NATIONAL HIGH BLOOD PRESSURE EDUCATION PROGRAM WORKING GROUP ON HIGH BLOOD PRESSURE IN PREGNANCY. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. **Am J Obstet Gynecol.**, v. 183, n. 1, p.S1-S22, 2000.

NAZIROĞLU, M. et al. Oral vitamin C and E combination modulates blood lipid peroxidation and antioxidant vitamin levels in maximal exercising basketball players. **Cell. Biochem. Funct.**, v. 28, p. 300–305, 2010.

NEAL, R. et al. Pro-oxidant effects of delta-aminolevulinic acid (delta-ALA) on Chinese hamster ovary (CHO) cells. **Toxicol. Lett.**, v. 91, n. 3, p. 169-178, 1997.

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

NORIS, M.; PERICO, N.; REMUZZI, G. Mechanisms of Disease: pre-eclampsia. **Nat. Clin. Pract. Nephrol.**, v. 1, p. 98-114, 2005.

NOZAL, M. J. et al. Determination of glutathione, cysteine and N-acetylcysteine in rabbit eye tissues using high-performance liquid chromatography and post-column derivatization with 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). **J. Chromatogr. A.**, v. 778, n. 1-2, p. 347-353, 1997.

OLALEYE, M.T.; ROCHA, B.T. Acetaminophen-induced liver damage in mice: effects of some medicinal plants on the oxidative defense system. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 59, n. 5, p. 319-327, 2008.

OSKARSSON, A. Effects of perinatal treatment with lead and disulfiram on ALAD activity in blood, liver and kidney and urinary ALA excretion in rats. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 64, n. 4, p. 344-348, 1989.

PAPPAS, J.B. et al. Oral dimercaptosuccinic acid and ongoing exposure to lead: effects on heme synthesis and lead distribution in a rat model. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 133, n. 1, p. 121-129, 1995.

PHIPPS, E. et al. Preeclampsia: Updates in Pathogenesis, Definitions, and Guidelines. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 11, n. 6, p. 1102-1113, 2016.

PIJNENBORG et al. Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. **Placenta.**, v.4, n. 4, p. 397-413, 1983.

PIRES, J.B.; MIEKELEY, N.; DONANGELO, C.M. Calcium supplementation during lactation blunts erythrocyte lead levels and delta-aminolevulinic acid dehydratase zinc-reactivation in women non-exposed to lead and with marginal calcium intakes. **Toxicology**, v. 175, n. 1-3, p. 247-255, 2002.

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.

POLI, G. et al. Oxidative stress and cell signaling. **Curr. Med. Chem.**, v. 11, p. 1163-1182, 2004.

POMPELLA, A. et al. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. **Biochem Pharmacol.**, v. 66, n. 8, p. 1499–1503, 2003.

QUEIROZ, S.S.; NÓBREGA, F.J. Desnutrição da Gestante: Aspectos Nutricionais na Gestação. **Distúrbios da Nutrição**. 2 ed. São Paulo: Revinter, p. 100-104, 2007.

RAIJMAKERS, M.T. et al. NAD(P)H oxidase associated superoxide production in human placenta from normotensive and pre-eclamptic women. **Placenta**, v. 25, p. S85–S89, 2004.

RAIJMAKERS, M.T. et al. Amino thiols, detoxification and oxidative stress in pre-eclampsia and other disorders of pregnancy. **Curr. Pharm. Des.**, v. 11, p. 711–734, 2005.

REIN, D.T. et al. Preeclamptic women are deficient of interleukin-10 as assessed by cytokine release of trophoblast cells in vitro. **Cytokine**. v. 23, n. 4-5, p. 119-25, 2003.

REYNA-VILLASMIL, E.; BRICEÑO-PEREZ, C.; TORRES-CEPEDA, D. Inmunología, inflamación y preeclampsia. **Rev. Obstet. Ginecol. Venez.**, v. 69, n. 2, p. 97-110, 2009.

RIBAS, J.T. et al. Alterações metabólicas e inflamatórias na gestação. **Rev. Ciênc. Farm. Básica**, v. 36, n. 2, p. 181-188, 2015.

ROBERTS, J.M. et al. ACOG Guidelines: **Hypertension in pregnancy**, 2013.

ROBERTS, J.M.; HUBEL, C.A. Is oxidative stress the link in the two-stage model of pre-eclampsia?. **Lancet**, v. 354, n. 9181, p. S32-S37, 1999.

ROBINS, L.S.; COTRAN, S.R. **Patologia: Bases Patológicas das Doenças** (Robins and Cotran Pathologic Basis of Disease). trad. Maria da Conceição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ROCHA, J. B. T. et al. Aminolevulinate dehydratase (d-ALA-D) as marker protein of intoxication with metals and other pro-oxidantsituations. **Toxicology Research**, v. 1, p. 85-102, 2012.

RODRIGO, R. et al. Pathophysiological basis for the prophylaxis of preeclampsia through early supplementation whith antioxidant vitamins. **Pharmacol. Ther.**, v.107, p.177-197, 2005.

SAHAY, A.S. et al. Regional differences in the placental levels of oxidative stress markers in pre-eclampsia. **Int. J. Gynecol. Obstet.**, v. 129, p. 213–218, 2015.

SALEEM, S. et al. A prospective study of maternal, fetal and neonatal deaths in low- and middle-income countries. **Bull. World Health Organ.**, v. 92, p. 605–612, 2014.

SASSA, S.; FUJITA, H.; KAPPAS, A. **Genetic and chemical influences on heme biosynthesis**. In: A. Kotyk, J. Skoda; V. Paces and V. Kostka (Eds.), *Highlights of modern Biochemistry*, VSP, Utrecht, v.1, p.329-338, 1989.

SAWYER, D. B. Oxidative Stress in Heart Failure: What are we missing?. **Am. J. Med. Sci.**, v. 342, n. 2 , p. 120-124, 2011.

SCHMIDT, M. et al. Detection of circulating trophoblast particles in peripheral maternal blood in preeclampsia complicated pregnancies. **Hypertens. Pregnancy**. v. 27, n. 2, p. 131-142, 2008.

SERDAR, Z. et al. Lipid and protein oxidation and antioxidant function in women with mild and severe preeclampsia. **Arch. Gynecol. Obstet.**, v. 268, p. 19–25, 2003.

SHAKER, O.G.; SADIK, N. a H. Pathogenesis of preeclampsia: Implications of apoptotic markers and oxidative stress. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 32, p. 1170–1178, 2013.

SHEMIN, D. 5-Aminolevulinic acid dehydratase: structure, function, and mechanism. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.**, v.273B, p.109-115, 1976.

SHOOLINGIN-JORDAN, P.M. Structure and mechanism of enzymes involved in the assembly of the tetrapyrrole macrocycle. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 26, n. 3, p. 326-336, 1998.

SIBAI, B.M.; DEKKER, G.A.; KUPLERMINC, M. Preeclampsia. **The Lancet**, v. 365, n. 26, p.785-799, 2005.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Exp. Physiol.**, v. 82, n. 2, p. 291-295, 1997.

SIES, H.; STAHL, W.; SUNDQUIST, A.R. Antioxidant functions of vitamins: vitamins E and C, beta carotene, and other carotenoids. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 669, p. 7–20, 1992.

SILVA, L.S.V. et al. Micronutrientes na gestação e lactação. **Rev. Bras. Saude Mater. Infant.**, v. 7, n. 3, p. 237–244, 2007.

SPEAKMAN, J.R. The physiological costs of reproduction in small mammals. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 363, n. 1490, p. 375-398, 2008.

STARK, M. J.; CLIFTON, V. L.; HODYL, N. A. Differential effects of docosahexaenoic acid on preterm and term placental pro-oxidant/antioxidant balance. **Reproduction**, v. 146, p. 243-251, 2013.

STOCKER R; KEANEY JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiol Rev.**, v. 84, n. 4, p. 1381-1478, 2004.

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.

- TAKAGI, Y. et al. Levels of oxidative stress and redox-related molecules in the placenta in preeclampsia and fetal growth restriction. **Virchows Arch.**, v. 444, n. 1, p. 49-55, 2004.
- TANIYAMA, Y.; GRIENDLING, K.K. Reactive Oxygen Species in the Vasculature: Molecular and Cellular Mechanisms. **Hypertension**, v. 42, p. 1075–1081, 2003.
- TARIQ, S.A. Role of Ascorbic Acid in Scavenging Free Radicals and Lead Toxicity from Biosystems. **Mol. Biotechnol.**, v. 37, p. 62-65, 2007.
- THOMPSON, J.; JONES, D.D.; BEASLEY, W.H. The effect of metal ions on the activity of delta-aminolevulinic acid dehydratase. **Br. J. Ind. Med.**, v. 34, n. 1, p. 32-36, 1977.
- TIMBRELL, J. **Principles of Biochemical Toxicology**. 3<sup>a</sup> ed. London: Taylor & Francis, 2000.
- TRINDADE, C.E.P.; RUGOLO, L.M.S.S. Free radicals and neonatal diseases. **Neoreviews**, v. 8, p. 522-532, 2007.
- VALENTINI, J. et al. The influence of the hemodialysis treatment time under oxidative stress biomarkers in chronic renal failure patients. **Biomed. Pharmacother.**, v. 62, n. 6, p. 378-82, 2008.
- VAN MEETEREN, M.E. et al. Antioxidants and polyunsaturated fatty acids in multiple sclerosis. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 59, n. 12, p. 1347-1361, 2005.
- VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quím. Nova**, v.30, n.5, p. 1323-1338, 2007.
- VON TEMPELHOFF, G. F. et al. Mean maternal second-trimester hemoglobin concentration and out come of pregnancy: a population-base study. **Clin. Appl. Thromb. Hemost.**, v. 14, p. 19-28, 2008.
- WALSH, S.W. Maternal-placental interactions of oxidative stress and antioxidants in preeclampsia. **Semin. Reprod. Endocrinol.**, v. 16, n. 1, p. 93-104, 1998.
- WARREN, M.J. et al. Lead poisoning, haem synthesis and 5-aminolevulinic acid dehydratase. **Trends Biochem. Sci.**, v. 23, p. 217-221, 1998.
- WEBSTER, R. P.; ROBERTS, V. H.; MYATT, L. Protein nitration in placenta – functional significance. **Placenta**, v. 29, p. 985–994, 2008.
- WHO. Guideline: **Daily Iron and Folic Acid Supplementation in Pregnant Women**; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2012.
- WILSON, M.L. et al. Molecular epidemiology of preeclampsia. **Obstet. Gynecol. Survey**, v. 58, p. 39-65, 2003.

YANG, Y.; GUAN, X. Rapid and thiol-specific high-throughput assay for simultaneous relative quantification of total thiols, protein thiols, and nonprotein thiols in cells. **Anal Chem.**, v. 6, n. 87 (1), p. 649-655, 2015.

YOUNG, B.C; LEVINE, R.J.; KARUMANCHI, S.A. Pathogenesis of Preeclampsia. **Annu. Rev. Pathol.**, v.5, p.173-192, 2010.

ZANINI, D. et al. d-Aminolevulinate Dehydratase Activity in Lung Cancer Patients and Its Relationship With Oxidative Stress. **Biomed. Pharmacother.**, v. 68, p. 603–609, 2014.

ZHUANG, T.; HAN, H.; YANG, Z. Iron, Oxidative Stress and Gestational Diabetes. **Nutrients**, v. 6, p. 3968-3980, 2014.

ZIMMERMANN, M.B.; HURRELL, R.F. Nutritional iron deficiency. **Lancet**, v. 370, p. 511–20, 2007.

## ANEXOS

## ANEXO A – Comprovante de submissão do artigo à revista Biomedicine &amp; Pharmacotherapy

BIOMEDICINE &amp; PHARMACOTHERAPY



Thissiane Gonçalves | My Journals | Log Out | Help

EVISE\*

[Home](#) [Reports](#)

## My Author Tasks

[Start New Submission](#)[Click here](#) to view your submissions with a final decision

## My Submissions that need Revisions (1)

Delta-aminolevulinatase activity and oxidative stress markers in preeclampsia

BIOPHA\_2016\_841\_R1

Current status: [Submit Revision \(02/Aug/2016\)](#) | [Revision Due Date:](#)

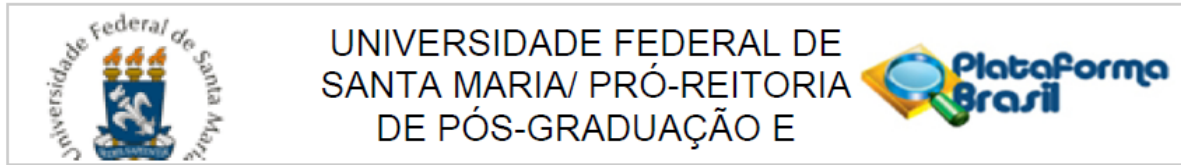
Article Type: Research Paper

Initial submission : 01/Jun/2016

[Refresh page](#) to check status



## ANEXO B – Parecer consubstanciado do CEP



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em gestantes com pré-eclâmpsia

**Pesquisador:** thissiane de lima gonçalves

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 22771613.6.0000.5346

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

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.218.986

**Apresentação do Projeto:**

Pela emenda a proponente solicitou a inclusão, no projeto, do Posto de Saúde José Erasmo Crossetti em Santa Maria-RS enquanto local de coleta de dados. Justifica tal inclusão pela necessidade de um maior número de participantes no referido projeto.

Pelo que foi apresentado, pode-se aprovar a emenda.

**Objetivo da Pesquisa:**

.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

.

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

**Bairro:** Camobi

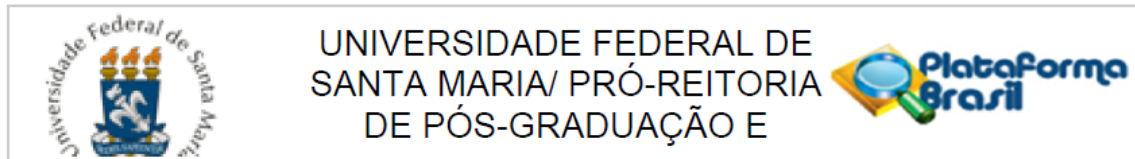
**CEP:** 97.105-970

**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: 1.218.986

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

.

**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:**

.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

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

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Parecer Anterior	Digitalizar0050.pdf	30/09/2013 09:20:18		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Digitalizar0052.pdf	30/09/2013 09:28:18		Aceito
Parecer Anterior	Digitalizar0053.pdf	30/09/2013 09:31:13		Aceito
Folha de Rosto	Digitalizar0049.pdf	01/10/2013 08:59:35		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Estresse Oxidativo Gestantes.doc	24/10/2013 09:09:57		Aceito
Outros	Digitalizar0069.pdf	24/10/2013 09:12:58		Aceito
Outros	autorizacao.jpeg	03/09/2015 11:09:43	thissiane de lima goncalves	Aceito
Outros	Projeto.doc	03/09/2015 11:12:10	thissiane de lima goncalves	Aceito
Outros	Emenda.jpg	03/09/2015 11:13:57	thissiane de lima goncalves	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_584784_E1.pdf	03/09/2015 11:14:39		Aceito

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

**Bairro:** Camobi

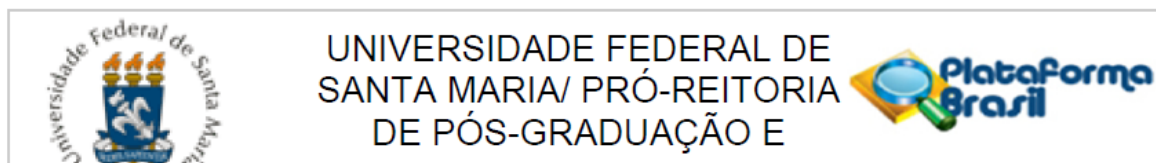
**CEP:** 97.105-970

**UF:** RS

**Município:** SANTA MARIA

**Telefone:** (55)3220-9362

**E-mail:** cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.218.986

**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 C – Produção bibliográfica obtida durante o período de realização do mestrado:**

Artigos publicados em periódicos:

1. De Lucca, Leidiane; Rodrigues, Fabiane; Jantsch, Letícia; Neme, Walter; Gallarreta, Francisco; Gonçalves, Thissiane. Oxidative Profile and  $\delta$ -Aminolevulinic Dehydratase Activity in Healthy Pregnant Women with Iron Supplementation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 13, p. 463, 2016.
2. De Lucca, L.; Gallarreta, F.M.P.; Gonçalves, T.L. Oxidative Stress Markers in Pregnant Women with Preeclampsia. *American Journal of Medical and Biological Research*, v. 3, p. 68-73, 2015.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumos):

1. De Lucca, L.; Rodrigues, F.; Gonçalves, T.. Avaliação da Atividade da Enzima Delta-Aminolevulinato Desidratase em Gestantes com Pré-Eclampsia. In: **XVIII Congresso Gaúcho de Ginecologia e Obstetrícia**, 2015, Porto Alegre.
2. Jantsch, L. B.; Rodrigues, F.; De Lucca, L.; Gonçalves, T. Avaliação dos Níveis de TBARS e Vitamina C em Gestantes com Diabetes Mellitus Gestacional. In: **3º Congresso Internacional em Saúde: Atenção Integral à Saúde**, 2015, Ijuí.
3. De Lucca, L.; Nicoli, B. D. ; Rodrigues, F.; Gonçalves, T.L. Quantificação da Vitamina C em Gestantes com pré-Eclâmpsia. In: **VIII Congresso Internacional de Bioanálises, XI Congresso Sul Brasileiro de Biomedicina e XV Semana Gaúcha de Biomedicina**, 2015, Novo Hamburgo.
4. Rodrigues, F.; De Lucca, L.; Jantsch, L.; Gonçalves, T. Estimação da concentração de Ácido Ascórbico no Plasma de Gestantes Diabéticas do Tipo 2. In: **VIII Congresso Internacional de Bioanálises, XI Congresso Sul Brasileiro de Biomedicina e XV Semana Gaúcha de Biomedicina**, 2015, Novo Hamburgo.
5. Campos, A. G.; De Lucca, L.; Jantsch, L. B.; Gonçalves, T. Realização do Exame de Papanicolaou em Gestantes atendidas no Hospital Universitário de Santa Maria. In: **30ª Jornada Acadêmica Integrada da Universidade Federal de Santa Maria**, 2015, Santa Maria.

Premiações:

1. Autor do trabalho premiado como melhor trabalho científico na área de obstetrícia - Avaliação da Atividade da Enzima Delta-Aminolevulinato Desidratase em Gestantes com Pré-Eclampsia. In: **XVIII Congresso Gaúcho de Ginecologia e Obstetrícia**, 2015, Porto Alegre.