

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

Letícia Bigolin Jantsch

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
GESTANTES GEMELARES**

Santa Maria, RS
2018

Letícia Bigolin Jantsch

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
GESTANTES GEMELARES**

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^a Dr^a. Thissiane de Lima Gonçalves Bernasconi

Santa Maria, RS

2018

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

Bigolin Jantsch, Leticia
AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
GESTANTES GEMELARES / Leticia Bigolin Jantsch.- 2018.
82 p. ; 30 cm

Orientador: Thissiane de Lima Gonçalves Bernasconi
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2018

1. Gestação gemelar 2. Estresse oxidativo 3.
Lipoperoxidação 4. Delta-aminolevulinato-desidratase I.
de Lima Gonçalves Bernasconi, Thissiane II. Título.

Letícia Bigolin Jantsch

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
GESTANTES GEMELARES**

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**

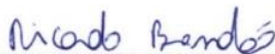
Aprovado em 5 de janeiro de 2018:



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



Natalia Brueker, Dra. (UFSM)



Ricardo Brandão, Dr (UFPE)

Santa Maria, RS

2018

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais Roque e Rosane Beatriz, pelo amor e dedicação incondicional que sempre me deram, por toda a luta diária em prol a minha felicidade e por serem meu alicerce durante toda essa caminhada.

Sou grata por tudo, amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me manter forte durante a caminhada, me dar sabedoria, paciência, desafios novos, alegrias e muitas conquistas. Também agradeço a Ele pelas amizades que me proporcionou e as que manteve presente em minha vida.

A minha orientadora Thissiane por acreditar em mim, pela paciência e compreensão das novas experiências e desafios que vieram, pela ajuda constante, pela tranquilidade e otimismo durante todo o experimento. Tens papel importante na profissional que sou, me acolheu desde o início e manteve-se presente durante todo o período acadêmico. Muito obrigada por tudo, pela sabedoria, dedicação e carinho recebido durante todos esses anos.

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

Aos meus pais, Roque e Rosane, por nunca me deixarem desistir dos meus objetivos e por manterem meus sonhos sempre acessos, vocês são maravilhosos! Amo vocês!

Aos meu namorado, Fellipe por ser meu melhor amigo, pelo amor e cuidado diário que demonstra, ouvindo minhas reclamações e me dando força, acreditando em mim! Obrigada amor, você é incrível e muito importante nessa conquista. Te amo!

Ao meu irmão Leonardo, pela parceria diária, pela companhia durante todos esses anos e pela ajuda de irmão mais velho. Te amo!

A minha família, avós e avôs, tios e tias, primos e primas, pelo amor, carinho e apoio de sempre, agradeço especialmente a minha dinda Claudina por estar sempre pronta para me ajudar, incentivar e acreditar em mim.

As minhas amigas de faculdade, Everlin, Jocieli, Larissa e Isadora por me darem força para não desistir e seguir em frente. Mesmo longe sei que estão torcendo por essa conquista e vocês fazem parte dela!

A minha amiga e companheira de faculdade e de mestrado, Gabriela, obrigada por estar sempre pronta para me ajudar, me ouvir e me dar força, acreditando sempre que tudo daria certo. Obrigada!

As meninas do laboratório, Bárbara, Silmara e Hellen pela companhia, pela ajuda mútua e pelas risadas diárias. Em especial agradeço a Leidiane por toda a ajuda e conhecimento repassado, esse mestrado seria mais difícil sem você! Obrigada meninas!

Aos funcionários do DACT, pelo acolhimento e ajuda diária. Muito obrigada!

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 pela disponibilidade e boa vontade nos dias de coleta.

Um agradecimento muito especial a todas as minhas gestantes gemelares pela boa vontade e participação na pesquisa.

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

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM GESTANTES GEMELARES

AUTORA: Letícia Bigolin Jantsch

ORIENTADORA: Thissiane de Lima Gonçalves Bernasconi

Gestações gemelares são consideradas de alto risco obstétrico devido a várias morbidades frequentemente presentes devido ao aumento de fornecimento de compostos metabólicos aos fetos e ao elevado consumo de oxigênio pela unidade feto-placentária, levando a ocorrência de estresse oxidativo e dano celular materno. O estresse oxidativo está presente fisiologicamente durante todo o período gestacional devido principalmente a abundante atividade placentária presente em razão da alta concentração de oxigênio, abundante massa mitocondrial, rica vascularização e baixa capacidade antioxidante endógena, torna-se a principal fonte de espécies reativas de oxigênio na gestação. No entanto há poucas informações sobre as gestações gemelares, assim, esse estudo teve como objetivo avaliar o estatus oxidativo materno em gestantes gemelares, através da determinação de parâmetros indicadores de dano oxidativo no sangue materno em resposta a presença de dois fetos, bem como a relação da placenta com o aumento ou não do estatus oxidativo nessas gestantes e a possível relação com algumas complicações gestacionais, tais como diabetes mellitus gestacional e pré-eclâmpsia. Deste modo foram quantificados as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), grupamentos tióis proteico (P-SH) e não proteico (N-PSH), vitamina C (VIT C), bem como a atividade da catalase (CAT) e da enzima delta aminolevulinico desidratase (δ -ALA-D) como marcador indireto de estresse oxidativo em amostras de sangue de gestantes gemelares (n=30) e de feto único (n=30). Como resultado, o TBARS foi significativamente maior em gestantes gemelares, grupamentos tióis, VIT C e CAT apresentaram-se significativamente menores nessas gestantes além da atividade da δ -ALA-D estar reduzida em relação as gestantes de feto único. O estudo demonstrou um aumento no estresse oxidativo e uma diminuição da capacidade antioxidante em gestantes gemelares, sugerindo que as complicações presentes nessas gestações podem estar relacionadas ao desequilíbrio entre os níveis de oxidantes e antioxidantes.

Palavras-chave: Gestação gemelar. Estresse oxidativo. Lipoperoxidação. δ -ALA-D.

ABSTRACT

EVALUATION OF OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN TWINNESS PREGNANT

AUTHOR: Letícia Bigolin Jantsch

ADVISOR: Thissiane de Lima Gonçalves Bernasconi

Twin pregnancies are considered to be of high obstetric risk due to several morbidities frequently present due to the increased supply of metabolic compounds to fetuses and the high oxygen consumption by the fetus-placenta unity, leading to the occurrence of oxidative stress and maternal cellular damage. Oxidative stress is present physiologically throughout the gestational period due mainly to the abundant placental activity present due to the high concentration of oxygen, abundant mitochondrial mass, rich vascularization and low endogenous antioxidant capacity, it becomes the main source of reactive oxygen species in the gestation. However, there is little information on twin pregnancies, so this study aimed to evaluate maternal oxidative status in twin pregnant women by determining parameters indicative of oxidative damage in maternal blood in response to the presence of two fetuses, as well as the relationship of the placenta with the increase or not of the oxidative status in these pregnant women and the possible relation with some gestational complications, such as gestational diabetes mellitus and pre-eclampsia. In this way, thiobarbituric acid reactive species (TBARS), proteolytic (P-SH) and non-protein thiol groups (N-PSH), vitamin C (VIT C), as well as catalase (CAT) and enzyme activity delta aminolevulinic dehydratase (δ -ALA-D) as an indirect marker of oxidative stress in blood samples from twin (n = 30) and single fetus (n = 30) pregnant women. As a result, TBARS was significantly higher in twin pregnant women, thiols groupings, VIT C and CAT were significantly lower in these pregnant women than δ -ALA-D activity was reduced in relation to single-fetus pregnant women. The study demonstrated an increase in oxidative stress and a decrease in antioxidant capacity in twin pregnant women, suggesting that the complications present in these pregnancies may be related to the imbalance between levels of oxidants and antioxidants.

Keywords: Twin pregnancy. Oxidative stress. Lipoperoxidation. δ -ALA-D.

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1- Fisiologia das gestações gemelares, diferenças entre corionicidade e amniocidade em gêmeos mono e dizigóticos	18
Figura 2- Variação da concentração de O ₂ no espaço intervilo da placenta durante a gestação.....	22
Figura 3- Capacidade antioxidante total (TAC) em ascensão com o aumento da idade gestacional	24
Figura 4- Formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) através da redução do oxigênio molecular até a formação de água	26
Figura 5- Origem das principais EROs e processamento de destoxificação por antioxidantes exógenos e endógenos	28
Figura 6- Esquema representativo das principais enzimas antioxidantes.....	30
Figura 7- Formação de porfobilinogênio através de duas moléculas de ALA	33

MANUSCRITO

Fig A-Activity of the δ -ALA-D enzyme in twin (n=30) and single fetus (n=30) pregnant women.....	54
Fig B- Reactivation rate of δ -ALA-D enzyme in twin (n=30) and single fetus (n=30) pregnant women.....	55

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Table 1- Clinical and demographic characteristics of twin and single-pregnants	51
Table 2- Pregnant women hematological and biochemical parameters.	52
Table 3- Biomarkers of oxidate stress and antioxidants in twin and single pregnants ..	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALA	Ácido 5-aminolevulínico
ATP	Adenosina Trifosfato
BMI	Body mass index
CAT	Catalase
Cu	Cobre
DA	Diamniótico
DC	Dicoriônico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTNB	5',5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico)
DTT	Ditiotreitol
DZ	Dizigótico
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FR	Free radicals
GA	Gestational age
GSH	Glutathiona reduzida
GPX	Glutathiona peroxidase
GSR	Glutathiona redutase
GSSG	Glutathiona oxidada
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
MA	Monoamniótico
MC	Monocoriônico
MZ	Monozigótico
MDA	Malondialdeído
NB	Newborn
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NP-SH	Non-protein thiol groups
O ₂ ⁻	Radical superóxido
OH·	Radical hidroxil
RL	Radical Livre
RN	Recém Nascido
P-SH	Protein thiol groups
RO·	Radical peroxil
ROO·	Radical alcóxil
ROOH	Hidroperóxido orgânico
ROS	Reactive oxygen species
SD	Standard deviation
SOD	Superóxido dismutase
STGG	Síndrome de Transfusão Gêmeo-gemelar
TAC	Capacidade Antioxidante Total
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
VIT C	Vitamin C
δ-ALAD	Delta-aminolevulinato-desidratase

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Comprovante de submissão do artigo à revista <i>Reproductive Science</i>	75
ANEXO B – Parecer consubstanciado do CEP.....	76

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	14
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	16
1.1.1 Gestações Múltiplas	16
1.1.2 Gestação e estresse oxidativo	20
1.1.3 Estresse oxidativo	25
1.1.4 Enzima Delta-Aminolevulinato Desidratase	32
1.2 PROPOSIÇÃO	34
1.2.1 Proposição Geral	34
1.2.2 Proposições Específicas	34
1.3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
2 MANUSCRITO - Evolution of oxidative stress and d-aminolevulinic acid dehydratase activity in twin pregnancies	36
3 DISCUSSÃO	56
4 CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS	61
ANEXOS	75

1 APRESENTAÇÃO

A condição gravídica, embora seja um processo fisiológico, desencadeia no corpo materno modificações anatômicas, metabólicas e psicológicas que culminam nas mais diversas alterações na estrutura e nos processos fisiológicos da gestante a fim de sustentar a mãe e promover o crescimento e a manutenção do feto em desenvolvimento (WU et al., 2016). As gestações podem ser de feto único, ou fetos múltiplos que incluem a gestação gemelar. A incidência de gestações gemelares no Brasil em 2015, segundo o DATASUS (Sistema Único de Saúde), representou cerca de 2% das gestações naquele ano (BRASIL, 2015).

As gestações gemelares são diferentes daquelas de feto único, devido à necessidade e fornecimento aumentado de compostos metabólicos e nutrição aos fetos, o que implica em maiores modificações do corpo materno bem como apresenta maior repercussão no feto, quando comparados a gestações de feto único (COELHO, 2011). Tais alterações são caracterizadas pelo aumento do consumo das demandas metabólicas maternas pelos fetos e ao elevado consumo de oxigênio em diferentes órgãos incluindo a unidade fetoplacentária (GÜR et al., 2011) que implicam na ocorrência de estresse oxidativo e conseqüentemente no dano celular materno (SHARMA; AGARWAL, 2004; TIWARI et al., 2010). Portanto, as gestações gemelares apresentam maior incidência de riscos perinatais para mãe, feto e recém-nascido se comparado com uma gestação com feto único, tais como aborto, prematuridade, pré-eclâmpsia, síndrome de transfêrencia gêmeo-gêmeo e maior mortalidade perinatal (CHAUHAN et al., 2010; JAUNIAUX et al., 2013; STEENHAUT; HUBINONT, 2015; SUNDERAM et al., 2014).

No processo gravídico, mesmo sendo um processo fisiológico é um estado de estresse oxidativo (TIWARI et al., 2010) que está intimamente associado à uma variedade de doenças maternas, que acometem tanto a mãe quanto o feto como na diabetes gestacional (RODRIGUES et al., 2017), pré-eclâmpsia (DE LUCCA et al., 2016), e hipertensão gestacional (DRAGANOVIC et al., 2016).

O estresse oxidativo é proeminente na placenta (ERDEM et al., 2012) devido as variações dramáticas nos níveis de oxigênio que ocorrem nesse órgão durante a gravidez, onde no primeiro trimestre de gestação, apresenta baixa concentração de oxigênio, favorecendo a proliferação trofoblástica (HANSSON et al., 2014) e, à medida que amadurece fica exposta a altas concentrações de oxigênio que em conjunto com sua

abundante massa mitocondrial, aumento de hormônios, ácidos graxos e lipídeos circulantes favorecem a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e o dano celular (CASANUEVA;VITERI, 2003; KWIECIEN et al., 2014; MANKUTA et al., 2010; MUELLER et al., 2005; SAGRILLO-FAGUNDES et al., 2016). No primeiro trimestre, por apresentar baixa concentração de enzimas antioxidantes torna-se mais susceptível a danos mediados por EROs (TOESCU et al., 2002).

Os antioxidantes são importantes para a manutenção da função celular durante a gestação e mesmo sendo a principal geradora de substâncias pró-oxidantes a placenta também é a principal fonte de antioxidantes endógenos como a catalase, glutatio na peroxidase e a superóxido dismutase (CINKAYA et al., 2010; MUELLER et al., 2005). Existe uma variedade de mecanismos antioxidantes responsáveis por neutralizar os radicais livres levando ao equilíbrio e a neutralização das EROs presentes fisiologicamente na gestação inibindo a oxidação e impedindo a sua sobre-produção e assim manter o bem-estar fetal e o bom andamento gestacional. Esses mecanismos incluem antioxidantes endógenos e exógenos (DURACKOV, 2010; RIZZO et al., 2012) e a enzima sulfidrílica delta-aminolevulinato-desidratase (δ -ALA-D), que quando inibida leva a um acúmulo do seu substrato 5-aminolevulinato (ALA) e uma exacerbada produção de espécies reativas de oxigênio levando a lesões oxidativas nas biomoléculas bem como no esgotamento do sistema antioxidante do organismo, estando assim diretamente relacionada ao estresse oxidativo (BAIERLE et al., 2010) e a diversas patologias (ROCHA et al., 2012).

Mesmo com as alterações metabólicas maternas, sabe-se que o organismo materno, naturalmente, foi preparado para acomodar um único feto, assim, as gestações múltiplas apresentam particularidades e necessidade de fornecimento energético/oxidativo para um número maior de embriões/fetos que compartilham um mesmo ambiente (COELHO, 2011). No entanto existem poucos estudos na literatura abordando as gestações gemelares e suas singularidades, sendo assim, torna-se relevante avaliar e conhecer o estatus oxidativo materno nessas gestantes, dado ainda não estudado, através de parâmetros de estresse oxidativo e avaliação da atividade da enzima δ -ALA-D bem como a relação da placenta com o aumento ou não do estatus oxidativos nessas gestações, consideradas de alto risco.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Gestações Múltiplas

Gestações múltiplas são definidas por possuírem dois ou mais conceptas em desenvolvimento no útero, ou raramente nas trompas, oriundos de mais de um zigoto ou na divisão do mesmo, independente do número de embriões/fetos. Essas gestações são classificadas como duplas ou gemelares, triplas, quádrupla, quántupla e assim por diante, sendo que cada produto da gestação gemelar é um gêmeo (MONTENEGRO; REZENDE 2010).

A incidência de gestações gemelares, segundo o Ministério da Saúde no ano de 2014 foi de 2,00/ 100 nascidos vivos (BRASIL, 2015) e estes compreendem aproximadamente mais de 95% dos nascimentos múltiplos (COELHO, 2011). A gestação múltipla, também pode ser classificada de acordo com a sua zigoticidade, que refere-se ao tipo de concepção. Os gêmeos podem ser monozigóticos (MZ) oriundos de um único zigoto que se divide a partir da fecundação de um óvulo e um espermatozóide ou dizigóticos (DZ) que é resultado de dois óvulos distintos fecundados (CONSTANTINE; WILKINSON, 2015).

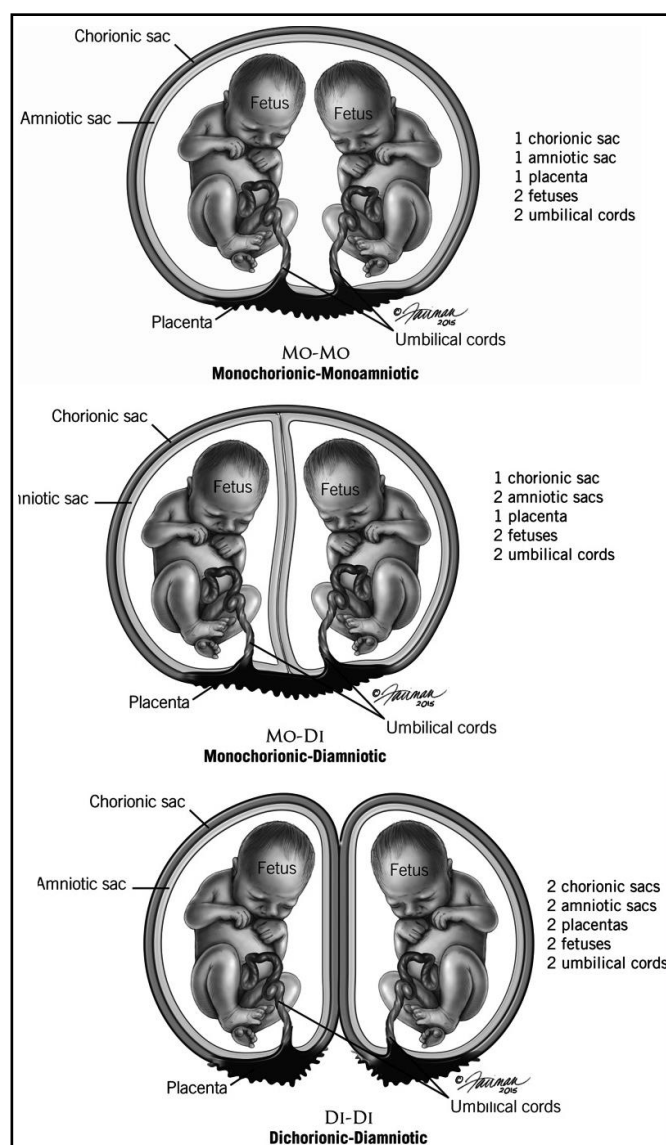
A incidência de gêmeos MZ é bastante constante, porém a de DZ varia consideravelmente e está relacionada a diversas causas. A etiologia de gestações DZ se deve a vários fatores como a idade materna, a história familiar materna, os níveis de gonadotrofinas, a etnicidade, o uso de tecnologia de concepção artificial além de fatores ambientais e alimentares, já a causa de MZ não é bem esclarecida mas pode ser relacionada a fatores ambientais e genéticos maternos (GREENE, 2013; SHUR, 2009; WEBER; SEBIRE, 2010).

Todas as gestações DZ, que correspondem a 75% das gestações gemelares são dicoriônicas, ou seja, cada embrião possui a sua própria placenta e membrana coriônica, portanto necessariamente devem ser diamnióticos, onde cada embrião possui seu próprio âmnio e desenvolve sua própria circulação amniótica, corionária e placentária. (PAEPE, 2015). Os gêmeos monozigóticos podem ser monocoriônicos (MC) ou dicoriônicos (DC) e monoamnióticos (MA) ou diamnióticos (DA) dependendo de quando ocorreu à divisão mitótica após a fertilização, período responsável por determinar padrões de amnionicidade e corionicidade (CONSTANTINE; WILKINSON, 2015).

Portanto, como demonstra a Figura 1, o corion é a membrana fetal mais externa que contém o saco amniótico e que liga o amnio, saco amniótico e o feto a placenta contribuindo para o desenvolvimento fetal e placentário, enquanto o amnion é a membrana fetal interna que protege o feto e que contém o líquido amniótico (MARCEAU et al., 2016). Acredita-se que o momento da divisão do embrião é que determine a corionicidade e a amniocidade, onde clivagem posterior, entre 4 e 13 dias leva a gêmeos MC já a anterior que ocorre antes de 4 dias a gêmeos DC, o mesmo para amniocidade, clivagem posterior ente 8-13 dias leva a MA enquanto a anterior, antes dos 8 dias em DA (PAEPE, 2015; HALL, 2003; MARCEAU et al., 2016).

A corionicidade deve ser determinada em 99% no primeiro trimestre de gestação, o mais rápido possível a fim de otimizar o manejo com essas gestantes (CONSTANTINE; WILKINSON, 2015), pois de 15- 25% dos gêmeos MC apresentam em pelo menos um gêmeo restrição de crescimento (FOX et al., 2011), e 10-15% das gestações MC apresentam complicação por Síndrome de Tranfusão Gêmeo-gemelar (STGG), risco de 12% de aborto espontâneo e mortalidade maior nessas gestações (HACK et al., 2009; RAO et al., 2004).

Figura 1. Fisiologia das gestações gemelares, diferença entre corionidade e amniocidade em gêmeos mono e dizigóticos.



Fonte: Adaptado de MARCEAU et al., 2016.

Em gestação gemelar se comparado com as de feto único o peso placentário começa a ficar pra trás somente a partir da 20^a semana (BLEKER; OOSTING, 1997), e o crescimento intra-uterino começa a discrepar a partir da 32^a de gestação (CORSELLO; PIRO, 2010), sendo proposto que o ambiente intra-uterino fica restrito e limita o crescimento dos fetos de forma fisiológica (HOFMEYR et al., 2015). Os movimentos fetais diminuem e a atividade respiratória aumenta no terceiro trimestre a fim de melhorar e aprimorar a maturação pulmonar e a oferta útero-placentária começa a diminuir a fim de se adaptar ao parto pré-termo (MULDER et al., 2012) que acomete cerca de 15% de todos os nascimentos vivos pré-termos (ANANTH et al., 2004).

As gestações múltiplas apresentam maior morbidade e mortalidade materna e neonatal comparadas com gestações únicas e estão associadas diretamente a distúrbios do cordão umbilical e da placenta, ou seja desenvolvimento, posição e vascularização anormais podem influenciar diretamente essas gestações (STEENHAUT; HUBINOT, 2015). Parto prematuro, infecções no trato urinário, restrição de crescimento uterino, placenta prévia, insuficiência feto-placentária, ameaça de interrupção de gravidez, placentação anormal, morte fetal intra-uterina, anemia, deslocamento prematuro da placenta, diabetes gestacional e pré-eclampsia são algumas das complicações que acometem mais de 80% das gestações múltiplas em comparação a apenas 25% das gestações únicas (BARANOV et al., 2012; CARROLL et al., 2005; PRAPAS et al., 2006). O aborto em gemelares apresenta uma taxa de 54,3%, muito maior se comparada as de feto único que varia de 15 -20%, sendo que de 75-80% dos abortos espontâneos ocorrem nas fases iniciais da gestação, até o fim do primeiro trimestre, podendo passar despercebidas (BARANOV et al., 2012). Também apresentam complicações específicas da gemelaridade como na síndrome de transfusão gêmeo-gemelar (STGG), gêmeos unido, desenvolvimento discordante, morte de um feto e feto acárdico (CARROLL et al., 2005; PRAPAS et al., 2006).

Entre gestações de gêmeos, em média 60% dos recém-nascidos (RN) são prematuros de aproximadamente 32 semanas (MARTON, 2006), e isso inclui cuidados mais intensivos e maiores complicações de curto e longo prazo resultando em uma taxa de mortalidade infantil de gêmeos 5 vezes maior do que RN únicos (BERGH et al., 2015). A expressão de enzimas antioxidantes atinge a concentração ideal apenas no final da gestação sendo assim, RN pré-termos são portanto mais susceptíveis ao estresse oxidativo fisiológico que ocorre durante a transição materno-fetal e assim muitas doenças neonatais estão envolvidas com o estresse oxidativo presente (HACK et al., 2009; NIKKELS et al., 2008). Convulsões neonatais, escore baixo de Apgar (Índice de Apgar) em um e cinco minutos e morbidade respiratórias apresentaram ser maiores em gêmeos se comparado com RN únicos em peso semelhante além de maiores riscos para defeito congênitos do que únicos devido ao desenvolvimento de dois fetos em vez de um (CHAUHAN et al., 2010; STEENHAUT; HUNONT, 2015).

As gestações gemelares apresentam algumas características específicas dessa gestação uma vez que o corpo materno está preparado para manter um feto, assim dois ou mais, acabam sobrecarregando o útero (KENT et al., 2012). Gemelares apresentam um aumento em hormônios placentários como o beta-hCG e o estradiol mais do que duas

vezes em relação ao encontrado em gestações únicas devido ao aumento da massa placentária nessas gestações (POVOA et al., 2017). Também apresentam níveis mais altos de estrogênio, lactogênio placentário e progesterona, que podem contribuir com os maiores índices de diabetes mellitus gestacional pois estão envolvidas à resistência a insulina (KAZER et al., 1991; KUHL et al., 1998; SPELLACY et al., 1978).

A placenta tem capacidade de se adaptar e ajustar-se as variações da gestação desenvolvendo respostas curtas e duradouras, funcionais e morfoestruturais a fim de manter uma gestação adequada que incluem níveis adequados de oxigênio e a formação de espécies reativas de oxigênio em condições normais (HERRERA et al., 2014). Estresse oxidativo em gestação gemelar humana ainda não foi estudado, entretanto, Gür e colaboradores (2011) investigaram em ovelhas com penhez múltiplas demonstrando aumento na concentração de MDA e diminuição na capacidade antioxidante dessas ovelhas em relação as gestações únicas. Portanto gestações gemelares dicoriônicas apresentam duas placentas e gestações monócóricas uma placenta maior e como consequência maior massa placentária, atividade mitocondrial, mais fosfolípidos nas placentas, aumento nos lípidos circulantes, estado hormonal alterado e o aumento da necessidade de oxigênio presente nas gestação gemelares provavelmente estejam relacionadas a um maior estresse oxidativo levando a importância de investigar esses parâmetros nessas gestações.

1.1.2 Gestação e estresse oxidativo

A gravidez mesmo em condições fisiológicas normais é uma condição de estresse oxidativo, em que muitas funções metabólicas e fisiológicas maternas são alteradas levando a um alto consumo metabólico e uma maior necessidade de oxigênio por diferentes órgãos incluindo a unidade feto-placentária a fim de sustentar a mãe e promover a manutenção e o crescimento do feto em desenvolvimento, ambos susceptíveis ao estresse oxidativo durante esse período (CASANUEVA; VITERI, 2003; GARREL et al., 2010; GÜR et al., 2011; MENON et al., 2011; SBRANA et al., 2011).

A causa do aumento do estresse oxidativo ainda não é bem elucidada, contudo, estudos sugerem que a placenta seja a responsável pela maior parte da produção de estresse oxidativo durante a gestação (HUNG; BURTON, 2006; MUELLER et al., 2005). A placenta influencia diretamente na homeostase materna pois é rica em mitocôndrias consumindo cerca de 1% da taxa metabólica basal da gestante além de ser altamente

vascularizada e sofrer alterações dramáticas nos níveis de oxigênio durante todo o período gestacional (CASANUEVA; VITERI, 2003; GÜR et al., 2011; SANGRILLO-FAGUNDES et al., 2016).

A placenta é responsável pela troca de oxigênio e nutrientes como aminoácidos, carboidratos, oxigênio, minerais, também hormônios esteroides e peptídicos e outros produtos metabólicos entre os sistemas circulatórios materno e fetais a fim de garantir crescimento e desenvolvimento fetal ideal além de ajudar a proteger o feto de doenças infecciosas, xenobióticos e doenças maternas (MYATT, 2010; SULTANA et al., 2017). Sendo assim, é necessário um funcionamento adequado desse órgão a fim de um bom resultado gestacional.

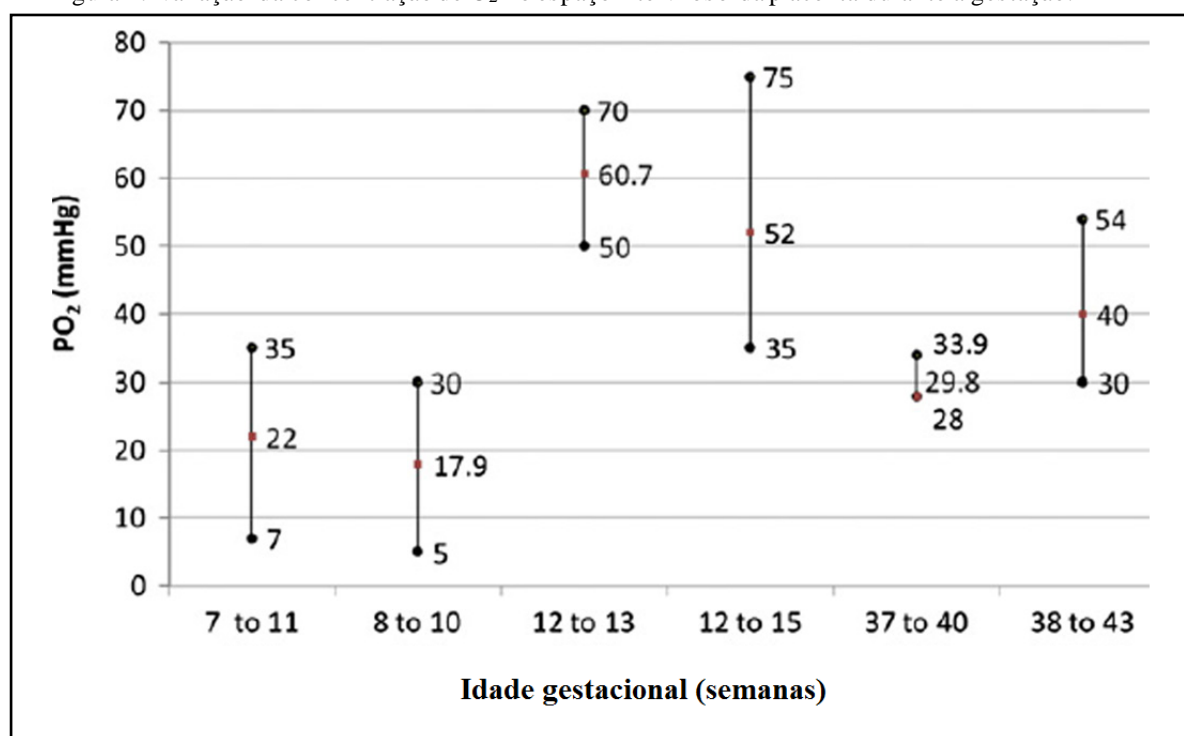
O sinciotrofoblasto da placenta é um tecido que realiza diversas funções na placenta que incluem o transporte ativo de aminoácidos, bombeamento iônico e secreção de fatores de crescimento e citocinas, no entanto, ele apresenta uma grande quantidade de mitocôndrias e retículo endoplasmático (BURTON et al., 2017). Ambas estão envolvidas no estresse oxidativo placentário devido a geração de radicais superóxido através das transferências de elétrons pela cadeia de transporte de elétrons, sendo particularmente significativa em condições de hipóxia (BURTON et al., 2017).

As células germinativas são sensíveis as mudanças de estresse oxidativo, sendo assim, o ambiente uterino é relativamente hipóxico para permitir a organogênese inicial, a pré-implantação do embrião e a regulação de fatores angiogênicos como o de crescimento endotelial vascular e o de desenvolvimento placentário (DENNERY, 2010; TUULI et al., 2011). Durante praticamente todo primeiro trimestre, até 10 semanas de gestação, os níveis de oxigênio placentário são relativamente baixos em torno de 20mmHg (2% de O₂) (SAGRILLO-FAGUNDES et al., 2016; TUULI et al., 2011) em consequência da falta do estabelecimento da circulação intra-placentária materna em função do bloqueio por tampões endovasculares de trofoblastos que invadem as artérias espirais uterinas (BURTON; JAUNIAUX, 2011; LEAL et al., 2011; MISTRY; WILLIAMS, 2011). A unidade placentária nesse período utiliza como fonte de energia caminhos metabólicos como açúcares não fosforilados que não necessitam de altos níveis de oxigênio para funcionar e assim protegem contra os efeitos teratogênicos das EROs durante esse período (JAUNIAUX et al., 2013).

Para que a gravidez normal progrida normalmente, a transição de um ambiente hipóxico para normóxico é de vital importância (BASU et al., 2015). A medida que a circulação materna é restaurada no final do primeiro trimestre pela perda de trofoblastos

endovasculares, entre 10-12 semanas, e o sangue materno perfura o espaço intervilloso da placenta, a concentração de oxigênio na placenta aumenta várias vezes (JAUNIAUX et al., 2003; RODESCH et al., 1992; TUULI et al., 2011), como mostra a Figura 2, resultando em lesão hipóxia-reoxigenação que induz a níveis de EROs máximos e uma explosão oxidativa na camada do sincitiotrofoblastos (BURTON; JAUNIAUX, 2011). Essa perfusão placentária permite fornecimento de nutriente e troca de gases entre as circulações além de dar suporte a necessidades aeróbicas como o rápido ganho de peso durante o segundo e terceiro trimestre (TUULI et al, 2011). A concentração média fica em torno de 40-80mmHg (aproximadamente 8% de O_2) e tende a diminuir gradualmente a medida que o consumo de oxigênio pelo feto aumenta atingindo cerca de 40 mmHg no terceiro trimestre que é mantido até o termo (BURTON; JAUNIAUX, 2011; LANOIX et al., 2013; TUULI et al., 2011).

Figura 2. Variação da concentração de O_2 no espaço intervilloso da placenta durante a gestação.



Fonte: Adaptado de TUULI et al., 2011.

A placenta é uma fonte importante de peróxidos lipídicos por possuir grande conteúdo de ácido graxos poli-insaturados, abundantes fosfolipídeos de membrana além de um aumento nos níveis hormonais plasmáticos como a progesterona e nos níveis de lipídeos circulantes no sangue devido ao aumento de depósito de gordura materna que faz com que sejam acessíveis aos RL fisiologicamente produzidos na gestação (MANKUTA

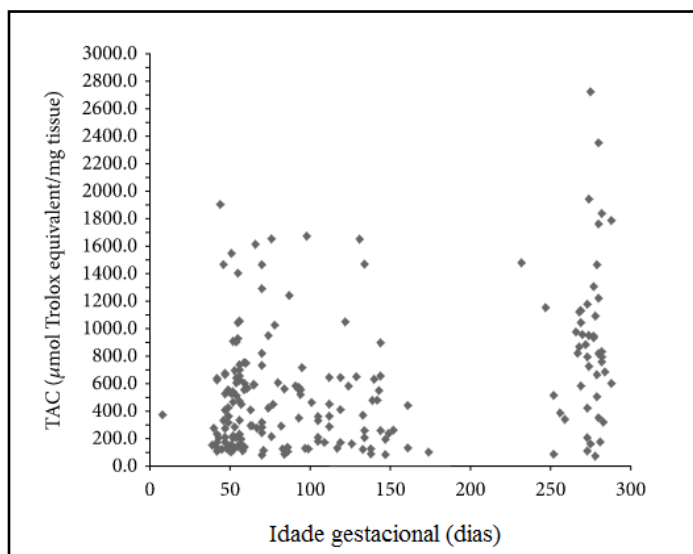
et al., 2010). Esse aumento de lipídeos ocasiona elevada peroxidação lipídica em um organismo fisiologicamente rico em EROs como ocorre na gestação, principalmente depois do segundo trimestre, observada pelo aumento do marcador MDA no sangue materno se comparadas a não gestantes, reforçando assim a hipótese da presença de estresse oxidativo na gestação (GÜR et al., 2011).

Sendo assim, a placenta produz espécies reativas de oxigênio em condições normais de gestação através de meios celulares, principalmente durante a hipóxia pré-natal em que ocorrem alterações da vasculogênese placentária (BURTON; JAUNIAUX, 2011; ROBERTS; HUBEL., 1999) como a ativação da NADPH oxidase e xantina oxidase (RATHORE et al., 2008) além do consumo de oxigênio mitocondrial que leva a liberação de RL pelo vazamento anormal de elétrons na cadeia respiratória durante o processo de produção de energia (ALJUNAIDY et al., 2017; MURRAY, 2012). Assim, para lidar com esse aumento oxidativo fisiologicamente presente, a placenta emprega uma série de adaptações fisiológicas como o aumento da capacidade antioxidante a fim de reduzir os danos principalmente ao tecido placentário exposto ao estresse oxidativo (HERRERA et al., 2014; TUULI et al., 2011).

Embora a placenta seja a principal responsável pelo estresse oxidativo na gestação ela também é a fonte mais importante de antioxidantes nesse período (TAKEHARA et al., 1990; YOSHIOKA et al., 1990). A atividade antioxidante da placenta para barrar os efeitos deletérios dos radicais livres é fundamental para um bom andamento gestacional e o desenvolvimento e crescimento de uma prole saudável (MILLER et al., 2012).

A expressão de enzimas antioxidantes durante a gravidez, incluindo a CAT, GPX e SOD é necessária para preservar a vitalidade do embrião através da inibição da peroxidação lipídica, controle intracelular de reação redox bem como equilibrar os fatores pró-apoptóticos liberados pelas mitocôndrias (ERDEM et al., 2011; YANT et al., 2003). Os tecidos placentários durante o primeiro trimestre de gestação contêm baixas concentrações das principais enzimas antioxidantes, demonstrada na Figura 3, expondo de forma acessível as células trofoblásticas ao dano oxidativo (BASU et al., 2015), sendo regulada positivamente somente durante os últimos 15% da gestação tornando-se eficiente o suficiente para contrariar o desafio oxidativo (DAVIS;AUTEN, 2010).

Figura 3. Capacidade antioxidante total (TAC) em ascensão com o aumento da idade gestacional.



FONTE: Adaptado de BASU et al., 2015

Além da atividade enzimática, antioxidantes não-enzimáticos como as vitaminas A, C e E também contribuem para regular a função mitocondrial e regular a produção de EROs, podendo na sua deficiência no início da gestação levar a uma geração mais intensa e como consequência a morte do embrião por apoptose (AL-GUBORY et al., 2010). A medida que a gestação progride vai ocorrendo transferência placentária das vitaminas (MOHEBBI-FANI et al., 2012) e minerais (HIDROGLOU et al., 1994) a fim de equilibrar dinamicamente os efeitos dos radicais livres e assim permitir o estabelecimento de uma defesa maior, na presença de um suporte energético, vitamínico e mineral que ajuda na eficácia antioxidante enzimática, melhorando a proteção materna e fetal além de preparar o feto para a vida pós-natal (MOHEBBI-FANI et al., 2012).

O estresse oxidativo fisiológico em conjunto com uma função endotelial adequada é necessária para uma gravidez normal, pois está diretamente envolvida no desenvolvimento fetal por interferir na angiogênese, remodelação das artéria espirais, proliferação das células trofoblásticas, bem como na proteção do feto de infecções intra-uterinas (AGARWAL et al., 2008; DENERRY, 2007; MYATT, 2010; OH, 2011). No entanto, um aumento anormal de EROs e uma capacidade de defesa antioxidante limitada pode levar a ocorrência de estresse oxidativo e conseqüentemente a alterações placentárias devido a sua capacidade de causar dano no ácido desoxirribunucleico (DNA), proteínas, lipídeos e levar a apoptose; todos os quais podem levar a alteração de função placentária e alterar parcial ou total a entrega de oxigênio e nutrientes ao feto em desenvolvimento podendo levar a alterações fetais significativas (ALJUNAIDY et al.,

2017; REDMAN; SARGENT, 2009) incluindo desenvolvimento placentário anormal, invasão trofoblástica, remodelação vascular e angiogênese anormal. (JAMES et al., 2012). Sendo assim, uma adequada defesa antioxidante na placenta e em todo o organismo durante a gestação, seja enzimática ou não enzimática é necessária para prevenir o desfecho de muitas complicações maternas e fetais (RIZZO et al., 2012).

O estresse oxidativo desempenha papel durante o período reprodutivo da mulher e está presente na infertilidade, endometriose, ovários policísticos, e na gestação durante a foliculogênese, maturação de oócitos e no corpo lúteo (AGARWAL et al., 2008). EROs estão envolvidas em morbidades durante toda a gestação, interferindo em diversas biomoléculas estando relacionadas a abortos recorrentes e espontâneos (GUPTA et al., 2007), diabetes mellitus gestacional (RODRIGUES et al., 2017), pré-eclâmpsia (DE LUCCA et al., 2016), restrição de crescimento fetal (MERT et al., 2012), trabalho de parto pré-termo (LUO et al., 2006) bem como em futuras doenças em fase adulta como hipertensão, diabetes e obesidade (JANSSON; POWELL, 2007).

1.1.3 Estresse oxidativo

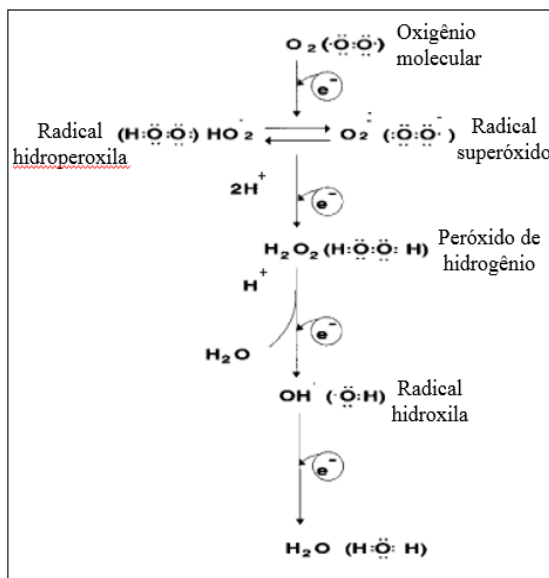
O metabolismo aeróbico é a principal fonte de energia do organismo (RIZZO et al., 2012), porém, é conhecido também por apresentar efeitos adversos potencialmente prejudiciais aos sistemas biológicos, pois em condições fisiológicas uma pequena parte do oxigênio metabolizado está incompletamente reduzido levando a formação contínua de moléculas pró-oxidantes chamadas de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou radicais livres (RL) (TORRES-CUEVAS et al., 2017).

O organismo mantém a concentração de EROs em equilíbrio em relação a concentração de antioxidantes a fim de manter a homeostase intracelular, entretanto, sempre que houver um desequilíbrio oxidativo onde a quantidade de radicais livres excede as defesas antioxidantes extracelulares e a capacidade de controle enzimático intracelular, seja por um aumento anormal na produção de radicais livres ou de um defeito nos mecanismos de defesa antioxidante um estado de estresse oxidativo é iniciado (BURTON; JAUNIAUX, 2011; METCALFE; ALONSO-ALVAREZ, 2010).

As espécies reativas de oxigênio, incluem radicais livres como o ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxil (OH^\bullet), radical peróxil (ROO^\bullet), radical alcóxil (RO^\bullet) e intermediários não radicais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete (BURTON; JAUNIAUX, 2011; PEREIRA; MARTEL, 2014). O O_2^- é o radical mais

abundante presente no organismo e grande parte da sua toxicidade vem da formação através dele e de H_2O_2 de um radical bem mais reativo, o $\text{OH}\cdot$, através da reação de Fenton e Weis-Haben, catalisada com Ferro e Cobre (BUONOCORE et al., 2010). A formação das principais EROs é mostrada na Figura 4.

Figura 4. Formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) através da redução do oxigênio molecular (O_2) até a formação de água (H_2O).



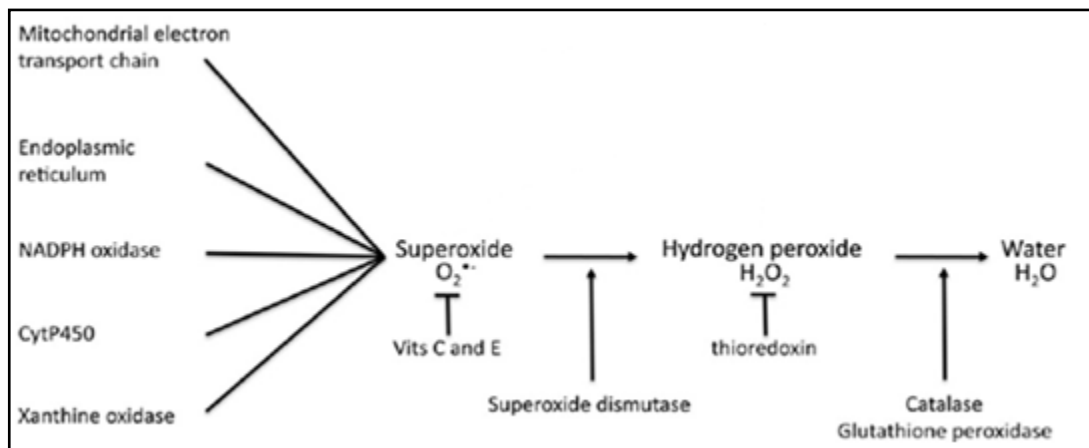
Fonte: Adaptado de COHEN, 1989

As espécies de radicais livres são átomos ou moléculas pequenas, potencialmente tóxicas, difusíveis, apresentam meia-vida curta, são instáveis e altamente reativos por possuírem um elétron não emparelhado em sua órbita externa o que os torna ávidos por elétrons afim de obter estabilidade eletrônica (BURTON; JAUNIAUX, 2011; GUPTA et al., 2009; POUROVA et al., 2010; RIZZO et al., 2012). Participam de várias reações em cadeia, em que um único evento de iniciação com radical livre pode ser propagada e danificar várias moléculas (JONES, 2008), pois, se tornam estáveis adquirindo os elétrons de ácidos nucleicos, enzimas, lipídios, proteínas ou qualquer molécula próxima por oxidação levando a uma cascata de reações em cadeia, resultando em alterações estruturais significativas como na peroxidação lipídica, oxidação de enzimas e proteínas e, possível morte celular por apoptose ou necrose (ABRAMOV et al., 2007; BURTON; JAUNIAUX, 2011; PEREIRA; MARTEL, 2014).

Os processos fisiológicos que utilizam o oxigênio molecular (O_2) como substrato, como as reações de oxidação ou redução consistem nas principais vias de formação de radicais livres (POUROVA et al., 2010). Sob condições biológicas o sistema respiratório mitocondrial é a principal fonte de radicais livres e estima-se que o vazamento de elétrons da cadeia de transporte de elétrons seja aproximadamente de 1-2% (DRÖSE; BRANDT, 2012) durante a produção de energia na forma de ATP (Adenosina Trifosfato) através da fosforilação oxidativa pela citocromo oxidase mitocondrial (DENNERY, 2007; TORRANCE et al., 2009). O vazamento de elétrons sobre o O_2 resulta na formação do O_2^- nas mitocôndrias em vez de ser reduzido a H_2O e, a taxa da sua formação depende da concentração de elétrons presente na cadeia, portanto, é elevada em hiperoxia e também em estado de hipóxia onde a falta de O_2 como acceptor de elétrons faz com que os RL se acumulem dentro da matriz mitocondrial (BURTON; JAUNIAUX, 2011). Em torno de 25% do O_2^- gerado dentro das células é formado no retículo endoplasmático através da formação de ligações dissulfeto durante o dobramento de proteínas que é considerado um processo oxidativo, pois envolve a oxidação de grupos sulfidrilicos dos resíduos do aminoácido cisteína (BURTON; JAUNIAUX, 2011).

Fontes de EROs extra mitocondriais incluem principalmente as vias enzimáticas através da atividade da xantina oxidase, citocromo P450, atividade da enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidase e metabolismo do ácido araquidônico por lipoxigenases e ciclo-oxigenases (AL-GUBORY et al., 2010; CHO, 2011; RIZZO et al., 2012). Também são formados durante resposta inflamatória em células polimorfonucleadas, através de sistema de oxidase dependentes de NADPH, do metabolismo de drogas e xenobióticos, exposição a radiação ultra-violeta (UV) e irradiação iônica (BURTON; JAUNIAUX, 2011; PEREIRA; MARTEL, 2014). A figura 5 mostra a origem da formação de EROs bem como processos de detoxificação discutidos adiante.

Figura 5. Origem das principais EROs e processos de destoxificação por antioxidantes exógenos e endógenos.



Fonte: Adaptado de BURTON; JAUNIAUX, 2011.

Em concentrações fisiológicas homeostáticas, as EROs são conhecidas por exercer um papel fundamental na modulação de diversos processos fisiológicos normais incluindo crescimento, diferenciação, metabolismo e apoptose celular (KURLAK et al., 2014) desde que após oxidação cada molécula retorne ao seu estado reduzido (CHANDRA et al., 2009). Também atuam como segundo mensageiros na sinalização celular pois podem facilmente ser produzidos e degradados através de reações enzimáticas podendo amplificar um sinal ou afetar uma via de sinalização específica (HANSEN, 2006). Atuam na ativação de proteínas quinases, ativação de fatores de transcrição redox-sensível (BURTON; JAUNIAUX, 2011), fatores de transcrição e fosforilação proteica, regulação intracelular do cálcio (BUONOCORE et al., 2010), aumento da transdução de sinal de membranas receptoras, regulação do tônus vascular e das funções controladas pelas concentrações de O_2 (DENNERY, 2007). Também são produzidos em fagócitos em infecções apresentando assim atividade bacteriostática e bactericida, constituindo um dos mecanismos mais eficientes de defesa contra micro-organismo (DAHLBERG et al., 2008 MYATT; CUI, 2004).

Em condições que ocorre depleção, perda ou inativação da capacidade antioxidante do organismo ou um aumento na produção de EROs inicia um ambiente redox hostil, de estresse oxidativo, que leva a diversos danos em macromoléculas celulares (AL-GUBORY, 2016) estando assim, associadas a diversas patologias como na aterosclerose (LI et al., 2014), doenças cardiovasculares (JEONG et al., 2012),

respiratórias, doença de Alzheimer (WANG et al., 2014), hipertensão (DINH et al., 2014), diabetes (YANG et al., 2011) e doenças reprodutivas (PEREIRA; MARTEL, 2014).

O primeiro dano celular causado por EROs é a peroxidação dos componentes da membrana celular, em particular os lipídeos, processo chamado de peroxidação lipídica (MATSUDA et al., 2013). Esse processo envolve a oxidação dos fosfolipídios de membrana como os ácidos graxos poli-insaturados, ácidos graxos de cadeia longa e ácidos com mais de uma ligação dupla na qual os EROs sequestram um hidrogênio do carbono metilado que liga as duas ligações duplas reduzindo a água e, leva a transformação de ácido graxo em RL (GASCHLER; STOCKWELL, 2017; KWIECIEN et al., 2014). Esse RL de ácido graxo se prende a uma molécula de oxigênio levando a formação dos radicais peroxila, que sequestram íons hidrogênio (H⁺) de outros ácidos graxos poli-insaturados contribuindo para um *feed-back* positivo na peroxidação lipídica envolvendo a maioria dos lipídeos de membrana (GASCHLER; STOCKWELL, 2017; KWIECIEN et al., 2014; LORAIN et al., 2012).

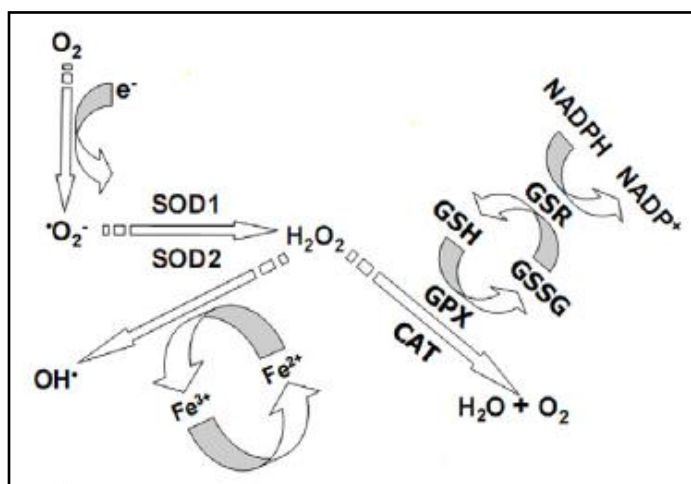
A decomposição inicial dessas EROs formadas leva a produção de aldeídos, em particular o malondialdeído (MDA) que é o principal metabólito do ácido araquidônico. É considerado um importante marcador de lesão celular por peroxidação lipídica (MARAKALA et al., 2012), além de hidroxialdeídos, γ -cetoaldeídos e outros produtos de reação como F2-isoprostano que também são amplamente aceitos como biomarcadores de estresse oxidativo (GUERAUD et al., 2010; MARAKALA et al., 2012; TSIKAS et al., 2017). Esses produtos de peroxidação levam a alterações no potencial de membrana, inibição da atividade dos transportadores de proteínas (ESTERBAUER, 1992; KOURIE et al., 1998) além de tornar a parte interna da membrana mais hidrofóbica e permeável através da adição de grupamentos polares, modificando assim as propriedades das membranas celulares (KWIECIEN et al., 2002).

Para manter a homeostasia normal do organismo, as EROs são equilibradas por um sistema de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Ambos os antioxidantes são integrantes do organismo e interagem uns com ou outros a fim de garantir a defesa antioxidante do organismo, metabolizando essas formas nocivas de oxigênio em substâncias inócuas (ADEMUYIWA et al., 2007; MACHLIN; BENDICH, 1987).

Os principais antioxidantes enzimáticos mostradas na Figura 6 incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) e a glutathione reductase (GR), que estão localizadas em diferentes compartimentos celulares e operam de forma coordenada para proteger a célula do dano sob condição de estresse oxidativo

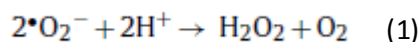
(CINKAYA et al., 2010; ERDEM et al., 2011). Podem assumir valências diferentes ao transferir elétrons para equilibrar moléculas durante o processo de desintoxicação por possuírem um centro metálico e assim evitar danos nas estruturas moleculares (MARSEGLIA et al., 2014).

Figura 6. Esquema representativo das principais enzimas antioxidantes.



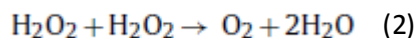
Fonte: Adaptado de AL-GUBORY et al., 2012. CAT: catalase; e⁻: elétron; GPX: glutatona peroxidase; GSH: glutatona reduzida; GSSG: glutatona oxidada; GSR: glutatona redutase; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; H₂O: molécula de água; NADPH: Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida; O₂: molécula de oxigênio; O₂⁻: ânion superóxido; OH⁻: radical hidroxil; SOD: superóxido dismutase.

A SOD é considerada a primeira linha de defesa contra a super produção de EROs pois atua catalisando a conversão do radical superóxido em peróxido de hidrogênio (GARREL et al., 2010) pela reação mostrada na equação 1. A SOD1 contendo Cobre (Cu) e Zinco (Zn) é uma proteína dimérica essencialmente localizada no citoplasma (McCORD; FRIDOVICH, 1969), a SOD2 presente na mitocôndria é uma proteína homotetrametra composta por manganês (WEISIGER; FRIDOVICH, 1973) e, a SOD extracelular que é composta por Cu e Zn (MARKLUND et al., 1982).



O controle da produção de peróxido de hidrogênio é a segunda linha de defesa enzimática (GARREL et al., 2010). A catalase presente nos peroxissomos e a glutatona peroxidase presente no citoplasma e na mitocôndria são responsáveis por catalisar a

conversão do H_2O_2 em H_2O , como mostra a equação 2 e estão distribuídas nos glóbulos vermelhos e no plasma (GARREL et al., 2010).



A glutatona é produzida no citosol através de cisteína, glutamato e glicina e, está presente na maioria das formas de vida aeróbica sendo o principal tampão redox em grupamentos tiois (BURTON; JAUNIAUX, 2011). Em estado reduzido de glutatona, o grupamento tiol doa um elétron para outras moléculas instáveis como as EROs a fim de manter o equilíbrio. Ao doar esse elétron, a glutatona torna-se oxidada que é então reduzida a sua forma estável de volta a glutatona reduzida pela glutatona redutase usando NADPH, formado pela via de pentose, como doador de elétron, essa reação é mostrada na Figura 6 (AGARAWAL et al., 2012; BURTON; JAUNIAUX, 2011; COUTO et al., 2013).

Além de atividade antioxidante enzimática as células possuem antioxidantes não enzimáticos que atuam no combate dos radicais livres, incluindo vitaminas C, E, A, betacaroteno, ácido lipóico, ferritina, transferrina, ubiquinonas, e micronutrientes como cobre, zinco, manganês e selênio (AL-GUBORY et al., 2010; CINKAYA et al., 2010). Consistem de suplementos dietéticos e antioxidantes sintéticos podendo sofrer influência de ingestão (SHARMA; AGARWAL, 2004). Atuam estabilizando os radicais superóxido e hidroxílicos evitando excesso de radicais livres e dano oxidativo nas células (PERKINS, 2006).

A vitamina E (α -tocoferol), lipossolúvel e incorporada as membranas biológicas, reage com os radicais lipídicos produzidos durante a peroxidação lipídica, protegendo lipídeos e proteínas da membrana formando o α -tocoferol oxidado que pode retornar a sua forma reduzido através de outros antioxidantes como o ascorbato e retinol (MARSEGLIA et al., 2014). A vitamina C (ácido ascórbico) é um antioxidante solúvel em água, presente no plasma e dentro das células e, atua impedindo a propagação do processo peroxidativo doando elétrons e assim, evitando que outros agentes se oxidem (MILLER et al., 2012). Também pode interagir com a membrana plasmática e doar elétron ao radical tocoperóxil (α -tocoferol oxidado) regenerando-o a forma reduzida (MACHILIN; BENDICH 1987; UGWA et al., 2015).

A transferrina e a ferritina sequestram íons de ferro inibindo a reação de Fenton e a produção de OH° (BURTON; JAUNIAUS, 2011) e, impedem a catalisação de radicais livres através da quelação (SHKOLNIK et al., 2011). O hormônio melatonina é um antioxidante produzido pelo corpo, porém não pode sofrer ciclos redox, pois após ser oxidado forma produtos finais estáveis e é incapaz de retornar ao estado reduzido (AGARWAL et al., 2012; SHKOLNIK et al., 2011). O Cu, Zn, e Selênio não apresentam ação antioxidante direta porém são essenciais para atividade antioxidante de enzimas (AGARWAL et al., 2012).

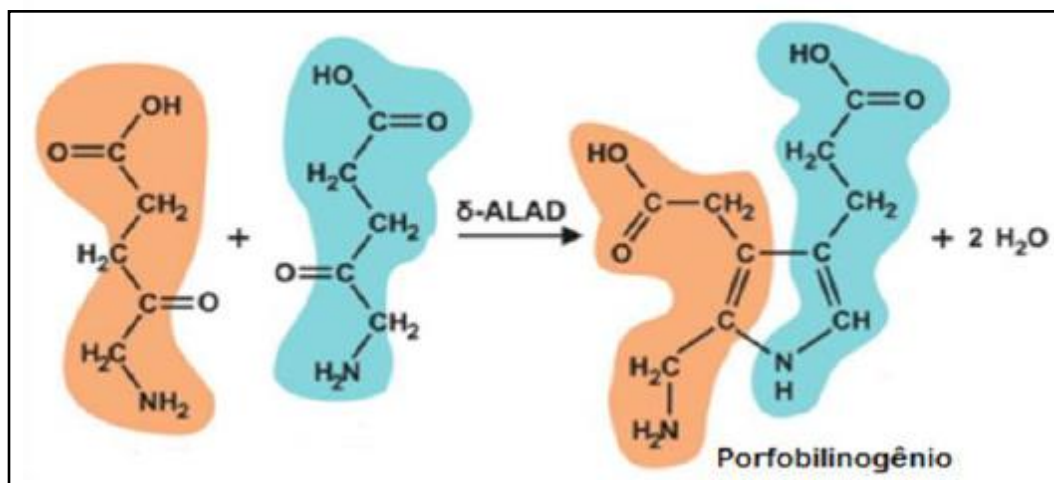
1.1.4 Enzima Delta-Aminolevulinato Desidratase

A enzima delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) é a segunda enzima citosólica na via metabólica do heme e, tem um papel primordial na maioria dos organismos aeróbicos pois está diretamente relacionada a produção de células vermelhas do sangue, além de estar presente na biossíntese de outros tetrapiróis como as corrinas, clorofilas e bilinas (BONFANTI et al., 2011; JAFFE et al., 1995; SHEMIN, 1976).

A enzima δ -ALA-D apresenta um pH ótimo na faixa de 6,3-7,1 e seus grupamentos sulfídricos necessitam de zinco para maximizar sua atividade catalítica porém, acabam tornando-o muito sensíveis à oxidação por pró-oxidantes e em situações associadas ao estresse oxidativo, levando a inibição da enzima (BONFANTI et al., 2011; ROCHA et al., 2012; SHEMIN, 1976). Sendo assim, essa inibição acaba prejudicando a biossíntese do heme, absorção de ferro bem como resulta no acúmulo de ALA que contém atividade pró-oxidante e exacerba a produção de EROs (BAIERLE et al., 2010; PEREIRA et al., 1992).

A δ -ALA-D é uma metaloproteína responsável por catalisar a condensação de duas moléculas de ALA para formar o porfobilinogênio (PBG) como mostra a figura 7, em seguida forma moléculas de porfirina que é o principal componente do heme, proteínas e citocromo (MOL et al., 2015). A inibição dessa enzima pode levar a auto-oxidação da ALA em pH fisiológico gerando um aumento na produção de EROs, em especial O_2^- , H_2O_2 e ALA que levam a lesões oxidativas nas células e esgotamento do sistema antioxidante (ROCHA et al., 2012). Ativadores dos grupamentos tiólicos como o ditioneitol (DDT) são usados para reverter a inibição da δ -ALA-D pois mantem os grupamentos tiólicos da enzima reduzidos e assim evitam a oxidação desse grupamento (EMANUELLI et al., 1996; ROCHA et al., 2012).

Figura 7. Formação de porfobilinogênio através de duas moléculas de ALA.



Fonte: Adaptado de ROCHA et al., 2012.

Várias patologias estão relacionadas a presença de inibição enzimática da δ -ALA-D devido a produção exacerbada de EROs pelo substrato ALA levando a lesão celular pois interferem na estrutura e função de diversos órgãos (BECHARA et al., 1993; SASSA et al., 1989). Morbidades estudadas em que δ -ALA-D encontra-se inibida incluem obesidade (BRITO et al., 2007), diabetes (BONFANTI et al., 2011), pré-eclampsia (DE LUCCA et al., 2016), câncer e transplante de medula óssea (GONÇALVES et al., 2009).

Portanto, essa enzima pode ser usada junto com outros marcadores como um importante parâmetro de estresse oxidativo e comprometimento da função e estrutura celular, pois sua inibição contribui significativamente para o aumento da carga global de EROs (BECHARA et al., 1996; BRITO et al., 2007).

1.2 PROPOSIÇÃO

1.2.1 Proposição Geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar o estatus oxidativo materno em gestantes gemelares, através da determinação de parâmetros indicadores de dano oxidativo no sangue materno em resposta a presença de dois fetos, bem como a relação da placenta com o aumento ou não do estatus oxidativo nessas gestantes.

1.2.2 Proposições Específicas

Nas gestantes gemelares, bem como nas controles gestantes saudáveis de feto único, objetiva-se:

-Avaliar a peroxidação lipídica, através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), no plasma e em eritrócito.

-Quantificar os níveis de antioxidantes endógenos e exógenos: a enzimas catalase em eritrócitos; a vitamina C no plasma, e grupamentos tióis (-SH) no plasma e em eritrócitos.

-Avaliar a atividade da enzima sulfidrídica delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) no sangue total, bem como seu índice de reativação.

-Investigar as possíveis associações entre os parâmetros de estresse oxidativo com complicações maternas e perinatais.

1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito, o qual se encontra nessa dissertação. O manuscrito foi submetido para a avaliação na revista *Reproductive Science*. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito.

**2 MANUSCRITO - Evolution of oxidative stress and d-aminolevulinate
dehydratase activity in twin pregnancies¹**

Manuscrito submetido para a revista Reproductive Science

Letícia Bigolin Jantsch, Leidiane de Lucca, Bárbara Nicoli Dorneles, Cristine Kolling

Konopka, Thissiane de Lima Gonçalves

**Evolution of oxidative stress and d-aminolevulinate dehydratase
activity in twin pregnancies¹**

Letícia Bigolin Jantsch², Leidiane de Lucca², Bárbara Nicoli Dorneles¹, Cristine Kolling Konopka³, Thissiane de Lima Gonçalves²

1 Department of Clinical and Toxicological Analysis, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, 97105-900, Brazil.
barbarad_n@hotmail.com

2 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. letii_jantsch@hotmail.com;
leidi_lucca@hotmail.com ; thissianegoncalves@yahoo.com.br

3 Department of Obstetrics and Gynecology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, 97105-900, Brazil. cristine.ufsm@gmail.com

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

Twin pregnancies are considered as a high obstetric risk due to the several morbidities generally present, to the marked increased in fetuses supply of metabolic compounds and the high oxygen consumption from the fetus-placenta unity, leading to an oxidative stress episode and maternal cell damage. The oxidative stress is well-known in single gestations and is physiologically noticed during the gestational period, mainly linked to placental activity, therefore, the objective of this study is to assess and understand the maternal oxidative stress in twin pregnancies, current not studied, through ascertain indicators of oxidative damage in maternal blood in response of two fetus, as well as the relation of placenta with or without the increase of oxidative stress in these gestations. The activity of delta-aminolevulinatase dehydratase (δ -ALA-D) was analyzed as an indirect marker of oxidative stress, as well as the quantification of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), protein thiol groups (P-SH) and non-protein thiol groups (NP-SH), vitamin C (VIT C) and catalase activity (CAT) in maternal blood samples from twin (n=30) and single (n=30) pregnancies. TBARS was significantly higher in twin pregnancies, while thiol groups, VIT C and CAT were decreased, besides from the reduced activity of δ -ALA-D in comparison to single fetus gestations. The study established an oxidative stress increased and an antioxidant ability decreased in twin pregnancies, suggesting a possible relation between the levels of oxidants and antioxidants with the complications in those gestations.

Keywords: Twin pregnancy. Oxidative stress. Pregnancy. Antioxidant

Introduction

Twin pregnancies are extremely different than single fetus due to the increased supply of metabolic compounds and nutrition of the developing fetuses, which implies in changes in the maternal body as well as greater repercussions on the fetus when compared to single-fetus pregnancies.¹ They present higher maternal, fetal and neonatal morbidity and mortality compared to single pregnancies and they are directly associated with umbilical cord and placental disorders,² such as abortion, preterm delivery, placental fetal insufficiency, abnormal placentation, intra-uterine fetal death, gestational diabetes and preeclampsia.^{3,4,5}

These changes in gestation are mainly related to increased consumption of maternal metabolic demands by fetuses and the high oxygen consumption that implies in oxidative stress and consequently maternal cellular damage.⁶ The oxidative stress can be defined as the imbalance between the generation of free radicals and the endogenous antioxidant organism ability, being altered in several morbidities.⁷ Free radicals are small, potentially toxic, unstable and highly reactive atoms or molecules because they have an unpaired electron in their outer orbit and they become stable acquiring electrons, nucleic acids, enzymes, lipids, proteins, or any molecules nearby by oxidation, leading to a cascade of chain reactions, resulting in significant structural changes in these biomolecules.⁸

During the pregnancy process, the placenta, in the first trimester of gestation, presents low oxygen concentration, favoring trophoblast proliferation and, as it matures, it is exposed to high oxygen concentration, benefiting the formation of reactive oxygen species (ROS). In the first trimester, because it presents a low concentration of antioxidant enzymes, it becomes more susceptible to damages mediated by reactive oxygen species.¹¹

However, there is a variety of antioxidant mechanisms responsible for neutralizing the established free radicals, leading to the equilibrium and neutralization of the reactive oxygen species physiologically present in gestation, inhibiting oxidation and preventing overproduction of ROS. These mechanisms include endogenous antioxidants such as catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and dietary exogenous such as vitamin C and E.^{6,8,12,13} Another enzyme that is related to oxidative stress is the sulfhydryl delta-aminolevulinate dehydratase enzyme (δ -ALA-D) present in the biosynthesis of the heme group, since it can be inhibited by substances that oxidize sulfhydryl groups, causing an accumulation of aminolevulinic acid that is related to the overproduction of reactive oxygen species.^{14,15}

Even with maternal metabolic changes, it is known that the maternal organism was, naturally, prepared to host a single fetus, thus, multiple pregnancies demand particularities, such as the need of a greater energetic/oxidative supply to a larger number of embryos/fetus that share the same environment.¹ Therefore, the aim of the present study was to evaluate the maternal oxidative stress in twin pregnancies, through biomarkers of oxidative damage in maternal blood in response of two fetuses, as well as the relationship of the placenta with oxidative status.

Materials e Methods

Study population

The studied population consisted of 60 healthy pregnant women, including 30 dizygotic twin pregnant women and 30 single-fetus pregnant women in the third trimester of gestation, within observation in the high-risk prenatal sector of the Santa Maria University Hospital in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, where blood samples were collected. Women with chronic conditions such as neoplasias, asthmatics, hypertensives, pre-existing DM2, gestational diabetes, preeclampsia, infectious diseases, thyroid diseases, smokers, and alcoholics were excluded. Demographic data were collected in the form of a questionnaire on the day of the medical consultation and the clinicians in access to the pregnant woman's chart. All the participating pregnant women signed a free and informed consent form after approval of the study by the Human Research Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria, number 49823015.4.0000.5346.

Sample Collection

The blood samples (14mL) were collected after 8 hours of fasting in tubes containing EDTA (4mL), heparin (8mL) and sodium fluoride (2mL). All samples were processed immediately after collection. The whole blood present in no heparinized tubes was subjected to centrifugation at 3000 rpm to separate the plasma, and then the erythrocytes were washed three times with 0.9% NaCl.

Clinical, hematological and biochemical parameters

Blood pressure was assessed during the appointment with an aneroid sphygmomanometer and the body mass index (BMI) was calculated by dividing weight

by squared height (kg/m^2). Hematological parameters (erythrocytes, hematocrit, hemoglobin and platelets) were measured in whole blood containing EDTA by the automatic cell counter (Sysmex XE 5000). Fasting glycemia was measured in fluoridated plasma with a commercial kit (Bioclin).

Lipid peroxidation

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were measured in erythrocytes and plasma to evaluate lipid peroxidation according to the Lapenna et al.¹⁶ A standard curve of different concentrations of malondialdehyde (MDA) and thiobarbituric acid was used, measured by a spectrometer at 532 nm. The result was expressed in TBARS nmol ml/erythrocytes and TBARS nmol ml/plasma.

Antioxidants

Thiols agroupments were quantified by the Boyne and Ellman method¹⁷ modified by Jacques-Silva et al.¹⁸ by reduction of 5,50-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) acid in phosphate buffer measured at 412 nm. Protein thiol groups (P-SH) were quantified in plasma and expressed as P-SH nmol /plasma ml and non-protein thiol groups (NP-SH) in erythrocytes being expressed as NP-SH nmol /erythrocytes ml. Vitamin C (VIT C) was quantified in plasma by means of Galley et al.¹⁹ with some modifications by Jacques-Silva et al.¹⁸, through the orange-red compound formation, measured at 520 nm and the results were expressed in VIT C $\mu\text{g ml/plasma}$.

Enzymatic activity

The catalase (CAT) activity was assessed in erythrocytes by the Aebi et al.²⁰ method using hydrogen peroxide as a substrate, through its decomposition, measured by spectrophotometry at 240nm and expressed as K mg/Hb. The δ -ALA-D activity was measured in whole blood by the Berlin and Schaller method²¹ measuring the porphobilinogen (PBG) formation rate at 1h at 37 C° , determined at 555 nm and expressed as U/ L (nmolPBG / h / mgHb). A similar set of tubes was incubated, excepting the addition of 2 mM dithiothreitol (DTT) as a reducing agent, in order to verify changes in enzymatic activity related to thiol groups oxidation and to obtain the reactivation index using $AB/A*100$, where A=DTT absorbance assay and B=no DTT absorbance assay.

Statistical analysis

The software GraphPad Prism v.6 was used data analysis. The Shapiro-Wilk test was used to test sample distribution, where the Student's t-test was used to independent samples with normal distribution expressed by mean \pm standard deviation (SD). For non-paired samples, the Mann Whitney test was used and data was presented within median (interquartile range). Statistically significant values were considered at $p < 0.05$ for all analyzes.

Results

A total of 60 healthy pregnant women participated in the study, which 30 were twin-pregnants and 30 were single-pregnants. Data in table 1 presents the main clinical and demographic characteristics of these women. There were no significant differences were found regarding the maternal age, body mass index as well as systolic and diastolic pressure. However, gestational age at birth and newborn weight were lower in twin-pregnant women, showing significant differences between the groups ($p < 0.001$).

The hematological and biochemical parameters of pregnant women are shown in table 02. Twin pregnancies presented hemoglobin, platelets, fasting glycemia and other hematological parameters without significant differences compared to single-fetus pregnant women.

Oxidative stress markers were altered in twin-pregnants compared to single-pregnants, as shown in Table 3. TBARS, both in plasma and in erythrocytes, were significantly higher in twin-pregnancies, whereas P-SH, NP-SH, CAT groups and the amount of VIT C were significantly lower in these women.

Oxidative stress markers were altered in twin-pregnants compared to single-pregnants, as shown in Table 3. TBARS, both in plasma and in erythrocytes, were significantly higher in twin-pregnancies. Groups of P-SH, NP-SH, the amount of VIT C and CAT activity were significantly lower in these pregnant women.

The δ -ALA-D activity in blood was significantly lower in twin-pregnant women than in single-pregnants and the same situation was observed in DTT presence (Fig. A). The enzyme reactivation index was higher in the twin compared to the single pregnancies group (Fig B).

Discussion

Several studies describing the physiological presence of oxidative stress in healthy single-pregnancies and its relation with several morbidities commonly assessed within

this period can be found in the literature ^{28,11}. To our knowledge there are no studies on the investigation human maternal oxidative stress and twinning. Gür et al. (2011) observed a significant difference evaluating ewes with twin and single-fetus pregnancies. They noticed increased MDA levels and decreased antioxidant ability through CAT, GSH-Px and VIT A and E assessments, suggesting that twin-pregnant women demand an increase in oxygen and in circulating lipids levels, although a decrease in maternal antioxidant ability was also noticed.²²

When it comes to preterm birth, twin-pregnancies are considered a high-risk factor comparing to single gestations, because they have a propensity rate 12 times higher.²³ The average length of gestation in this study (Table 1) is in agreement with the literature, where the average for twin pregnancies is 35 weeks whereas single pregnancies is 39 weeks.²⁴ Hassoune et al. (2015) found a strong association between deliveries with gestational age lower than 37 weeks and low birth weight, showing in their study that 80% of the twin newborns had low birth weight versus 4.3% of single newborns²⁵, corroborating with the results in this study, when comparing the low birth weight of the twin newborns versus the singles.

The main source of free radicals during gestation is the placenta, since it is exposed to constant variations in oxygen concentration²³, passing from a hypoxic environment at the beginning of gestation to an oxygen rich environment to support the fetus and placenta rapid growth. High vascularity and exposure to maternal oxygen pressures favor the production of reactive oxygen species.⁷ In addition, the placental membrane consists of large amounts of mitochondria, rouged endoplasmic reticulum and pro-oxidative enzymes such as NADPH oxidase and xanthine oxidize, which are the major free radical sources during gestation.²⁷ According to table 3, our study has demonstrated that the oxidative imbalance, either intracellular in erythrocytes or in plasma, is higher in twin pregnant women when compared to single pregnant.

Several studies showed an increase in MDA concentration in single pregnant women ^{15,28}. This event is related to the trophoblastic invasion in the placental circulation, causing an oxidative explosion, aside from the large amounts of NADPH oxidase, an enzyme that plays a fundamental role in lipidic peroxidation through the production of superoxide radicals.²⁸ This increase is also related to the normal hormonal changes that occur during gestation, such as, maternal fat deposits accumulation, the abundant presence of fatty acids in the placenta, which, although important in fetal growth, are accessible targets to free radicals activity, contributing to oxidative stress as a source of

lipidic peroxidation.²⁹ In the present study, we observed an increase in MDA levels in twin pregnant women compared to single ones (Table 3), which can be justified due to the hormonal concentrations increase in these women, established by Kuijper et al.³⁰, it also may be related to the free fatty acids increased as a consequence of two placentas in dizygotic pregnancies, which increases lipidic peroxidation.

Plasma and erythrocyte thiol groups showed a significant decrease in twin pregnant women (Table 3), being the main antioxidant constituents in proteins, therefore directly related to oxidative damage.³¹ They consist of a sulfhydryl group linked to carbon, present in intra and extra-cellular environments related to the function and regulation of enzymatic activity, as well as, to the protein structure and antioxidant protection.³² The concentration of VIT C and CAT activity also showed a significant decrease (Table 3), agreeing to Leal et al.²⁸ The vitamin C is an exogenous antioxidant effective under conditions of apoptosis to oxidative increase and acts by halting the propagation of peroxidative processes^{33,34}, reducing the superoxide and hydroperoxides radicals created³⁵, while catalase, an endogenous antioxidant detoxifies H₂O₂.³⁶ Muller and co-workers suggest that catalase is the main enzyme in physiological levels acting in the breakdown of H₂O₂ in erythrocytes during gestation, and its concentration is linear within the advance of gestational age.³⁷ The results of this study indicate a decrease in maternal antioxidant system in twin pregnancies compared to single fetuses (Table 3), supported by VIT C and CAT decreased levels, suggesting that this reduction is a consequence of antioxidants greater consumption due to the free radicals increased production found in these pregnant women.

As observed in Figure A, the δ -ALA-D was inhibited in greater quantities in twin pregnant women, suggesting that this enzyme inhibition may be associated and contributing with the overall ROS load, and it can be used with other parameters as an oxidative stress marker. When inhibited, the enzyme δ -ALA-D leads to blood accumulation of 5-aminolevulinic acid (ALA), which after undergoing auto-oxidation, results in free radicals formation, such as H₂O₂, O₂ and ALA.^{15,38} The *in vitro* activity of δ -ALA-D was analyzed by incubation with a reducing agent, dithiothreitol, in order to avoid and review the oxidation of enzymatic thiol groups.³⁹ The highest reactivation index was observed in twin pregnant women as shown in Figure B, demonstrating that δ -ALA-D was partially restored and thiol groups are possibly involved in the increased oxidative stress by inhibiting δ -ALA-D.

Approximately 80% of multiple pregnancies have some kind of morbidity associated compared to only 25% of single pregnancies.⁴⁰ Ademuyima et al. (2007) proposed that increased in ALA, H₂O₂ and O₂ levels in preeclampsia may be an important factor involved in endothelial dysfunction³⁸. In addition, Ghneim and Alshebly (2016) demonstrated a possible relation between the onset and progression of recurrent abortion in pregnant women and the oxidative imbalance⁴¹, also observed in early abortion through the early oxidative explosion occurred between 8 and 9 weeks and the low antioxidants levels.⁴² The oxidative stress is also considered an important element in intrauterine growth restriction⁴³ and in preterm delivery, since women with preterm labor have higher levels of oxidants and lower levels of antioxidants compared with women in full-term labor.⁴⁴

In conclusion, the results of this study demonstrated that the oxidative stress physiologically present during gestational period is higher in twin pregnancies than in single pregnancies, therefore it may suggest that the greater involvement of these pregnant women's morbidities could be related to the increase of oxidative stress levels, suggesting a possible relationship between oxidant and antioxidant levels according to the gestational outcome. The relationship between maternal oxidative stress and twinning is still poorly studied. Therefore, we suggest that more studies should be elaborated in order to elucidate the possible relationship between the increase of oxidative stress in twin pregnant women and gestational development, as well as the gestational and neonatal outcome.

Acknowledgements

The authors thank the Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the Federal University of Santa Maria (UFSM) and the Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), Rio Grande do Sul, Brazil, and all the patients and volunteers for supporting this study. The authors wish to thank all the patients and volunteers to participate in this study.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Peter C, Wenzlaff P, Kruempelmann J, Alzen G, Buelmann E, Gruessner SE. Perinatal morbidity and early neonatal mortality in twin pregnancies. *Open Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2013; 3 (1) 1-12.
2. Steenhaut P, Hubinot C. Perinatal mortality in multiple pregnancy. In: Ezechi OC, Pettersson KO, eds. *Perinatal mortality*. Croatia: In Tech Europe; 2015.
3. Baranov II, Tokova ZZ, Tadevosyan AA. Perinatal outcomes of multiple births. *Obstet Gynecol*. 2012; 1: 98-102.
4. Carroll SG, Tyfield L, Reeve L, Porter H, Soothill P, Kyle PM. Is zygosity or chorionicity the main determinant of fetal outcome in twin pregnancies? *Am J Obstet Gynecol*. 2005;193:757-61.
5. Prapas N, Kalogiannidis I, Prapas I, Xiromeritis P, Karagiannidis A, Makedos G. Twin gestation in older women: antepartum, intrapartum complications, and perinatal outcomes. *Arch Gynecol Obstet*. 2006; 273(5): 293-7.
6. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in gynecologic diseases. Review article. *Reprod Med Biol*, 2004; 3 (4): 177–199.
7. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2011; 25: 287- 299.
8. Pierce JD, Cackler AB, Arnett MG. Why should you care about free radicals? *RN Journal*. 2004; 67: 38-42.
9. Hansson SR, Naav A, Erlandsson L. Oxidative stress in preeclampsia and the role of free fetal hemoglobin. *Front Physiol*. 2015; 13: 5:516.
10. Liochev SI, Frieddovich I. How does superoxide dismutase protect against tumor necrosis factor: a hypothesis informed by effect of superoxide on “free” iron. *Free Radic Biol Med*. 1997;23 (4):668-71.

11. Toescu V, Nuttall SL, Martin U, Kendall MJ, Dunne F. Oxidative stress and normal pregnancy. *Clin Endocrinol*. 2002; 57(5): 609-13.
12. Couto N, Malys N, Gaskell SJ, Barber J. Partition and turnover of glutathione reductase from *Saccharomyces cerevisiae*: a proteomic approach. *J Proteome Res*. 2013; 12 (6): 2885–2894.
13. Mistry HD, Williams PJ. The importance of antioxidant micronutrients in pregnancy. *Oxid Med Cell Longev*. 2011; 12.
14. Gonçalves TL, Benvegnú DM, Bonfanti G, Frediani AV, Rocha JB. Delta- ALA-D activity is a reliable marker for oxidative stress in bone marrow transplant patients. *BMC Cancer*. 2009; 9: 138.
15. De Lucca L, Rodrigues F, Jantsch L, Neme W, Gallarreta F, Gonçalves T. Oxidative profile and d-aminolevulinate dehydratase activity in healthy pregnant women with iron supplementation. *Int J Environ Res Public Health*. 2016; 13: 463.
16. Lapenna D, Ciofani G, Pierdomenico SD, Giamberardino MA, Cuccurullo F. Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid peroxides in human plasma. *Free Radic Biol Med*. 2001;31(3):331-5.
17. Boyne A, Ellman GL. A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. *Anal Biochem*. 1972; 46: 639–653.
18. Jacques-Silva MC, Nogueira CW, Broch LC, Flores EM, Rocha JB. Dyphenyldiselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and brain of mice. *Pharmacol Toxicol*. 2001 Mar; 88(3):119-25.
19. Galley HF, Davies MJ, Webster NR. Ascorbyl radical formation in patients with sepsis: effect of ascorbate loading. *Free Radic Biol Med*. 1996; 20: 39– 143.
20. Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984; 105: 121–126.

21. Berlin A, Schaller K. European standardized method for the determination of d-aminolevulinic dehydratase activity in blood. *Z Klin Chem Klin Biochem.* 1995; 12(8):389–390.
22. Gür S, Türk G, Demirci E. et al. Effect of Pregnancy and Foetal Number on Diameter of Corpus Luteum, Maternal Progesterone Concentration and Oxidant/Antioxidant Balance in Ewes. *Reprod Dom Anim.* 2011; 46: 289–295.
23. Osorno CL, Rupay AGE, Rodríguez CJ, Lavadores MAI, Dávila VJ, Echeverría EM. Factores maternos relacionados con prematuridad. *Ginecol Obstet Mex.* 2008;76 (9):526-36.
24. American Society for Reproductive Medicine (ASRM). Multiple pregnancy and birth: twins, triplets, and high-order multiples. A guide for patients. [Update 2012]. Available from URL: [http:// www.fertilityanswers.com/wp-content/uploads/2016/04/ multiple-pregnancy-and-birth-twins-triplets-and-high-ordermultiples-booklet.pdf](http://www.fertilityanswers.com/wp-content/uploads/2016/04/multiple-pregnancy-and-birth-twins-triplets-and-high-ordermultiples-booklet.pdf)
25. Hassoune S, Bassel S, Nani S, Maaroufi A. Prevalence and factors associated with low birth weight at the maternity hospital of the mohammedia provincial hospital - Morocco. *Tunis Med.* 2015; 93 (07) : 440-444.
26. Mutinati M, Piccinno M, Roncetti M, Campanile D, Rizzo A, Sciorsci R. Oxidative stress during pregnancy in the sheep. *Reprod Domest Anim.* 2013;48 (3):353-357.
27. Burton GJ, Yung HW, Murray AJ. Mitochondrial e Endoplasmic reticulum interactions in the trophoblast: Stress and senescence. *Placenta.* 2017; 52:146-155.
28. Leal CA, Schetinger MR, Leal DB. et al. Oxidative stress and antioxidant defenses in pregnant women. *Redox Rep.* 2011;16(6):230-236.
29. Mankuta D, Elami-Suzin M, Elhayani A, Vinker S. Lipid profile in consecutive pregnancies. *Lipids Health Dis.* 2010; 9: 58.

30. Kuijper EA, Twisk JW, Korse T. et al. Mid-pregnancy, perinatal, and neonatal reproductive endocrinology: a prospective cohort study in twins and singleton control subjects. *Fertil Steril*. 2015;104(6):1527-1534.
31. Da Costa CM, Dos Santos RCC, Lima ES. A simple automated procedure for thiol measurement in human serum samples. *J Bras Patol E Med Lab*. 2006; 42: 345–350.
32. Wlodek L. Beneficial and harmful effects of thiols. *Pol J Pharmacol*. 2002;54 (3): 215-223.
33. Chan AC. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. *Can J Physiol Pharmacol*. 1993 ;71(9):725-731.
34. Nagaoka S, Kakiuchi T, Ohara K, Mukai K. Kinetics of the reaction by which natural vitamin E is regenerated by vitamin C. *Chem Phys Lipids*. 2007;146(1):26-32.
35. Atiba AS, Abbiyesuku FM, Niran-atiba TA, Oparinde DP, Ajose OA, Akindele RA. Free radical attack on membrane lipid and antioxidant vitamins in the course of pre-eclamptic pregnancy. *Ethiop J Health Sci*. 2014; 24: 35–42.
36. Polachini CR, Spanevello RM, Zanini D. et al. Evaluation of delta-aminolevulinic dehydratase activity, oxidative stress biomarkers, and vitamin D levels in patients with multiple sclerosis. *Neurotox Res*. 2016;29(2):230-242.
37. Mueller S, Riedel HD, Stremmel W. Direct evidence for catalase as the predominant H₂O₂-removing enzyme in human erythrocytes. *Blood*. 1997; 90:4973-4978.
38. Ademuyiwa O, Odusoga OL, Adebawo OO, 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.
39. Gabriel D, Pivetta L, Folmer V. et al. Human erythrocyte δ -aminolevulinic dehydratase inhibition by monosaccharides is not mediated by oxidation of enzyme sulfhydryl groups. *Cell Biol Int*. 2005; 29: 669–674.

40. Norwitz ER, Edusa V, Park JS. Maternal physiology and complications of multiple pregnancy. *Semin Perinatology*. 2005; 29 (5): 338-348.
41. Ghneim HK, Alshebly MM. Biochemical markers of oxidative stress in Saudi women with recurrent miscarriage. *J Korean Med Sci*. 2016; 31: 98-105.
42. Hempstock J, Jauniaux E, Greenwold N, Burton GJ. The contribution of placental oxidative stress to early pregnancy failure. *Hum Pathol*. 2003; 34:1265–1275.
43. Biri A, Bozkurt N, Turp A, Kavutcu M, Himmetoglu O, Durak I. Role of oxidative stress in intrauterine growth restriction. *Gynecol Obstet Invest*. 2007; 64: 187–192.
44. Mustafa MD, Pathak R, Ahmed T. et al. Association of glutathione S-transferase M1 and T1 gene polymorphisms and oxidative stress markers in preterm labor. *Clin Biochem*. 2010; 43:1124–1128.

Table 1. Clinical and demographic characteristics of twin and single-pregnancy.

	Single Fetus Pregnant (n=30)	Twin Pregnant (n=30)
Age (Years)	24.50 (20.75-30.00)	28.00(23.00- 33.25) ^b
BMI (kg/m²)	30.19 ± 0.87	30.26 ± 0.66 ^a
Diastolic pressure (mmHg)	70 (65-70)	70 (65-70) ^b
Systolic pressure (mmHg)	110 (110- 120)	120 (110-120) ^b
GA in sample (weeks)	32.53 ± 0.53	31.53 ± 0.49 ^a
GA at birth (weeks)	39(38.00 – 40.00)	36.00 (36.00 – 37.00) ^{****b}
NB weight (mg)	3128 ± 116,00	2442 ± 61.70 ^{****a}

The parametric results were determined by t-test and represented as the mean ± standard deviation^a and the non-parametric results were determined by Mann-Whitney and represented as median (interquartile range)^b. Being p <0.05 and **** p <0.0001 when compared to the group of single-fetus pregnant women. BMI: body mass index; GA: gestational age; NB: newborn.

Table 2. Pregnant women hematological and biochemical parameters.

	Single Fetus Pregnant (n=30)	Twin Pregnant (n=30)
Erythrocyte ($10^6/\text{mm}^3$)	4.01 \pm 0.06	3.90 \pm 0.06 ^a
Hemoglobine (g/dL)	11.87 \pm 0.18	11.46 \pm 0.19 ^a
Hematocrit (%)	34.10 (33.00- 37.40)	35.20 (34.00 – 37.40) ^b
Platelets (mil/mm^3)	226.70 \pm 6.69	207.00 \pm 9.57 ^a
Glucose (mg/dL)	76.11 \pm 1.15	78.85 \pm 0.94 ^a

The parametric results were determined by t-test and represented as the mean \pm standard deviation^a and the non-parametric results were determined by Mann-Whitney and represented as median (interquartile range)^b. $p < 0.05$ when compared to the group of single-fetus pregnant women.

Table 3. Biomarkers of oxidative stress and antioxidants in twin and single pregnant.

	Single Fetus Pregnant (n=30)	Twin Pregnant (n=30)
TBARS plasma (nmol/mL)	3.66 ± 0.23	4.35 ± 0.21*
TBARS erythrocyte (nmol/mL)	14.28 (8.69 – 20.83)	36,61 (32,44 – 43,90)***
P-SH (nmol P-SH/mL)	143.50 ± 4.66	123.00 ± 5.16**
NP-SH (nmol NP-SH/mL)	932.30 ± 28.36	808.50 ± 28.93**
VIT C (µg/mL)	16.07 ± 1.38	12.74 ± 0.83*
CAT (K/mg de Hb)	50.05 ± 1.95	41.50 ± 2.11**

The parametric results were determined by t-test and represented as the mean standard deviation and the non-parametric results were determined by Mann-Whitney and represented as median (interquartile range). TBARS: thiobarbituric acid reactive substances, P-SH: thiol groups of proteins in plasma, NP-SH: non-protein thiol groups in erythrocytes, VIT C: vitamin C, CAT: catalase. * p<0,044, ** p < 0,0046, *** p<0,0001

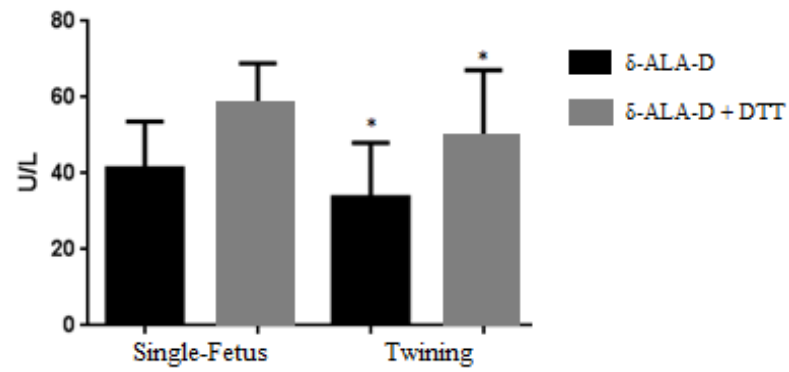


Fig. A. Activity of the δ -ALA-D enzyme in twin pregnant (n=30) and single fetus (n=30) pregnant women. Data were presented as median (interquartile range) and expressed as U / L. The t-test was performed for * $p < 0.05$ in relation to the control group of single-fetus pregnant women. δ -ALA-D: delta-aminolevulinatase dehydratase; DTT: dithiothreitol.

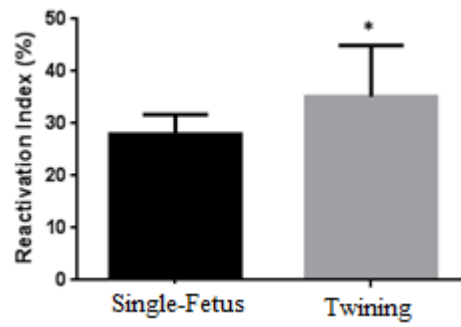


Fig. B. Reactivation rate of δ -ALA-D enzyme in twin (n=30) and single fetus (n=30) pregnant women. Data are presented in median (interquartile range) and expressed in%. The t-test was used to assess significance with * p < 0.05 when comparing the two groups.

3 DISCUSSÃO

Em gestações gemelares as mudanças fisiológicas são aumentadas se comparada as de feto único, pois apresentam maior massa placentária e níveis hormonais elevados (LA SALA et al., 2004; MATIAS et al., 2007) além de apresentarem 3-7 vezes maior mortalidade e morbidade devido a insuficiência útero-placentária bem como complicações anteparto e no parto como a prematuridade (SHERER et al., 2001). A gravidez gemelar é um fator de risco ao parto prematuro apresentando propensão 12 vezes maior de ocorrer em relação a gestação de feto único (OSORNO et al., 2008). A duração média da gestação encontrada no presente estudo está de acordo com o encontrado na literatura, na qual a média para gestações gemelares é 35 semanas enquanto para gestações únicas é de 39 semanas (ASRM, 2012). Hassoune e colaboradores (2015) encontraram uma forte associação entre partos gemelares com idade gestacional inferior a 37 semanas e o baixo peso ao nascer, demonstrando em seu estudo que 80% dos recém-nascidos gêmeos apresentaram baixo peso ao nascer contra 4,3% dos recém-nascidos únicos, corroborando com os resultados deste estudo em relação ao baixo peso dos recém nascidos gêmeos sobre os únicos. Segundo Luo e colaboradores (2006) as causas conhecidas ou suspeitas de prematuridade ou baixo peso ao nascer são fontes conhecidas de estresse oxidativo, sendo importantes determinantes da mortalidade e morbidade nesses recém-nascidos.

Na literatura são descritos vários estudos que relacionam a presença fisiológica do estresse oxidativo em gestações hígdas de feto único e a sua relação com várias morbidades comumente presentes nesse período. No entanto não foi encontrado nenhum estudo envolvendo seres humanos que relacione o estresse oxidativo materno com a gemelaridade. Gür e colaboradores (2011) observaram diferença significativa avaliando ovelhas grávida de gêmeos em relação as de feto único. Eles verificaram aumento nos níveis de MDA e diminuição da capacidade antioxidante através da avaliação de CAT, GPX e VIT A e E, sugerindo que gestações gemelares apresentam um aumento da exigência de oxigênio, aumento dos lipídeos circulantes e uma diminuição da capacidade antioxidante materna nessas gestantes (GUR et al., 2011).

O desenvolvimento adequado da placenta e o estabelecimento ótimo de uma circulação feto-placentária são cruciais para o progresso de uma gestação saudável (MISTRY; WILLIAM, 2011). Em condições normais de gravidez, a placenta é a principal fonte de radicais livres durante esse período, pois está exposta a constantes variações na concentração de oxigênio (OSORNO et al., 2008), passando de um ambiente hipóxico

fisiológico no início da gestação para um ambiente rico em oxigênio devido a invasão trofoblástica e a remodelação das artérias espirais, ambas necessárias para sustentar o rápido crescimento do feto e da placenta, alta vascularização e exposição às pressões de oxigênio maternas o que favorece a produção de espécies reativas de oxigênio (BURTON; JAUNIAUX, 2011). Além disso a membrana placentária é constituída por uma abundante massa mitocondrial, retículo endoplasmático rugado, e enzimas pró-oxidativas como a NADPH oxidase e a xantina oxidase sendo essas as principais fontes de radicais livres durante a gestação (BURTON et al., 2017). Nosso estudo demonstrou que a perda de equilíbrio oxidativo seja intracelularmente nos eritrócitos ou no plasma é maior nas gestantes gemelares quando comparadas as gestantes de feto único.

A gravidez sendo considerada um evento oxidativo, (AKSOY et al., 2009) apresenta ao longo do período um aumento acentuado nos níveis de peroxidação lipídica e um aumento nos níveis de malondialdeído, principalmente no plasma (BILODEU; HUBEL, 2003) fato esse observado no presente estudo. Leal e colaboradores (2011) demonstraram o aumento na concentração de MDA em gestantes de feto único, fato relacionado a invasão troflobástica que ocorre na circulação placentária causando uma explosão oxidativa, além de grandes quantidades de NADPH oxidase, enzima que desempenha um papel fundamental da peroxidação lipídica através da produção de radicais superóxidos. Esse aumento também está relacionado com as alterações hormonais normais que ocorrem durante a gestação, acúmulo de depósitos de gordura materna, aumento nos lipídeos circulantes, além da presença abundante de ácidos graxos na placenta, que mesmo sendo importantes no crescimento fetal, são alvos facilmente acessíveis aos radicais livres contribuindo para o estresse oxidativo como fonte de peroxidação lipídica (MANKUTA et al., 2017). Evidenciamos nesse estudo um aumento significativo no nível de TBARS em gestantes gemelares em relação as de feto único podendo ser justificado devido ao aumento mais de duas vezes a concentração hormonal nas gestações gemelares, demonstradas por Kuijper e colaboradores (2015), bem como podem estar relacionados ao aumento de ácidos graxos livres em consequência da presença de duas placentas em gestações dizigóticas, aumentando assim, a peroxidação lipídica.

Uma ótima capacidade antioxidante da placenta é necessária, pois agem protegendo a placenta e o feto dos efeitos potencialmente tóxicos das espécies reativas de oxigênio e prevenindo o desfecho de muitas complicações maternas e fetais (MILLER et al., 2012). Grupamentos tiólicos no plasma e nos eritrócitos apresentaram diminuição

significativa nas gestantes gemelares, sendo estes os principais constituintes antioxidantes presente nas proteínas, portanto diretamente relacionados ao dano oxidativo (DA COSTA et al., 2006). São compostos por um grupamento sulfidrílico ligado ao carbono, presentes em ambientes intracelulares e extracelulares e estão relacionados a regulação e função da atividade enzimática bem como com a estrutura proteica e proteção antioxidante (WLODEK et al., 2002). A atividade da CAT e a concentração da VIT C também apresentaram diminuição significativa no nosso estudo, mostrando-se de acordo com Leal e colaboradores (2011).

A vitamina C é um antioxidante exógeno, solúvel, presente no plasma e também intracelularmente, é eficaz em condições de apoptose a aumento oxidativo e, age interrompendo a propagação de processos peroxidativos (CHAN, 1993; NAGAOKA et al., 2007) reduzindo os radicais superóxido e hidroperóxidos formados (ATIBA et al., 2014), enquanto a catalase, antioxidante endógeno predominantemente localizada no peroxisomos destoxifica o H_2O_2 formando oxigênio e água (POLACHINI et al., 2016) Muller e colaboradores (1997) sugerem em seu estudo que a catalase seja a principal enzima em níveis fisiológicos atuando na decomposição do H_2O_2 nos eritrócitos durante a gestação, e que a concentração seja linear ao aumento na idade gestacional. Os resultados desse estudo indicam uma diminuição no sistema antioxidante materno nas gestantes gemelares quando comparadas com as de feto único, sugerindo que essa diminuição seja resultado do maior consumo antioxidante devido ao aumento da produção de radicais livres encontradas nessas gestantes.

No presente estudo foi observado uma maior inibição dessa enzima nas gestantes gemelares, além de apresentarem um aumento no índice de reativação demonstrando que a δ -ALA-D foi restaurada parcialmente pelo redutor DTT utilizado a fim de evitar e reverter a oxidação dos grupamentos tíóis presentes na enzima (GABRIEL et al., 2005) e que esses grupamentos possivelmente estejam envolvidos no aumento do estresse oxidativo, através da inibição da δ -ALA-D. Tal resultado está de acordo com a literatura, uma vez que a enzima δ -ALA-D contém grupos sulfidrilicos em sua estrutura que são extremamente sensíveis a agentes oxidantes, portanto em situações pró-oxidante pode ser inibida (FARINA et al., 2003) levando ao acúmulo de ácido 5-aminolevulinico (ALA) no sangue (ADEMUYIWA et al., 2007; DE LUCA et al., 2016) e assim contribuindo com a carga global de EROs, podendo ser usado em conjunto com outros parâmetros como marcador para o estresse oxidativo. (ROCHA et al., 2012).

Aproximadamente 80% das gestações múltiplas em comparação á apenas 25% das gestações únicas apresentam alguma morbidade relacionada (ASSUNÇÃO, 2008) incluindo restrição de crescimento, diabetes gestacional e distúrbios hipertensivos levando a um risco desproporcionalmente maior de morbimortalidade neonatal (TUDELA et al., 2017). Sabe-se a algum tempo que o estresse oxidativo está associado a diversas complicações na gestação e entende-se que tenha um papel importante na fisiologia dessas doenças (BURTON; JAUNIAUX, 2011; MYATT, 2010). Ademuyima e colaboradores (2007) demonstraram que o aumento do ALA, H₂O₂ e O₂ na pré-eclâmpsia pode ser um fator importante envolvido nas disfunções endoteliais observadas nessa doença, assim como o estudo de Ghneim e Alshebly (2016) que demonstrou uma possível relação entre o início e progressão do aborto recorrente em gestantes e a perda de equilíbrio oxidativo, observada também em aborto precoce através da exposição oxidativa precoce que ocorre entre 8 e 9 semanas e a baixa concentração de antioxidantes presentes (HEMPSTOCK et al., 2003). O estresse oxidativo também é considerado um fator importante no desenvolvimento de restrição de crescimento intrauterino (BIRI et al., 2007) e no parto pré-termo, pois mulheres com trabalho de parto prematuro apresentaram níveis mais altos de oxidantes e mais baixos de antioxidante se comparado com mulheres com trabalho de parto a termo (MUSTAFA et al., 2010).

Nosso estudo demonstrou que o estresse oxidativo presente fisiologicamente durante o período gestacional é maior em gestações gemelares em relação as gestações de feto único, portanto podemos sugerir que o acometimento maior de morbidades dessas gestantes possa estar relacionada ao aumento de estresse oxidativo encontrado, propondo assim, uma possível relação entre os níveis oxidantes e antioxidantes com o desenvolvimento da gestação bem como com o resultado gestacional e neonatal.

4 CONCLUSÕES

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

1) Gestações gemelares apresentam algumas particularidades tais como prematuridade e baixo peso ao nascer que foram encontradas nesse estudo e que estão de acordo com a literatura.

2) Os níveis de estresse oxidativo estão aumentados em gestantes gemelares em relação as gestantes com feto único

3) As defesas antioxidantes, como grupos tiólicos proteicos e não-proteicos, vitamina C e catalase estão diminuídas em gestantes gemelares em relação as gestantes com feto único;

4) A atividade da enzima δ -ALA-D está inibida em gestantes gemelares, sendo que essa inibição pode provocar prejuízo na síntese do grupamento heme, além de ocorrer um acúmulo de substâncias com efeitos pró-oxidantes;

5) O índice de reativação por DTT da enzima δ -ALA-D está aumentado em amostras de gestantes gemelares em relação as gestantes com feto único, propondo assim que a inibição da enzima tem relação com a oxidação dos grupamentos tiólicos

6) A presença de estresse oxidativo em diversas morbidades como pré-eclâmpsia e aborto demonstrada na literatura em gestações únicas, pode ser o responsável pela incidência maior dessas morbidades nas gestações gemelares. Entretanto, sugerimos que novos estudos sejam feitos com essas gestantes, seja, hípidas ou com morbidades a fim de elucidar melhor essa possível relação entre o aumento do estresse oxidativo nessas gestações, consideradas de alto risco, e o desenvolvimento da gestação bem como com o resultado gestacional e neonatal.

REFERÊNCIAS

ABRAMOV, A. Y.; SCORZIELLO, A.; DUCHEN, M. R. Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. **Journal of Neuroscience**, v. 27, p. 1129–1138, 2007.

AGARWAL, A. et al. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 10, n. 49, 2012.

AGARWAL, A. et al. Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, p. 1375–1403, 2008.

AKSOY, H. et al. Serum lipid profile, oxidative status, and paraoxonase activity in hyperemesis gravidarum. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 23, p. 105–109, 2009.

AL- GUBORY, K. H. Review multiple exposures to environmental pollutants and oxidative stress: Is there a sex specific risk of developmental complications for fetuses? **Birth Defects Research**, v. 108, p. 351–364, 2016.

AL- GUBORY, K. H.; FOWLER, P. A.; GARREL, C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, p. 1634- 1650, 2010.

ALJUNAIDY, M. M. et al. Prenatal hypoxia and placental oxidative stress: linkages to developmental origins of cardiovascular disease. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 313, n. 4, p. R395-R399, 2017.

ANANTH, C. V.; JOSEPH, K. S.; SMULIAN, J. C. Trends in twin neonatal mortality rates in the United States, 1989 through 1999: influence of birth registration and obstetric intervention. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 190, p. 1313–1321, 2004.

ASSUNÇÃO, R. A. **Perfil clínico-epidemiológico das gestantes gemelares com parto no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**

no período de 2003 a 2006. 153 f. Dissertação (Mestrado em Ciência)- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

BAIERLE, M. et al. Possíveis efeitos do cobre sanguíneo sobre parâmetros hematológicos em idosas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, p. 463–470, 2010.

BASU, J. et al. Placental oxidative status throughout normal gestation in women with uncomplicated pregnancies. **Obstetrics and Gynecology International**, v. 2015, p. 1-6, 2015.

BECHARA, E. J. Oxidative stress in acute intermittent porphyria and lead poisoning may be triggered by 5-aminolevulinic acid. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 841-51, 1996.

BERGH, E. et al. The association between maternal biomarkers and pathways to preterm birth in twin pregnancies **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 28(5), p. 504–508, 2015.

BILODEU, J. F.; HUBEL, C. A. Current concepts in the use of antioxidants for the treatment of preeclampsia. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada**, v. 25, p. 742–750, 2003.

BLEKER, O. P.; OOSTING, H. Term and postterm twin gestations. Placental cause of perinatal mortality. **The Journal of Reproductive Medicine**, v. 42, p. 715–718, 1997.

BLONDEL, B.; KAMINSKI, M. Trends in the occurrence, determinants, and consequences of multiple births. **Seminars in Perinatology**, v. 26, p. 239–249, 2002.

BONFANTI, G. et al. δ -Aminolevulinatase activity in type 2 diabetic patients and its association with lipid profile and oxidative stress. **Clinical Biochemistry**, v. 44, p. 1105–1109, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. Informações de saúde: Estatísticas vitais – mortalidade e nascidos vivos, 2015.
<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defctohtm.exe?sinasc/cnv/nvuf.def> (acessado em 09/09/2017).

BUONOCORE, G.; PERRONE, S.; TATARANNO, M. L. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 15, p. 186–190, 2010.

BURTON, G. J. et al. Mitochondrial e endoplasmic reticulum interactions in the trophoblast: Stress and senescence. **Placenta**, v. 52, p. 146-155, 2017.

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 25, p. 287- 299, 2011.

CASANUEVA, E.; VITERI, F. E. Iron and oxidative stress in pregnancy. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 1700S- 1708S, 2003.

CHANDRA, A. et al. Significance of oxidative stress in human reproduction. **Archives of Medical Science**, v. 5, p. 528–542, 2009.

CHAUHAN, S. et al. Twins: prevalence, problems, and preterm births. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 203, p. 305-315, 2010.

CINKAYA, A. et al. Maternal plasma total antioxidant status in preterm labor. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 36, No. 6, p. 1185–1188, 2010.

COELHO, P. B. A. **Determinantes da morbimortalidade perinatal na gravidez gemelar**. 93 f. Dissertação (Mestrado em Saúde da Criança e da Mulher)- Instituto Fernando Figueira, Rio de Janeiro, 2011.

COHEN, M. V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this the time for clinical trials? **Annals of Internal Medicine**, v. 111, p. 918-931, 1989.

CONSTANTINE, S.; WILKINSON, C. Double trouble: The importance of reporting chorionicity and amnionicity in twin pregnancy ultrasound reports. **Journal of Medical Imaging and Radiation Oncology**, v. 59, p. 66–69, 2015.

CORSELLO, G.; PIRO, E. The world of twins: an update. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 23, p. 59–62, 2010.

DAVIS, J. M.; AUTEN, R. L. Maturation of the antioxidant system and the effects on preterm birth. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 15: 191-195, 2010.

DROSE, S.; BRANDT, U. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 748, p. 145–169, 2012.

DAHLBERG, M. et al. A new chemiluminescence paradox: selective inhibition of isoluminol amplified activity in phagocytes by peptides from annexin. **Luminescence**, v. 23, p.139–143, 2008.

DENNERY, P. A. Effects of oxidative stress on embryonic development. **Birth Defects Research**, v. 81, p. 155–162, 2007.

DENNERY, P. A. Review article oxidative stress in development: Nature or nurture? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 1147–1151, 2010.

DINH, Q. N. et al. Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

DRAGANOVIC, D.; LUCIC, N.; JOJIC, D. Oxidative stress marker and pregnancy induced hypertension. **Medical Archives**, v. 70, p. 437-440, 2016.

DURACKOV, A. Z. Some current insights into oxidative stress. **Physiological Research**, v. 59, p. 459–469, 2010.

EMANUELLI, T. et al. Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on delta-aminolevulinatase from brain, liver and kidney of adult mice. **Pharmacology and Toxicology**, v. 79, p. 136-143, 1996.

ERDEM, M. et al. Comparative study of oxidative stress in maternal blood with that of cord blood and maternal milk. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 285, p. 371–375, 2012.

FARINA, M. et al. Mechanisms of the inhibitory effects of selenium and mercury on the activity of delta-aminolevulinatase from mouse liver, kidney and brain, **Toxicology Letters**, v. 139, p. 55–66, 2003.

FATANI, S. H. Biomarkers of oxidative stress in acute and chronic bronchial asthma. **Journal of Asthma**, v. 51, n. 6; p. 578-584.

FOX, N. S. et al. Intrauterine growth restriction in twin pregnancies: incidence and associated risk factors. **American Journal of Perinatology**, v. 28, p. 267–272, 2011.

GARREL, C.; FOWLER, P. A.; AL-GUBORY, K. H. Developmental changes in antioxidant enzymatic defences against oxidative stress in sheep placentomes. **Journal of Endocrinology**, v. 205, p. 107–116, 2010.

GASCHLER, M. M; STOCKWELLM, B. B. Lipid peroxidation in cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 482, p. 419-425, 2017.

GREENE, M. F. Delivering twins. **The New England Journal of Medicine**, v. 369, p. 1365–1366, 2013.

GUERAUD, F. et al. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. **Free Radical Reserch**, v. 44, n.10, p. 1098–1124, 2010.

GUPTA, S. et al. The role of oxidative stress in spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss: a systematic review. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 62, n. 5, p. 335-347, 2007.

GUPTA, S. et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in preeclampsia: a systematic review. **Obstetrical and Gynecological Survey**, v. 64, n. 11, p. 750-9, 2009.

HACK, K. E. et al. Long-term neurodevelopmental outcome of monochorionic and matched dichorionic twins. **PLOS ONE**, v. 4, n. 8, p. e6815, 2009.

HALL, J. G. Twinning. **Lancet**, v. 362, p. 735-743, 2003.

HANSEN, J. M Oxidative stress as a mechanism of teratogenesis. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today**, v. 78, p. 293–307, 2006.

HANSSON, S. R.; NAAV, A.; ERLANDSSON, L. Oxidative stress in preeclampsia and the role of free fetal hemoglobina. **Frontiers in Physiology**, v. 5, p. 516, 2014.

HERRERA, E. A. et al. The placental pursuit for an adequate oxidant balance between the mother and the fetus. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, n. 149, p. 1-10, 2014.

HIDROGLOU, M.; BATRA, T. R.; ROY, G. L. Changes in plasma alpha-tocopherol and selenium of gestating cows fed hay or silage. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 190–195, 1994.

HOFMEYR, G. J.; BARRET, J F.; CROWTHER, C. A. Planned caesarean section for women with a twin pregnancy. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2015, n. 12, p. 1-32, 2015.

HUNG, T. H.; BURTON, G. J. Hypoxia and reoxygenation: a possible mechanism for placental oxidative stress in preeclampsia. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 45, p. 189-200, 2006.

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.

JAMES, J. L.; CARTER, A. M.; CHAMLEY, L. W. Human placentation from nidation to 5 weeks of gestation. Part I: What do we know about formative placental development following implantation? **Placenta**, v. 33, p. 327–334, 2012.

JANSSON, T; POWELL, T. L. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. **Clinical Science (London)**, v. 113, p. 1–13; 2007.

JAUNIAUX, E.; BEN-AMI, I.; MAYMON, R. Do assisted-reproduction twin pregnancies require additional antenatal care? **Reproductive BioMedicine Online**, v. 26, p. 107-119, 2013.

JAUNIAUX, E.; GULBIS, B.; BURTON, G, J. Physiological implications of the materno fetal oxygen gradient in human early pregnancy. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 7, p. 250–253, 2003.

JEONG, E. M. et al. Metabolic stress, reactive oxygen species, and arrhythmia. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 52, n. 2, p. 454-463. Feb, 2012.

JEZIERSKA-DRUTEL, U.; ROSENZWEIG, S. A.; NEUMANN, C. A. Role of oxidative stress and the microenvironment in breast cancer development and progression. **Advances in Cancer Research**, v.119, p. 107-125, 2013.

JONES, D. P. Radical-free biology of oxidative stress. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v.295, p. 849–68, 2008.

KAZER, R. R. et al. Maternal plasma concentrations of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and human placental lactogen (hPL) in twin pregnancies. **Acta Geneticae Medicae et Gemellologiae**, v. 40, p. 383-387, 1991.

KENT, E. M. et al. Placental pathology, birthweight discordance, and growth restriction in twin pregnancy: results of the ESPRiT Study. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 207, n. 3, p. 220, 2012.

KOURIE, J. I. Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. **American Journal of Physiology**, v. 275, p. C1-C24, 1998.

KUHL, C. Etiology and pathogenesis of gestational diabetes. **Diabetes Care**, v. 21, p. B19-26, 1998.

KURLAK, L. O. et al. Oxidative stress markers in hypertensive states of pregnancy: preterm and term disease. **Frontiers in Physiology**, v. 5, p. 310, 2014.

KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S. J. Importance of aldehyde products of lipid peroxidation in the formation of gastric lesions induced by aspirin, ischemia-reperfusion and stress. **Gastroenterologia Polska**, v. 9, p. 273-280, 2002.

KWIECIEN, S. et al. Lipid peroxidation, reactive oxygen species and antioxidative factors in the pathogenesis of gastric mucosal lesion and mechanism of protection against oxidative stress – induced gastric injury. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 65, p. 613-622, 2014.

LANOIX, D. et al. Melatonin: The watchdog of villous trophoblast homeostasis against hypoxia/ reoxygenation-induced oxidative stress and apoptosis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 381, p. 35-45, 2013.

LA SALA, G. B. et al. Spontaneous embryonic loss following in vitro fertilization: incidence and effect on outcomes. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 191, p. 741–746, 2004.

LAPENNA, D. et al. Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid peroxides in human plasma. **Free Radicals Biology Medicine**. v. 31, p. 331–335, 2001.

LI, H.; HORKE, S.; FORSTERMANN, U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. **Atherosclerosis** , v. 237, n. 1, p. 208-219, 2014.

LONGINI, M. et al. Isoprostanes in amniotic fluid: a predictive marker for fetal growth restriction in pregnancy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, n. 11, p. 1537–1541, 2005.

LOPRIORE, E. et al. Velamentous cord insertion and unequal placental territories in monozygotic twins with and without twin-to-twin-transfusion syndrome. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 196, p. 159, 2007.

LORAIN, B. et al. Dietary iron - initiated lipid oxidation and its inhibition by polyphenols in gastric conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 9074-9081, 2012.

LUO, Z. C. et al. Tracing the origins of “fetal origins” of adult diseases: programming by oxidative stress? **Medical Hypotheses**, v. 66, p. 38–44, 2006.

MACHLIN, L. J.; BEMDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **FASEB Journal**, v. 1, p. 441–445, 1987.

MAJESE, K. New insights for oxidative stress and diabetes mellitus. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 1-17, 2015.

MARAKALA, V.; MALATHI, M.; SHIVASHANKARA, A. R. Lipid peroxidation and antioxidant vitamin status in oral cavity and oropharyngeal cancer patients. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 11, p. 5763-5765, 2012..

MARCEAU, K. et al. The prenatal environment in twin studies: a review on chorionicity. **Behavior Genetics**, v. 46, p. 286–303, 2016.

MARKLUND, S. L.; HOLME, E.; HELLNER, L. Superoxide dismutase in extracellular fluids. **Clinica Chimica Acta**, v. 126, p. 41–51, 1982.

MARSEGLIA, L. et al. Oxidative stress-mediated aging during the fetal and perinatal periods. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, 2014.

MATIAS, A. et al. The effect of ICSI, maternal age, and embryonic stage on early clinical loss rate of twin versus singleton pregnancies. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 130, p. 212–215, 2007.

MATSUDA, T. et al. Lipid peroxidation-induced DNA adducts in human gastric mucosa. **Carcinogenesis**, v. 34, p. 121-127, 2013.

McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

MENON, R. et al. Cigarette smoke induces oxidative stress and apoptosis in normal term fetal membranes. **Placenta**, v. 32, p. 317–322, 2011.

MERT, I.; ORUC, A. S.; YUKSEL, S.; CAKAR, E. S, et al. Role of oxidative stress in preeclampsia and intrauterine growth restriction. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 38, p. 658-664, 2012.

METCALFE, N. B.; ALONSO-ALVAREZ, C., C. Oxidative stress as a life-history constraint: the role of reactive oxygen species in shaping phenotypes from conception to death. **Functional Ecology**, v. 24, p. 984-996, 2010.

MILLER, S. L; WALLACE, E. M.; WALKER, D. W. Antioxidant therapies: a potential role in perinatal medicine. **Neuroendocrinology**, v. 96, p. 13–23, 2012.

MITJAVILA, M. T.; MORENO, J. J. The effects of polyphenols on oxidative stress and the arachidonic acid cascade. Implications for the prevention/treatment of high prevalence diseases. **Biochemical Pharmacology**, v. 84, p. 1113–1122, 2012.

MOHEBBI- FANI, M. et al. Changes of vitamins A, E, and C and lipid peroxidation status of breeding and pregnant sheep during dry seasons on medium-to-low quality forages. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, p. 259–265, 2012.

MOL, B. W. J. et al. Pre-eclampsia, **Lancet**, v. 999–1011, 2015.

MONTENEGRO, C. A. B.; REZENDE FILHO, J. Rezende Obstetrícia. In: **Prenhez gemelar**. Guanabara Koogan, ed. 11^a, p.432-453. Rio de Janeiro, 2010.

MUELLER, A. et al. Placental defense is considered sufficient to control lipid peroxidation in pregnancy. **Medical Hypotheses**, v. 64, p.553-557, 2005.

MULDER, E. J. H. et al. Fetal behavior in normal dichorionic twin pregnancy. **Early Human Development**, v. 88, p. 129–134, 2012.

MURRAY, A. J. Oxygen delivery and fetal-placental growth: beyond a question of supply and demand? **Placenta**, v. 33, p. e16-22, 2012.

MUTINATI, M. et al. Oxidative stress during pregnancy in the sheep. **Reproduction Domestic Animals**, v. 48, p. 353–357, 2013.

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

MYATT, L.; CUI, X.i X. Oxidative stress in the placenta. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 122, p. 369–382, 2004.

NIKKELS, P. G.; HACK., VAN GEMERT, M. J. Pathology of twin placentas with special attention to monochorionic twin placentas. **Journal of Clinical Pathology**, v. 61, p. 1247-53, 2008.

OH, Y.; CHU, T.; SADOVSKY, Y. The timing and duration of hypoxia determine gene expression patterns in cultured human trophoblasts. **Placenta**, v. 32, p. 1004–1009, 2011.

PAEPE, M. E. Examination of the twin placenta. **Seminars in Perinatology**, v. 39, p. 27-35, 2015.

PEREIRA, A. C.; MARTEL, F. Oxidative stress in pregnancy and fertility pathologies. **Cell Biology and Toxicology**, v. 30(5), p. 301-12, 2014.

PEREIRA, B. et al. 5-Aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise- trained rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 72, p. 226–230, 1992.

PERKINS, A. V. Endogenous anti-oxidants in pregnancy and preeclampsia. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 46, p. 77–83, 2006.

POVOA, A. et al. First trimester β -hCG and estradiol levels in singleton and twin pregnancies after assisted reproduction **Journal of Perinatal Medicine**, v. 28, 2017.

POUROVA, J. et al. Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes. **Acta Physiologica**, v. 198, p. 15–35, 2010.

RAO, A.. SAIRAM, S SHEHATA, H. Obstetric complications of twin pregnancies. **Best Practice & Research: Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 18, p. 557–76, 2004.

RATHORE, R. et al. Hypoxia activates NADPH oxidase to increase [ROS]_i and [Ca²⁺]_i through the mitochondrial ROS PKCepsilon signaling axis in pulmonary artery smooth muscle cells. **Free radical biology & medicine**, v. 45, p. 1223- 1231, 2008.

REDMAN, C. W.; SARGENT, I. L. Placental stress and pre-eclampsia: a revised view. **Placenta**, v. 30, p. 38-42, 2009.

RIZZO, M. T. Roles of reactive oxygen species in female reproduction. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 344–352, 2012.

ROBERTS, J. M.; HUBEL, C. A. Is oxidative stress the link in the two-stage model of pre-eclampsia? **Lancet**, v. 354, p. 788-789, 1999.

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

RODESCH, F. et al. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. **Obstetrics & Gynecology**, v. 80, p. 283–285; 1992.

RODRIGUES, F. et al. Influence of gestational diabetes on the activity of δ -aminolevulinate dehydratase and oxidative stress biomarkers. **Redox Report**, v. 2017, p. 1-5. Nov, 2017.

SAGRILLO-FAGUNDES, L. et al. Human primary trophoblast cell culture model to study the protective effects of melatonin against hypoxia/reoxygenation-induced disruption. **Journal of Visualized Experiments**, v. 113, p. 1- 10, 2016.

SASSA, S. ALA-D. Porphyria. **Seminars em Liver Disease**, v.18, p. 95-101, 1998.

SBRANA, E. et al. Maternal tobacco use is associated with increased markers of oxidative stress in the placenta. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 205, p. e241–e247, 2011.

SHEMIN, D. 5-Aminolevulinic acid dehydratase: structure, function and mechanism. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 273, v. 109–115, 1976.

SHKOLNIK, K. et al. Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, p. 1462–1467, 2011.

SHERER, D. M. Adverse perinatal outcome of twin pregnancies according to chorionicity: review of the literature. **American Journal of Perinatology**, v. 18, p. 23–37, 2001

- SHUR, N. The genetics of twinning: from splitting eggs to breaking paradigms. **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**, v. 151C, p. 105-109, 2009.
- SPELLACY, W. N.; BUHI, W. C.; BIRK, S. A. Human placental lactogen levels in multiple pregnancies. **Obstetrics & Gynecology**, v. 52, p. 210-212, 1978 .
- SULTANA, Z. et al. Oxidative stress, placental ageing-related pathologies and adverse pregnancy outcomes. **American Journal of Reproductive Immunology**. v. 5, 2017.
- SUNDERAM, S. et al. Assisted reproductive technology surveillance United States, 2011. **MMWR Surveillance Summaries**, v. 63, p. 1-28, 2014.
- TAKEHARA, Y. YOSHIOKA, T.; SASAKI, J. Changes in the levels of lipoperoxide and antioxidant factors in human placenta during gestation. **Acta Medica Okayama**, v. 44, p. 103-111, 1990.
- TIWARI, A. K. M. Evaluation of oxidative stress and antioxidant status in pregnant anemic women. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 25(4), p. 411–418, 2010.
- TSIKAS, D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. **Analytical Biochemistry**, v. 524, p. 13-30, 2017.
- TORRANCE, H. L. et al. Maternal allopurinol during fetal hypoxia lowers cord blood levels of the brain injury marker S-100B. **Pediatrics**, v. 124, n. 1, p. 350-7, 2009.
- TORRES-CUEVASA, I. et al. Oxygen and oxidative stress in the perinatal period. **Redox Biology**, v. 12, p. 674–681, 2017.
- TUDELA, F. et al. The association between maternal height and pregnancy outcomes in twin gestations. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, Early Online, p. 1–4, 2017.
- TUULI, M. G.; LONGTINE, M. S.; NELSON, D. M. Review: oxygen and trophoblast biology—a source of controversy. **Placenta**, v. 32, p. 109–18, 2011.

VALENTINI, J. et al. Human erythrocyte delta-aminolevulinate dehydratase activity and oxidative stress in hemodialysis patients. **Clinical Biochemistry**, v. 40, p. 591–594, 2007.

WEISIGER, R. A.; FRIDOVICH, I. Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localisation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 248, p. 4791–3, 1973.

WANG, X. et al. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1842, v.8, p. 1240-1247, 2014.

WEBER, M. A.; SEBIRE, N. J. Genetics and developmental pathology of twinning. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v.15, p. 313–318, 2010.

WEBSTER, R. P.; ROBERTS, V. H.; MYATT, L. Protein nitration in placenta – functional significance. **Placenta**, v. 29, p. 985–994, 2008.

WU, F. et al., Oxidative stress: placenta function and dysfunction. **American Journal of Reproductive Immunology**. v. 76(4), p. 258-271, 2016.

YANG, H. et al. Oxidative stress and diabetes mellitus. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1773-1782, 2011.

YANT, L. J. et al. The selenoprotein Gpx4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 34, p. 496–502, 2003.

YOSHIOKA, T. et al. Lipoperoxidation and antioxidant substances in the human placenta during gestation. **Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi**, v. 42, p. 1634-1640, 1990.

ANEXOS

ANEXO A – Comprovante de submissão do artigo à revista *Reproductive Science*.

29-Nov-2017

Dear Dr. Gonçalves:

Your manuscript entitled "Delta-aminolevulinate dehydratase activity and oxidative stress assessment in twin pregnancies" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Reproductive Sciences.

Your manuscript ID is RSCI-17-670.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <https://mc.manuscriptcentral.com/rsci> and edit your user information as appropriate.

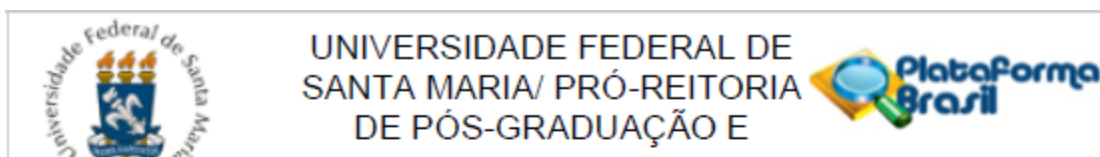
You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/rsci>.

As part of our commitment to ensuring an ethical, transparent and fair peer review process SAGE is a supporting member of ORCID, the Open Researcher and Contributor ID (<https://orcid.org/>). We encourage all authors and co-authors to use ORCID iDs during the peer review process. If you already have an ORCID iD you can link this to your account in ScholarOne just by logging in and editing your account information. If you do not already have an ORCID iD you may login to your ScholarOne account to create your unique identifier and automatically add it to your profile.

Thank you for submitting your manuscript to the Reproductive Sciences.

Sincerely,
Reproductive Sciences Editorial Office

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 GEMELÁRES

Pesquisador: thissiane de lima gonçalves

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 49823015.4.0000.5346

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.288.931

Apresentação do Projeto:

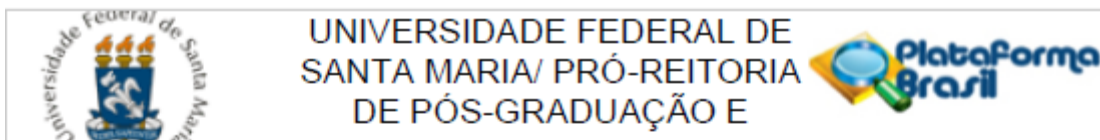
Veja no site do CEP - <http://w3.ufsm.br/nucleodecomites/index.php/cep> - na aba "orientações gerais", modelos e orientações para apresentação dos documentos. Acompanhe as orientações disponíveis, evite pendências e agilize a tramitação do seu projeto.

=====

O projeto se intitula "Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em gestantes gemelares" se vincula ao CCS.

No resumo do projeto consta o seguinte texto: "O estresse oxidativo, que é caracterizado por um desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio e a capacidade antioxidante do organismo apresenta-se fisiologicamente alterado na gravidez. A placenta, no terceiro trimestre gestacional, passa a apresentar alta concentração de oxigênio, rica vascularização, grande quantidade de mitocôndrias e baixa capacidade antioxidante endógena, torna-se a principal fonte de espécies reativas de oxigênio na gestação. Portanto, torna-se útil avaliar a relação da placenta com a presença de radicais livres comparando gestações de feto único, gestações gemelares dizigóticas e gestações gemelares monozigóticas. Dessa forma, objetiva-se avaliar o estatus oxidativo de

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: 1.288.931

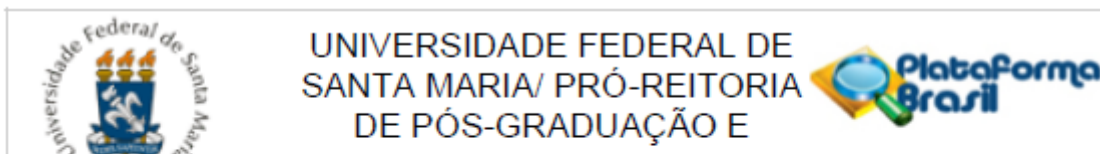
gestantes gemelares atendidas no ambulatório de pré-natal de alto risco, do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) e comparar com gestantes híginas de feto único e mulheres saudáveis não gestantes, por meio de parâmetros analisados no sangue. As amostras sanguíneas serão coletadas após aprovação do Comitê de Ética até dezembro de 2017, com estimativa de 50 participantes em cada grupo experimental. As análises serão realizadas no laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas do Centro de Ciências da Saúde da UFSM. Nos grupos pesquisados serão feitas análises e quantificações das espécies reativas de oxigênio, por meio do TBARS e do sistema antioxidante, através de enzimas como catalase, superóxido dismutase e -ALA-D, além de vitamina C e dos grupamentos sulfidrílicos. Com os resultados do estudo, busca-se conhecer a relação entre a gemelaridade e, o aumento ou não, do estatus oxidativo."

Consta que se trata de "estudo experimental transversal, realizado por meio da análise dos parâmetros de estresse oxidativo entre gestações gemelares, de feto único e mulheres saudáveis não gestantes" e que a "população a ser estudada será composta por gestantes híginas gemelares, gestantes híginas de feto único, na faixa etária de 18 a 45 anos. O tamanho da amostra das gestantes gemelares será de 50 participantes, de acordo com a demanda de consultas do pré-natal do HUSM. O número de controles, gestantes saudáveis de feto único e mulheres não gestantes, será também de 50 indivíduos por grupo. Não haverá cálculo amostral, mas sim, estudo da população de gestantes gemelares, que vierem ao serviço de pré-natal de alto-risco do HUSM e incluem no critério de inclusão."

Critérios de inclusão e exclusão: serão incluídas no grupo experimental: gestantes híginas de gemelares (mono e dizigoto), em acompanhamento no setor pré-natal de alto risco do HUSM no terceiro trimestre de gestação; no grupo controle: gestantes híginas de feto único no terceiro trimestre de gestação e mulheres saudáveis não gestantes de mesma faixa etária. Serão excluídas: mulheres portadoras de condições crônicas tais como: tabagistas, etilistas, asmáticas, hipertensas, com pré-eclâmpsia, com diabetes gestacional ou DM2 pré-existente, doenças infecciosas, doenças da tireóide, neoplasias ou qualquer outra condição crônica, devido à possibilidade de viés nos resultados."

Informa-se que a "coleta sanguínea será realizada por auxiliares de pesquisa, treinados para tal procedimento, o que diminui seus riscos e algum eventual desconforto. Cada amostra será constituída de 8 mL de sangue, este coletado das gestantes híginas gemelares, no terceiro

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: 1.288.931

trimestre de gestação, quando as mesmas forem realizar suas consultas de pré-natal no ambulatório do pré-natal do HUSM, conforme estabelecido com os responsáveis do mesmo. As amostras controle serão coletadas de gestantes de feto único e mulheres não gestantes na mesma faixa etária das gestantes gemelares. As amostras de gestantes hípidas de feto único serão obtidas no Posto de Saúde da Família Dom Antônio Reis, a partir da autorização do responsável da unidade, bem como do Núcleo de Educação Permanente em Saúde (NEPeS), da secretaria de saúde do município de Santa Maria. E as amostras das mulheres saudáveis não gestantes de voluntárias da comunidade. Todas as amostras serão processadas no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT) do CCS. Após a obtenção das amostras de sangue total, plasma e eritrócitos serão realizados os seguintes experimentos:

- Dosagem de grupamentos sulfidrílicos no plasma e em eritrócitos, segundo Ellman modificado por Jacques-Silva et al. (2001).
- Avaliação da atividade da enzima sulfidrílica delta-aminolevulinato desidratase (-ALA-D), em sangue total, segundo Berlin & Schaler, (1974).
- Dosagem de vitamina C no plasma, segundo o método de Jacques-Silva et al. (2001).
- Avaliação da peroxidação lipídica, no plasma, através da medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), segundo Lappena et al. (2001).
- Avaliação da atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase, em eritrócitos, conforme McCord, J.M. & Fridovich (1969) e Aebi (1994), respectivamente."

Os dados referentes aos pacientes serão analisados estatisticamente utilizando o programa SPSS (v.12), quando os resultados estiverem dentro da normalidade serão analisados por ANOVA e quando os resultados não passarem no teste de normalidade serão analisados através do teste de Mann-Whitney seguido de Kruskal-Wallis e outros testes apropriados se for o caso.

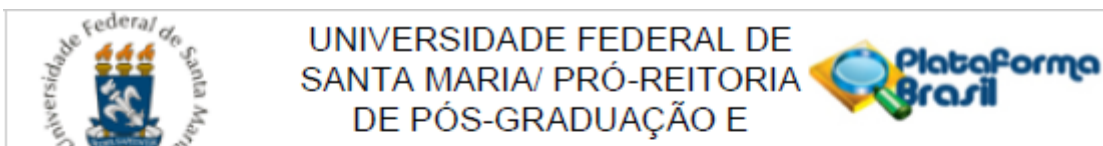
Consta, ainda, cronograma e orçamento.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral: estimar o estatus oxidativo em gestantes gemelares atendidas no ambulatório do HUSM, em gestantes com feto único e em mulheres saudáveis não gestantes, através da determinação de parâmetros indicadores de dano oxidativo em amostras de sangue.

Objetivos específicos

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: 1.288.931

- Avaliar os protetores do estresse oxidativo: as enzimas catalase e superóxido dismutase em eritrócitos; a vitamina C no plasma, e grupamentos tióis (-SH) no plasma e em eritrócitos.
- Avaliar a atividade da enzima sulfidrilica delta-aminolevulinato desidratase (-ALA-D) no sangue total.
- Avaliar a peroxidação lipídica, através do TBARS, no plasma.
- Avaliar a associação dos parâmetros de estresse oxidativo com complicações materno e perinatais nas gestantes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

No TCLE consta a seguinte descrição de riscos e benefícios:

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

Você não terá benefícios diretos. Como benefício o estudo permitirá um maior conhecimento dos problemas que podem ocorrer com as mulheres que estão grávidas, principalmente as que estão esperando filhos gêmeos, evitando assim complicações para futuras gestantes. E caso seja de seu interesse você poderá solicitar cópia de seus exames."

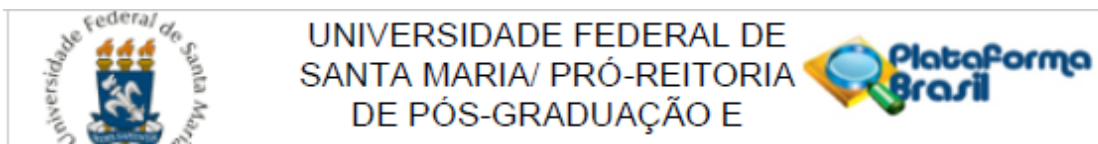
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados de modo suficiente.

O E-MAIL QUE CONSTA NA NOTA DE RODAPÉ DO TCLE ESTÁ DESATUALIZADO. 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.

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: 1.288.931

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:

O E-MAIL QUE CONSTA NA NOTA DE RODAPÉ DO TCLE ESTÁ DESATUALIZADO E A APROVAÇÃO DO PROJETO NÃO EXIME O PROPONENTE DE FAZER A CORREÇÃO.

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.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_598070.pdf	20/10/2015 10:45:07		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_leticia.docx	20/10/2015 10:43:16	thissiane de lima gonçalves	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Scaned_PDF.pdf	19/10/2015 14:55:17	thissiane de lima gonçalves	Aceito
Outros	GAP2.jpg	05/10/2015 11:38:46	thissiane de lima gonçalves	Aceito
Outros	GAP.jpg	05/10/2015 11:38:24	thissiane de lima gonçalves	Aceito
Outros	GEP2.jpg	05/10/2015 11:35:47	thissiane de lima gonçalves	Aceito
Outros	GEP.jpg	05/10/2015 11:35:15	thissiane de lima gonçalves	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	05/10/2015 11:31:00	thissiane de lima gonçalves	Aceito
Outros	Termo_de_confidencialidade.pdf	05/10/2015 11:30:09	thissiane de lima gonçalves	Aceito

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

Bairro: Camobi

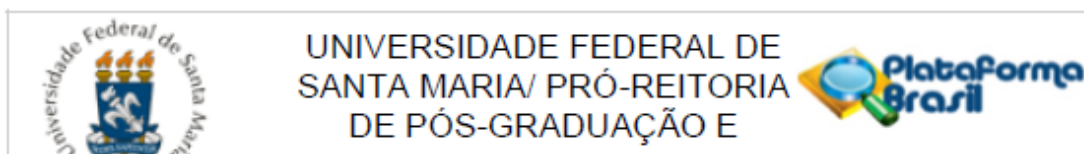
CEP: 97.105-970

UF: RS

Município: SANTA MARIA

Telefone: (55)3220-9362

E-mail: cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.288.931

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento.pdf	05/10/2015 11:29:39	thissiane de lima goncalves	Aceito
---	----------------------------	------------------------	-----------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SANTA MARIA, 21 de Outubro 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