

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Eduardo Benedetti Parisotto

**AÇÃO DA INTERVENÇÃO ANTIOXIDANTE NA SÍNDROME  
DE DOWN**

**DOUTORADO**

FLORIANÓPOLIS

2015



Eduardo Benedetti Parisotto

**AÇÃO DA INTERVENÇÃO ANTIOXIDANTE NA SÍNDROME  
DE DOWN**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, área de concentração Análises Clínicas, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Farmácia.

Orientador: Dr Danilo Wilhelm Filho

Co-orientadora: Dr.<sup>a</sup> Rozangela Curi Pedrosa

Florianópolis

2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Parisotto, Eduardo Benedetti

Ação da intervenção antioxidante na Síndrome de Down /  
Eduardo Benedetti Parisotto ; orientador, Danilo Wilhelm  
Filho ; coorientadora, Rozangela Curi Pedrosa. -  
Florianópolis, SC, 2015.

165 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-  
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Síndrome de Down. 3. Estresse oxidativo.  
4. Terapia antioxidante. 5. Melatonina. I. Wilhelm Filho,  
Danilo. II. Pedrosa, Rozangela Curi. III. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Farmácia. IV. Título.

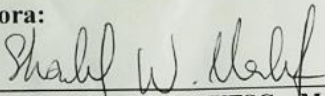
**“Ação da Intervenção Antioxidante na Síndrome de Down”**

**POR**

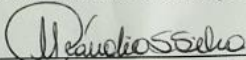
**Eduardo Benedetti Parisotto**

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

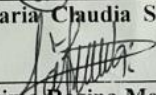
**Banca Examinadora:**



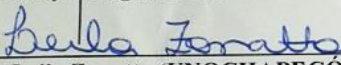
Prof(a). Dr(a). Sharbel Weidner Maluf (UFSC – Membro Titular)



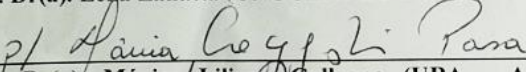
Prof(a). Dr(a). Maria Claudia Santos da Silva (UFSC – Membro Titular)



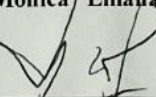
Prof(a). Dr(a). Fátima Regina Mena Barreto Silva (UFSC – Membro Titular)



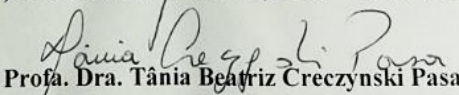
Prof(a). Dr(a). Leila Zanatta (UNOCHAPECO – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Mônica Liliana Galleano (UBA - Argentina – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Danilo Wilhelm Filho (UFSC – Orientador)



Prof(a). Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

Florianópolis, 28 de julho de 2015.



Dedico este trabalho à minha família pelo apoio incondicional.





## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a oportunidade de desfrutar do maior de seus eventos: a vida.

Aos meus pais e irmão pelo amor, carinho e paciência. Agradeço por todo investimento depositado em mim, sempre acreditando em meu potencial. A vocês, não tenho palavras!

Ao meu orientador, Dr. Danilo Wilhelm Filho, por não apenas me orientar e sim me acolher, me dando o prazer e a honra de ser seu último orientado. Meu muito obrigado especial!

À minha co-orientadora, Dr.<sup>a</sup> Rozangela Curi Pedrosa, que sempre me acolheu em seu laboratório, local onde sempre me senti em casa.

À Dr.<sup>a</sup> Carmem Martinez-Cue, minha orientadora de doutorado sanduíche, e à Dr.<sup>a</sup> Noemi Rueda, por terem me aceitado prontamente em seu laboratório. Agradeço também a toda sua equipe pela acolhida: Sara, Vero, Su, Marian, Andrea, Paula e Eva. Muchíssimas gracias chicas!!

À Thais, que deu início ao projeto, e ao iniciação científica, Guilherme Medeiros. Foi muito bom trabalhar com vocês.

À Dr.<sup>a</sup> Patrícia Budni, que me orientou quando IC e que sempre esteve na retaguarda auxiliando de alguma maneira. Obrigado Tita!

Aos meus mais que colegas, amigos do LABIOEX: Nádía (Nadiazinha), Fabiana (Fabi), Mirelle (Mika), Karina (Kaká), Tânia (Taninha), Maicon (Maicolino), João. Um dia nos encontramos por aí e vamos rir muito.

Meu muito obrigado especial à Jú, pela sua amizade. E ao nosso amuleto, o Tuni!

À Dr.<sup>a</sup> Ariane Zamoner Pacheco de Souza e suas “meninas”, por terem me dado a oportunidade de trabalhar em parceria no seu laboratório.

À Prof Dr.<sup>a</sup> Tânia Silvia Fröde, minha supervisora de estágio de docência. Exemplo de competência e seriedade. Também agradeço ao

seu laboratório, em especial sua aluna Julia, pelo auxílio na metodologia da MPO, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ .

À Prof Dr.<sup>a</sup> Emília Addison Machado e suas alunas, especialmente Letícia e Maiara, pela colaboração no projeto.

À Dr.<sup>a</sup> Juliana Bastos e Dr. Gustavo Micke pela parceria desenvolvida conosco.

Ao Laboratório Multiusuário do Centro de Ciências Biológicas (CCB/UFSC), especialmente à Bibiana e Vanessa.

À Andreia Giareta, idealizadora do Projeto Down originalmente concebido.

Aos participantes deste projeto, não existem palavras de agradecimento. Aos pais e às crianças, tenho a certeza que levarei um pouco de cada um comigo.

À APAE e Associação Amigos Down, que nos receberam de braços abertos e sempre engajados no projeto. Obrigado mais uma vez!

Ao Felipe, Renata (Rê), Valtair e Vivi, que nos auxiliaram na coleta das amostras. Obrigado pela dedicação.

À EMS Medicamentos<sup>®</sup>/SP, por ter prontamente se engajado no projeto e ter fornecido todas as vitaminas utilizadas no projeto.

À CAPES, pelo auxílio financeiro concedido através de minha bolsa de doutorado, e também por ter me proporcionado realizar meu Estágio Sanduíche no exterior (PDSE-CAPES).

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia (PGFAR).

*“Cada sonho que você deixa para trás, é um pedaço do seu futuro que deixa de existir.”*

Steve Jobs



## RESUMO

A Síndrome de Down (SD) é a mais frequente desordem genética humana, e é causada, na sua quase totalidade, pela trissomia do cromossomo 21. A geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) está envolvida na patogénia da SD. O objetivo deste estudo foi (I) avaliar o *status* antioxidante no sangue de crianças e adolescentes SD, antes e após a suplementação com vitaminas E e C, (II) bem como o efeito da administração de melatonina (MEL) sobre os biomarcadores de estresse oxidativo (EO) e de neurogênese, em um modelo animal de SD (camundongos Ts65Dn). Biomarcadores de EO e níveis de citocinas inflamatórias foram avaliados em pacientes com SD (n=21), antes e após suplementação diária (vitamina E 400 mg, C 500 mg) durante 6 meses, seguida de interrupção da terapia (por 6 meses) e posteriormente submetidos a uma nova intervenção antioxidante de 6 meses. Crianças saudáveis (n=18) sem SD foram recrutadas para constituir o grupo controle. As atividades da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx), glutationa redutase (GR), glutationa S-transferase (GST), gama-glutamyltransferase (GGT), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e mieloperoxidase (MPO), assim como os conteúdos de glutationa reduzida (GSH), ácido úrico (AU), vitamina E, substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), proteína carbonilada (PC), transferrina, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , foram mensuradas no sangue destes indivíduos. Antes da suplementação, os indivíduos SD, apresentaram aumento da atividade enzimática da SOD, CAT, GR, GGT e MPO, assim como dos níveis séricos de AU, transferrina, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  enquanto que a atividade da GST e os níveis de GSH e PC mostraram valores diminuídos. No entanto, as atividades da GPx e G6PD, assim como os níveis plasmáticos de vitamina E e TBARS, não apresentaram diferenças significativas em comparação aos controles. Após a suplementação antioxidante, as atividades das enzimas SOD, CAT, GPx, GR, GGT e MPO, bem como o conteúdo de TBARS foram diminuídos, as atividades da G6PD e GST, e os níveis de AU, PC, transferrina, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  permaneceram inalterados, enquanto que os conteúdos de GSH e vitamina E mostraram significativo aumento. Após a interrupção da suplementação, houve aumento das atividades da GPx e GGT nos indivíduos SD, assim como nos níveis de AU e TBARS. Nenhuma mudança foi observada nas atividades da SOD, CAT, GR, GST, G6PD e MPO, bem como nos níveis de GSH, vitamina E, PC,

transferrina, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Após nova suplementação, houve aumento dos níveis plasmáticos de vitamina E e diminuição da atividade da GGT nenhuma alteração nas atividades da SOD, CAT, GPx, GR, G6PD, GST e MPO, assim como nos conteúdos de GSH, AU, transferrina, TBARS, PC, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Para o estudo da MEL foram utilizados animais jovens e adultos. Para ambas as idades, foram utilizados dois grupos de camundongos com genótipos diferentes, Controles (Dissômicos) e Ts65Dn (Trissômicos), os quais foram subdivididos e tratados com veículo (água contendo 0,06% etanol) e/ou MEL (100 mg/L), formando 4 grupos experimentais: CO+Veículo, CO+Mel, TS+Veículo e TS+Mel. Para os jovens, o tratamento ocorreu desde a fase pré-natal com as fêmeas prenhas e se estenderam até a idade de experimento (5,5 meses de idade). Já para os adultos o tratamento iniciou com 5,5 e perdurou até 10,5 meses de idade. Tanto para jovens e adultos, foram avaliados biomarcadores de EO no córtex e hipocampo do cérebro desses animais. A neurogênese dos animais jovens (em adultos são dados já publicados) foi avaliada através de imunohistoquímica para Ki-67 (proteína nuclear, expressa em células em mitose) e DAPI (marcador nuclear) no hipocampo desses animais. A administração de MEL diminuiu a atividade da SOD e CAT enquanto não houve mudanças na atividade da GPx e GR e nos níveis de TBARS e PC no córtex e hipocampo. Nos animais adultos, o tratamento com a MEL diminuiu a atividade da SOD apenas no córtex, assim como os níveis de TBARS e PC no hipocampo desses animais, enquanto não houve mudanças na atividade da CAT, GPx e GR no córtex e hipocampo desses animais. Não houve mudanças na densidade de células Ki-67 e DAPI após tratamento com MEL nos animais jovens. Conclusão: (I) A presença da trissomia 21 em crianças e adolescentes resultou em alterações bioquímicas que contribuem para o EO sistêmico e exacerbado nesses pacientes. (II) A terapia antioxidante com vitaminas E e C após 6 meses atenuou o EO. Adicionalmente, (III) o efeito da intervenção antioxidante persistiu significativamente após 6 meses de interrupção da suplementação. (IV). No estudo com camundongos TS também foi observado aumento do EO nos camundongos TS. A MEL foi capaz de diminuir o EO causado pela TS, especialmente nos animais adultos. Além disso, (V) o tratamento com a MEL não modificou a neurogênese nos animais jovens

**Palavras-chave:** Síndrome de Down; espécies reativas de oxigênio, estresse oxidativo, terapia antioxidante, melatonina.

## ABSTRACT

Down syndrome (DS), the most frequent genetic disorder, is almost entirely caused by trisomy of human chromosome 21. The overgeneration of reactive oxygen species (ROS) is involved in DS pathogenesis. The aim of this study was (I) to evaluate biomarkers of oxidative stress (OS) in the blood of DS children and adolescents before and after an antioxidant supplementation with vitamins E and C, as well as (II) the effect of administration of melatonin (MEL) on OS biomarkers and neurogenesis in an SD animal model (Ts65Dn mice). Biomarkers of OS and contents of inflammatory cytokines were evaluated in the blood of DS patients (n=21) before and after a daily antioxidant intervention (vitamin E 400 mg, vitamin C 500 mg) during 6 months followed by an interruption of the supplementation (also 6 months), followed by a new supplementation (6 months). Healthy children (n=18) without DS were recruited to constitute the control group. The activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST), gamma-glutamyltransferase (GGT), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and myeloperoxidase (MPO), as well as the contents of reduced glutathione (GSH), uric acid (UA), vitamin E, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), protein carbonyls (PC), transferrin, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , were measured. Before the antioxidant therapy DS patients showed elevated SOD, CAT, GR, GGT and MPO activity and also elevated UA, transferrin, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels. The GST activity, GSH and PC levels were decreased, while GPx and G6PD activity and also plasma levels of vitamin E and TBARS showed no significant differences compared to controls. After the antioxidant supplementation, the activity of SOD, CAT, GPx, GR, GGT and MPO were downregulated, while TBARS contents were strongly decreased. No changes in G6PD and GST activities as well as in UA, PC, transferrin, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels were detected, while the contents of GSH and vitamin E were significantly increased. After interruption of the antioxidant therapy, DS patients showed elevated GPx and GGT activities as well as elevated UA and TBARS levels, while no changes in SOD, CAT, GR, GST, G6PD and MPO activities as well as in GSH, vitamin E, PC, transferrin, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels were detected. After the new period of supplementation there was an increase in plasma levels of vitamin E and decreased GGT activity, while no

changes in SOD, CAT, GPx, GR, G6PD, GST and MPO activity as well as in the contents of GSH, UA, transferrin, TBARS, PC, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . The MEL intervention in young and adult animals used two groups of mice with different genotypes, controls (euploid littermates) and Ts65Dn (with trisomy), which were subdivided and treated with vehicle (water containing 0.06% ethanol) and/or MEL (100 mg/L), forming four groups: CO+Vehicle, CO+MEL, TS+Vehicle and TS+MEL. For young animals treatment occurred from the pre-natal stage with pregnant females and extended until the age of experiment (5.5 months), while for adults the treatment began and lasted 5.5 to 10.5 months of age. Both young and adults were assessed through OS biomarkers in the cortex and hippocampus. Neurogenesis of young animals (in adults data were already published) was assessed by immunohistochemistry for Ki-67 (nuclear protein expressed in cells in mitosis) and DAPI (nuclear marker) in the hippocampus. MEL administration decreased SOD and CAT activity while no changes in the activity of GPx and GR, as well as in levels of TBARS and PC in the cortex and hippocampus were detected. In adults MEL treatment promoted decreased SOD activity only in the cortex, as well as TBARS and PC levels in the hippocampus, whereas no changes in the CAT, GPx and GR activity in the cortex and hippocampus were detected. No changes in the density of Ki-67 and DAPI cells after treatment with MEL in young animals. Conclusions: (I) The presence of trisomy 21 in children and adolescents results in biochemical changes that strongly contributes to a systemic and exacerbated oxidative stress in these patients. (II) The antioxidant intervention with vitamins E and C for 6 months consistently attenuated such oxidative insult. Furthermore, (III) the effect of the antioxidant intervention persisted after 6 months of withdrawal of the antioxidant supplementation. (IV) In the study with TS mice, increased OS in brain was also observed. (V) MEL was able to decrease OS caused by TS, especially in adult animals, while it did not alter neurogenesis in young animals.

**Keywords:** Down Syndrome; reactive oxygen species, oxidative stress, antioxidant supplementation, melatonin.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Cariótipo de um portador de Síndrome de Down. ....	33
<b>Figura 2-</b> Esquema simplificado da produção de EROs, sistema de defesa antioxidante enzimático e suas consequências biológicas nos sistemas celulares. ....	44
<b>Figura 3-</b> Principais antioxidantes naturais enzimáticos e não-enzimáticos. ....	47
<b>Figura 4-</b> Estrutura química do $\alpha$ -tocoferol (vitamina E).....	48
<b>Figura 5-</b> Estrutura química do ácido ascórbico (vitamina C) .....	49
<b>Figura 6-</b> Estrutura esquemática do processo de regeneração da vitamina E pela ação sinérgica com a vitamina C. ....	51
<b>Figura 7-</b> Estrutura química da melatonina. ....	52
<b>Figura 8-</b> Proposta de mecanismo de geração de EROs mediada por GGT. ....	57
<b>Figura 9-</b> Relação entre o Estresse Oxidativo e Processo inflamatório. ....	59
<b>Figura 10-</b> Representação esquemática dos segmentos de genes envolvidos em diferentes modelos animais de SD comparativamente ao HSA21 humano. ....	62
<b>Figura 11-</b> Fluxograma da amostra. ....	69
<b>Figura 12-</b> Defesas antioxidantes não enzimáticas.....	80
<b>Figura 13-</b> Enzimas antioxidantes .....	82
<b>Figura 14-</b> Enzimas antioxidantes envolvidas com a GSH .....	84
<b>Figura 15-</b> Concentrações de Transferrina. ....	85

<b>Figura 16-</b> Marcadores de dano oxidativo. ....	87
<b>Figura 17-</b> Marcadores inflamatórios.....	89
<b>Figura 18-</b> Defesas antioxidantes enzimáticas no córtex e hipocampo de animais jovens e adultos. ....	117
<b>Figura 19-</b> Marcadores de dano oxidativo no córtex e hipocampo de animais jovens e adultos. ....	118
<b>Figura 20-</b> Imunohistoquímica para Ki-67 e Imunofluorescência para DAPI em animais TS jovens.....	120

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1-</b> Alguns dos genes localizados no cromossomo 21 que possivelmente exercem consequências biológicas na SD. ....	34
<b>Quadro 2-</b> Aspectos clínicos associados à SD. ....	36
<b>Quadro 3-</b> Principais EROs radicalares e não radicalares. ....	41
<b>Quadro 4-</b> Primers e sondas utilizadas para realização do cariótipo dos animais do estudo. ....	109



## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1-</b> Conteúdo de aMLTs na urina dos diferentes grupos tratados com Veículo e Melatonina, no período noturno e diurno.....	115
---	-----



## LISTA DE ABREVIATURAS

AA-NAT	Acetiltransferase arilalquilamina N
aMLT	Sulfato de 6-hidroxi melatonina
4-AMP	4-aminoantipirina
APAE	Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais
APP	<i>Amyloid precursor protein</i>
AU	Ácido Úrico
ATP	Adenosina trifosfato
BHA	Hidroxianisol butilado
BHT	Hidroxitolueno butilado
BrdU	Bromo-deoxiuridina
BSA	Albumina de soro bovino
CAT	Catalase
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
C/EBP $\beta$	Proteína potencializadora de ligação $\beta$
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
Cu <sup>++</sup>	Cobre
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DA	Doença de Alzheimer
DHBS	Diclorohidroxibenzeno sulfonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Doença de Parkinson
DPTA	Ácido dietilenotriaminopentacético
DTNB	Ácido 2-nitrobenzóico
diTyr	DiTirosina
DSCR	Região Crítica para a Síndrome de Down
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
EO	Estresse Oxidativo
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
Fe <sup>2+</sup>	Ferro
GGT	$\gamma$ -glutamyltransferase ou $\gamma$ -glutamylcisteína-sintase
GLUT	Transportadores de glicose
GR	Glutationa redutase
GPx	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa reduzida

GSSG	Glutathiona oxidada
GST	Glutathiona S-transferase
G6PD	Glicose 6-fostafato desidrogenase
HIOMT	Hidroxiindol-O-metiltransferase
HOCI	Ácido Hipocloroso
HOO <sup>•</sup>	Espécies superóxido
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
•OH	Radical hidroxil
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL-2	Interleucina-2
IMC	Índice de Massa Corporal
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LPO	Lipoperoxidação
Mb	Megabases
MDA	Malondialdeído
MEL	Melatonina
MPO	Mieperoxidase
NAC	N-acetilcisteína
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NFκB	Fator nuclear kappa beta
NMDA	N-metil D-Aspartato
•NO	Óxido nítrico
OLIG2	Oligodendrocyte lineage transcription factor 2
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Ânion superóxido
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxigênio singlete
pb	Pares de bases
PB	Tampão fosfato
PBS	Tampão fosfato salino
PB-TBSA	Solução de PB, Triton X-100 e BSA
PC	Proteína Carbonilada
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PKC	Proteína cinase C
QI	Coefficiente de inteligência
RL	Radical (is) livre (s)
RO <sup>•</sup>	Radical alcóxil
ROO <sup>•</sup>	Radical peróxil



ROOH	Hidroperóxido lipídico
SD	Síndrome de Down
SGZ	Camada subgranular do giro denteado
SIM2	<i>Single-minded homolog-2</i>
SOD	Superóxido dismutase
SOD1	Cu/Zn Superóxido dismutase
S100B	<i>S100 Calcium binding protein</i>
SVCT	Transportadores de vitamina C dependentes de sódio
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
t-BuOOH	Terc-butilhidroperóxido
TCA	Ácido tricloroacético
TNB	Ânion tiolato
TS	Trissômicos
8OHdA	5'-8-ciclo-2'-desoxiadenosina
8-OHdG	5'-8-ciclo-2'-desoxiguanosina



## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	29
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	31
2.1	SÍNDROME DE DOWN.....	31
2.1.1	Histórico.....	31
2.1.2	Generalidades.....	32
2.1.3	Base Genética.....	32
2.1.4	Aspectos Clínicos.....	34
2.1.5	Diagnóstico.....	38
2.2	RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNICO.....	38
2.3	DEFESAS ANTIOXIDANTES.....	42
2.3.1	Enzimas antioxidantes.....	44
2.3.2	Antioxidantes não-enzimáticos.....	46
2.4	ESTRESSE OXIDATIVO E SUAS CONSEQUÊNCIAS BIOLÓGICAS.....	53
2.4.1	Dano ao DNA e às proteínas.....	54
2.4.2	Peroxidação Lipídica.....	55
2.4.3	Radicais Livres, Envelhecimento e Neurodegeneração.....	55
2.4.4	$\gamma$ -Glutamyltransferase e Estresse Oxidativo.....	56
2.5	INFLAMAÇÃO E ESPÉCIES REATIVAS.....	58
2.6	DESEQUILÍBRIO OXIDATIVO NA SÍNDROME DE DOWN E TERAPIA ANTIOXIDANTE.....	59
2.7	MODELO ANIMAL DE SD: O CAMUNDONGO Ts65Dn.....	61
2.7.1	Alterações Cognitivas.....	61
2.7.2	Alterações Neuromorfológicas.....	62
2.7.3	Neurodegeneração.....	63
2.7.4	Marcadores de Neurogênese.....	63
3.	CAPÍTULO 1: MONITORAMENTO DOS NÍVEIS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM SÍNDROME DE DOWN ANTES E APÓS INTERVENÇÃO ANTIOXIDANTE.....	65
3.1	OBJETIVOS.....	65
3.1.1	Objetivos Gerais.....	65
3.1.2	Objetivos Específicos.....	65
3.2	SUJEITOS E MÉTODOS.....	67

3.2.1	Delineamento Experimental.....	67
3.2.2	Determinação das Defesas Antioxidantes Não Enzimáticas.....	70
3.2.3	Determinação da Atividade das Enzimas Antioxidantes (Defesas Enzimáticas).....	72
3.2.4	Marcadores de Dano Oxidativo.....	75
3.2.5	Conteúdo de Transferrina.....	76
3.2.6	Marcadores Inflamatórios.....	76
3.2.7	Equipamentos e Reagentes.....	77
3.2.8	Análise Estatística.....	77
3.3	RESULTADOS.....	79
3.4	DISCUSSÃO.....	91
3.5	CONCLUSÃO.....	103
4.	CAPÍTULO 2: EFEITO DA MELATONINA SOBRE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E NEUROGÊNESE EM UM MODELO ANIMAL DE SÍNDROME DE DOWN.....	105
4.1	OBJETIVOS.....	105
4.1.1	Objetivos Gerais.....	105
4.1.2	Objetivos Específicos.....	105
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	107
4.2.1	Animais.....	107
4.2.2	Tratamentos e Amostras.....	110
4.2.3	Concentrações de melatonina.....	110
4.2.4	Marcadores de Estresse Oxidativo.....	111
4.2.5	Estudo Neuromorfológico: Neurogênese.....	112
4.2.6	Análise Estatística.....	113
4.3	RESULTADOS.....	115
4.4	DISCUSSÃO.....	121
4.5	CONCLUSÃO.....	125
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	127
6.	PERSPECTIVAS.....	129
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131
8.	ANEXOS.....	155

## 1. INTRODUÇÃO

A síndrome de Down (SD) é uma condição genética que constitui uma das causas mais frequentes de deficiência mental. Resulta da presença de três cópias do cromossomo 21 ao invés de duas cópias. A cópia extra do cromossomo 21 afeta muitas características fenotípicas e fisiológicas como, por exemplo, deficiência mental, imunodeficiência, catarata, risco aumentado de leucemia, envelhecimento precoce e alterações neuropatológicas semelhantes às encontradas na doença de Alzheimer (GARCEZ; PERES; SALVADOR, 2005). O aparecimento destas diversas condições clínicas parece estar ligado ao estresse oxidativo o qual estas pessoas estão submetidas.

Neste sentido, a eficácia da terapia antioxidante na depleção de marcadores de estresse oxidativo e seus efeitos danosos, bem como no *status* antioxidante dos indivíduos suplementados já foi demonstrado em diversos estudos realizados por nosso grupo de pesquisa, porém nunca na SD.

Diante disso, este estudo torna-se importante para a área da saúde, o que permitirá uma melhor compreensão dos efeitos da suplementação antioxidante com vitamina E e C e melatonina, visando estratégias terapêuticas para prevenir ou atenuar os efeitos causados pelo estresse oxidativo na SD, o que pode contribuir para uma melhor qualidade de vida destes indivíduos.

Este trabalho estará dividido em dois Capítulos: o primeiro (Capítulo 1), refere-se à suplementação antioxidante com vitaminas E e C em crianças e/ou adolescentes com SD desenvolvido no Laboratório de Ecofisiologia Respiratória/CCB/UFSC e Laboratório de Bioquímica Experimental/CCB/UFSC, e o segundo (Capítulo 2), decorrente do estágio de Doutorado Sanduíche na Faculdade de Medicina da Universidade de Cantábria (UC), Santander, Espanha, que se refere aos efeitos da melatonina sobre biomarcadores de estresse oxidativo e neurogênese em um modelo animal de SD.



## **2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 SÍNDROME DE DOWN**

#### **2.1.1 Histórico**

As trissomias autossômicas do cromossomo 21, 18 e 13 foram as primeiras anormalidades cromossômicas identificadas. A Síndrome de Down (SD) é, sem dúvida, a mais comum e a mais conhecida das aberrações cromossômicas. Inicialmente era conhecida como mongolismo, sendo primeiramente descrita por John Longdon Down em 1866, o qual observou duas características marcantes em sua distribuição populacional: a idade materna avançada e a ocorrência de um padrão peculiar dentro das famílias, ou seja, a concordância em todos os gêmeos monozigóticos e nos outros parentes. John Longdon Down publicou então um artigo com uma descrição precisa de algumas das características desta síndrome que hoje leva seu nome (PUESCHEL, 1981; SNUSTAD, 2001).

No entanto, é comum na literatura médica encontrar relatos que as características físicas da SD foram descritas cerca de 20 anos antes por Esquirol e Sequin, pois a primeira descrição de uma criança que supostamente tinha SD, foi descrita por Esquirol no ano de 1838. Oito anos mais tarde, Sequin descreveu um paciente com características sugestivas de uma anomalia, que mais tarde ficou conhecida como SD. Em 1959, Lejeune e Jacobs, determinaram que a SD é causada por trissomia do cromossomo 21. Em 1974, Nebuhr sugeriu que o "fenótipo da SD" poderia ser causado pela duplicação de apenas uma parte da banda do cromossomo 21q22, que por si só, representa cerca de uma metade do braço longo, tornando-se assim, a mais conhecida trissomia, dita trissomia 21, ou ainda, trissomia G (DESAI; FAYETTEVILLE, 1997; MEGARBANE et al., 2009).

### **2.1.2 Generalidades**

A SD ocorre em todas as populações, independente de raça, etnia ou grupo socioeconômico (CHOI et al., 2012). Cerca de 95% das trissomias acometidas são trissomia 21, de modo que sua contagem cromossômica é de 47. A causa mais comum de trissomia e, portanto da SD, é a não disjunção meiótica. Os progenitores de crianças SD apresentam um cariótipo normal e são normais em todos os aspectos. A idade materna tem uma forte influência na incidência da SD. A correlação com a idade materna sugere que, na maioria dos casos, a não disjunção meiótica do cromossomo 21 ocorre no óvulo (DESAI; FAYETTEVILLE, 1997; KUMAR et al., 2008). A SD ocorre em cada 1.550 nascidos vivos em mulheres com menos de 20 anos de idade, comparada com um em cada 25 nascidos vivos nas mulheres com mais de 45 anos. A prevalência da SD varia de 1/650 a 1/1000 nascimentos em todo o mundo (WHO, 2012). Apenas nos EUA são 5400/4 milhões de nascidos (CHURCHILL et al., 2012). No Brasil, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (IBGE), existem 300 mil pessoas com esta síndrome (BRASIL, 2012).

Na quase totalidade das trissomias livres (95%), a origem do cromossomo extra, é materna. Ainda não está definido o motivo para a maior suscetibilidade do óvulo ao erro da não-disjunção. Alguns trabalhos com marcadores pericentroméricos para determinar o estágio da meiose em que ocorre a não disjunção revelaram que os erros maternos ocorrem, em sua maioria (70%), na meiose I, enquanto o restante (30%) ocorrem durante a meiose II (SHERMAN et al., 1991; SHERMAN et al., 1994; PAVARINO-BERTELLI et al., 2005). Além disso, nenhum efeito da idade paterna foi encontrado naqueles casos nos quais o cromossomo extra deriva do pai (SMITH, 1988; REGEZI; SCIUBBA, 1989; KUMAR et al., 2008).

### **2.1.3 Base Genética**

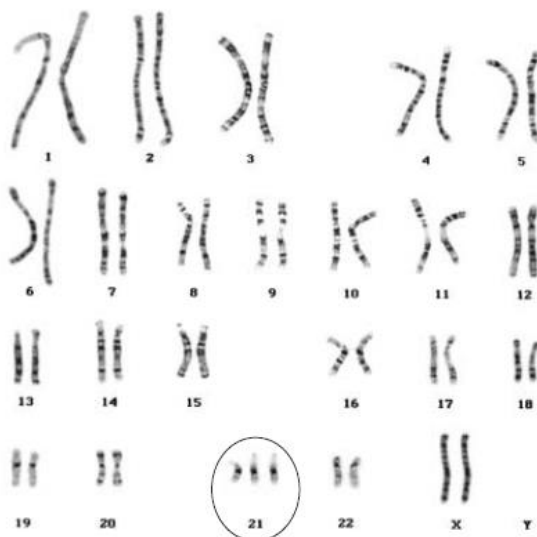
Apesar da etiologia da SD ainda não estar totalmente esclarecida, pesquisas têm continuado a desvendar a base genética da SD (THOMPSON; THOMPSON, 2001). Esta condição genética é uma anomalia congênita, facilmente reconhecida, autossômica (ligada aos cromossomos não sexuais), caracterizada por deficiência de crescimento generalizado e deficiência mental. (HASSOLD et al., 1985; REGEZI; SCIUBBA, 1989). Conforme já mencionado, aproximadamente 95%



dos casos de SD têm cromossomo 21 extra, ou seja, apresentando 47 cromossomos, ao invés de 46 cromossomos. Os outros 5% são explicados por outras anormalidades cromossômicas, incluindo translocações do tipo Robertsonianas (3%), mosaïcismo (2%), ou ainda, trissomia parcial (SMITH, 1988; REGEZI; SCIUBBA, 1989).

A translocação é o processo de transferência de parte de um cromossomo para um cromossomo não homólogo. Para a ocorrência deste processo, é necessário a quebra de ambos os cromossomos, reconstituindo-se em uma disposição anormal. A maioria das translocações que trazem como consequência a SD é do tipo Robertsoniana (tipo especial de translocação na qual ocorre quebra nos centrômeros e fusão de braços inteiros de cromossomos acrocêntricos dos grupos G e D, sendo que a mais comum envolve os cromossomos 21 e 14 (Figura 1) (THOMPSON; THOMPSON, 2001).

**Figura 1-** Cariótipo de um portador de Síndrome de Down.



**Fonte:** Antonarakis et al., 2004.

No mosaicism, algumas células apresentam 46 cromossomos e outras 47 cromossomos. As anormalidades apresentadas, nesse caso, são suaves com nível de intelectualidade aproximando-se do normal, dependendo do número de células e dos tecidos afetados. Já nos casos de trissomia parcial, o que ocorre não é a presença de uma cópia extra do cromossomo 21, e sim uma duplicação de uma região do cromossoma 21, levando à expressão de genes extra (porém não todos), havendo assim, manifestações da SD, conforme Quadro 1 (REGEZI; SCIUBBA, 1989; SMITH, 1988).

**Quadro 1-** Alguns dos genes localizados no cromossomo 21 que possivelmente exercem consequências biológicas na SD.

<b>Gene</b>	<b>Localização</b>	<b>Consequências</b>
<b>Single-minded homolog-2 (SIM2)</b>	<b>21q22.2</b>	Desenvolvimento do cérebro, para a divisão celular sincronizada
<b>Amyloid beta-peptide (APP)</b>	<b>21q21.3</b>	Formação de placas senis
<b>S100 Calcium binding protein B (S100B)</b>	<b>21q22.1</b>	Envelhecimento neuropatológico e degeneração
<b>Superoxide dismutase (SOD1)</b>	<b>21q22.1</b>	Aceleração do envelhecimento pela produção exacerbada de peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
<b>Oligodendrocyte lineage transcription factor 2 (OLIG2)</b>	<b>21q22.2</b>	Deficiência de aprendizagem

**Fonte:** Adaptado de PAVARINO-BERTELLI et al., 2005

### **2.1.4 Aspectos Clínicos**

As crianças com SD apresentam alterações clínicas, dentre elas: déficits cognitivo e psicomotor, múltiplas malformações (Quadro 2). As manifestações clínicas são variadas, podendo algumas delas não estar presentes em cada criança. A presença de hipotonia que pode variar de

moderada à severa, é bastante característica. Comprometimento cognitivo pode variar de leve a moderado, podendo chegar a um grave retardo mental (VERMA et al., 2012). O Quadro 2 mostra os principais aspectos clínicos associados à SD.

**Quadro 2-** Aspectos clínicos associados à SD.

<b>Condição associada</b>	<b>Características clínicas</b>
<b>Retardo mental</b>	Sintoma importante da SD. No entanto, é grande a heterogenicidade e o grau de anormalidade. A medida de inteligência (coeficiente de inteligência - QI) da SD varia de 20-85. Seu maior valor pode chegar perto da faixa mais baixa de indivíduos normais, porém os valores mais baixos revelam uma condição altamente contestável.
<b>Malformação cardíaca (congenita)</b>	Anomalias congênitas estão presentes em quase 40% de crianças com SD. É importante excluir a presença de doença cardíaca congênita, através de eletrocardiograma, pois este é o principal determinante de sobrevivência. Os defeitos mais comuns são: malformações no canal atrioventricular, nas comunicações interventriculares e interatriais.
<b>Doenças da tireóide</b>	Doenças da tireóide, como por exemplo, hipotireoidismo, ocorre em 4-18% dos casos. A prevalência do hipotireoidismo aumenta com a idade.
<b>Problemas hematopoiéticos</b>	Crianças com SD possuem elevado risco de desenvolvimento de leucemia, geralmente leucemia linfóide aguda (LLA) e leucemia mielóide aguda (LMA), além de apresentarem altos índices de doença mieloproliferativa transitória. Aproximadamente 1 a cada 200 é afetada. Isto representa um aumento de 10-20 vezes em relação a outras crianças. No caso da LMA, a origem deve-se ao acúmulo somáticos de mutações do gene GABA-1, o qual está ligado à transcrição de um fator associado à diferenciação eritróide e megacariocítica.

<b>Epilepsia</b>	Relatado de 1-13% dos casos. Vários mecanismos celulares e moleculares contribuem para a gênese da epilepsia, porém ainda estão sendo estudadas.
<b>Infecções</b>	Possuem elevadas taxas de infecção. A causa para a elevada suscetibilidade às infecções ainda é incerta. Estudos demonstraram alterações humorais e celulares na resposta imune desses indivíduos.
<b>Sobrevida</b>	A longevidade nesses indivíduos é mais baixa, porém aumentou nos últimos anos. No ocidente, a expectativa de vida chega a 60 anos.
<b>Doenças Neurodegenerativas</b>	Estudos realizados em portadores de SD mostraram uma prevalência de 55% apresentarem demência na faixa etária de 35 – 49 anos, ocorrendo aumento para 75% em indivíduos com idade superior a 60 anos. Além disso, muitas dessas pessoas desenvolvem alterações neuropáticas semelhantes àquelas encontradas na Doença de Alzheimer (DA). Entre suas consequências, após os 30 anos de idade, invariavelmente pessoas com SD começam a desenvolver placas amilóides e emaranhados neurofibrilares continuando até os 70 anos, 75% dessas pessoas desenvolvem demência. A ligação entre a SD e DA se deve à presença de 3 cópias do gene APP, consequentemente, maior expressão da proteína APP, que reside no cromossoma 21.
<b>Outras condições</b>	Outras funções, como problemas visuais (problemas de refração e catarata), apneia obstrutiva do sono, atraso na erupção dentária, hipodontia, convulsões, doença celíaca, têm sido observadas em indivíduos com esta condição genética.

---

**Fonte:** Adaptado de WILSON, 1994; DESAI; FAYETTEVILLE, 1997; FRIDMAN et al., 2004; MENENDEZ, 2005; XAVIER; TAUB, 2010; BRUWIER; CHANTRAIN, 2012; NESS et al., 2012; VERMA et al., 2012.

### 2.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico da SD normalmente é feito em período pré-natal. O diagnóstico pré-natal permite na gravidez determinar ou não se o feto é portador da SD (MATOS et al., 2007).

Dentre os métodos não-invasivos destacam-se a triagem do soro materno e o diagnóstico por imagem. Existem quatro marcadores séricos nesta triagem: a alfa-fetoproteína e o estriol não-conjugado (valores abaixo do normal em casos de SD), e a gonadotrofina coriônica humana e a inibina A (neste caso, feto com SD, as mães apresentam concentrações aumentadas) (MATOS et al., 2007).

Além disso, existe também o diagnóstico por imagem, baseado principalmente na ultrassonografia e na ecografia, evidenciando assim, as malformações congênitas. Porém, o diagnóstico por imagem não é confirmatório, pois apesar de evidenciar as malformações, não certifica a presença de alterações cromossômicas (BARINI, 2002).

Existem ainda procedimentos invasivos, como a cordoncentese, amniocentese ou biópsia das vilosidades coriônicas, os quais são utilizados para testes confirmatórios através de análises bioquímicas, genéticas (cariótipos fetal), ou ainda técnicas de biologia molecular, como reação em cadeia de polimerase (PCR), utilizando como amostra as células fetais coletadas (VERMA et al., 1998).

Apesar de todas essas técnicas diagnósticas, elas são apenas recomendadas em casos que existam fatores com uma maior probabilidade do casal ter um filho com SD, sendo assim, na prática, o diagnóstico clínico deve ser confirmado laboratorialmente, pelo cariótipo.

## 2.2 RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Segundo Alfadda e Sallam (2012), o primeiro artigo publicado sobre espécies reativas de oxigênio (EROs) foi registrado em 1945 por Stuffins e Weatherall. Entretanto, o primeiro artigo a revelar a importância biológica das EROs remete à Gerschman e colaboradores (1954), e desde então, milhares de artigos foram publicados sobre o assunto. A maioria dos estudos ligados às EROs está relacionada com doenças como câncer, resistência à insulina, *diabetes mellitus*, doenças

cardiovasculares, neurodegenerativas, envelhecimento, dentre outras. Por outro lado, numerosos processos fisiológicos e mecanismos essenciais de proteção que os organismos utilizam para sua sobrevivência dependem da geração de EROs (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Evidentemente, esses últimos, constituem o papel na defesa imunológica, ação antibacteriana, tônus vascular e transdução de sinal. Assim, tornou-se evidente que a fim de manter a homeostase, os organismos tentam manter o equilíbrio, pelo controle rígido da geração de EROs, com ajuda de um complexo sistema antioxidante (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; ALFADDA; SALLAM, 2012).

A produção de EROs constitui um processo fisiológico, que ocorre de maneira contínua, o qual exerce importantes funções biológicas. Durante os processos metabólicos, as EROs atuam como mediadores para a transferência de elétrons em muitas reações bioquímicas. Sua produção, em proporções adequadas, possibilita uma série de processos, como a geração de energia na forma de ATP, através da cadeia transportadora de elétrons, fertilização do óvulo, ativação de genes e participação de mecanismos de defesa durante processos infecciosos. Porém, essas EROs, quando produzidas em excesso, podem trazer consequências danosas (BARBOSA et al., 2010).

Uma das definições mais comum e abrangente de radicais livres (RL) consiste em uma espécie (átomo ou molécula) que possui um ou mais elétrons desemparelhados, sendo capaz de existência independente (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A designação de EROs engloba tanto espécies radicalares quanto não radicalares, que, mesmo não possuindo elétrons desemparelhados em seu último orbital, possuem reatividade devido à sua instabilidade, por exemplo, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Portanto, EROs são espécies altamente reativas que se originam principalmente na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Cerca de 98% de todo o  $O_2$  consumido pelas células eucariotas é reduzido por 4 elétrons (redução tetravalente) para render 2 moléculas de  $H_2O$  pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, e assim obter ATP através do processo de

fosforilação oxidativa (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; SANCHEZ, 2012).

As EROs são produzidas também por outras vias, como por exemplo, “*burst oxidativo*” que ocorre em fagócitos ativados, o efeito da radiação ionizante sobre os componentes das membranas celulares, como subprodutos de várias enzimas celulares incluindo NADPH oxidase, xantina oxidase e oxido nítrico sintase endotelial, entre vários outros (ALFADDA; SALLAM, 2012).



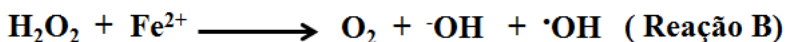
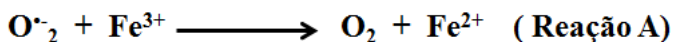
**Quadro 3-** Principais EROs radicalares e não radicalares.

Espécie Reativa	Principais Características
<b>Radicalares</b>	
Ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ )	Produzido em reações de auto-oxidação, envolvendo flavoproteína e ciclo redox. O $O_2^{\bullet-}$ é formado a partir da redução parcial do $O_2$ , principalmente na respiração mitocondrial. Possui meia-vida de aproximadamente $5 \times 10^5 Ms^{-1}$ , sob $pH=7,0$ .
Radical hidroxil ( $HO^{\bullet}$ )	Sua formação decorre da redução do $O_2$ por 3 elétrons. Radical extremamente reativo e lesivo, devido à sua meia-vida ser $\sim 10^{-9}$ s. Sua produção ocorre em sítios onde são formados $O_2^{\bullet-}/H_2O_2$ , na presença de metais de transição, especialmente o ferro ( $Fe^{2+}$ ) e cobre ( $Cu^+$ ) (Reação de Fenton), e na Reação de Haber-Weiss.
Radical peroxil e alcóxil ( $ROO^{\bullet}$ e $RO^{\bullet}$ )	Possuem meia-vidas de $\sim 10^{-6}$ s e $\sim 10^{-7}$ s, respectivamente. Ambos são intermediários da lipoperoxidação.
Óxido nítrico ( $\bullet NO$ )	É um gás incolor que possui um elétron desemparelhado localizado entre o átomo de nitrogênio e $O_2$ . É relativamente pouco estável em presença de $O_2$ molecular, com tempo de meia vida de aproximadamente 3-5 segundos.
<b>Não-Radicalares</b>	
Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )	Ocorre sua formação pela redução do $O_2$ por 2 elétrons. Produção por vias enzimáticas (oxidases e superóxido dismutase). Sua degradação ocorre por via enzimática (catalase e glutathione peroxidase). Altamente estável e difusível.
Ácido hipocloroso ( $HOCl$ )	Potente agente oxidante. Formado pelos neutrófilos ativados nos sítios inflamatórios, através da ação da enzima mieloperoxidase (MPO). Esta espécie reativa reage com os grupos $-SH$ e amino das proteínas, e pode clorinar as bases pirimídicas do DNA.

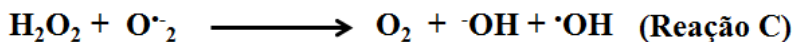
Fonte: Adaptado de HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; SANCHEZ, 2012.

Apesar de que tanto o  $O_2^{\bullet-}$  como o  $H_2O_2$  serem relativamente pouco reativos, ambos podem interagir com íons metais de transição como o ferro e o cobre, dando origem a uma espécie extremamente reativa, o  $\bullet OH$ , reação esta conhecida como Reação de Fenton (Reação A e B), e ainda pela Reação de Haber-Weiss (Reação C) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007, LIPINSKI, 2011.).

Sequência da reação de Fenton



Reação de Haber-Weiss



O  $\bullet OH$  possui a maior reatividade dentre os RL, devido ao curto tempo de meia-vida em soluções aquosas, da ordem de  $10^{-9}$  a  $10^{-10}$ s (Quadro 3). Além disso, nenhum organismo possui enzima antioxidante para sua metabolização devido à sua labilidade e reatividade, somente existem sequestradores específicos atuando como defesa antioxidante contra esta espécie, como a glutatona reduzida (GSH) (CHANCE et al., 1979; SÁNCHEZ, 2012). Assim, o  $\bullet OH$  pode reagir com várias estruturas celulares, como no caso de proteínas (consequentemente enzimas e membranas), lipídios, por mecanismos de oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados, os quais estão presentes nas membranas celulares, fenômeno este conhecido como lipoperoxidação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

### 2.3 DEFESAS ANTIOXIDANTES

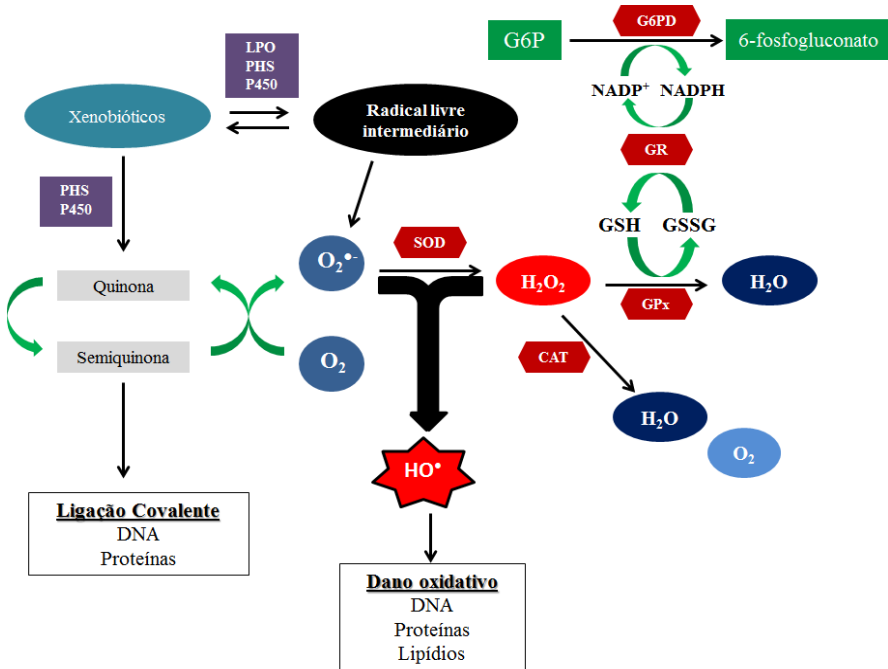
Segundo Halliwell e Gutteridge (2007), antioxidante é toda substância que, mesmo presente em baixa concentração, quando comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo. Assim, os organismos

dispõem de um sistema de defesa antioxidante que inibem e/ou eliminam os RL e EROs, atenuando as consequências danosas causadas pela ação deletéria. Os mecanismos utilizados para isto ocorrem através da prevenção (impedindo a formação de RL ou EROs), impedindo a sua ação (pelos sistemas de *scavengers*), ou ainda, através do sistema de reparo (pelo reparo e reconstituição das estruturas biológicas que foram danificadas).

O sistema de defesa antioxidante pode ser dividido em enzimático e não-enzimático. No segundo caso, uma grande variedade de substâncias constitui o grupo desses antioxidantes, os quais podem ter origem biológica, ou ainda, da dieta (ditos antioxidantes naturais ou nutricionais). Existem ainda, dentro do grupo dos antioxidantes não-enzimáticos, as substâncias sintéticas, como o BHA (hidroxianisol butilado) e o BHT (hidroxitolueno butilado), utilizados na indústria alimentícia, ou ainda, a N-acetilcisteína (NAC), precursor da GSH, a qual possui propriedades farmacológicas e é muito utilizada na clínica como agente mucolítico e como antídoto para intoxicações por paracetamol (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; BARBOSA et al., 2010).

O controle da atividade das enzimas antioxidantes nas células é importante para a sobrevivência no ambiente aeróbico. Todos os organismos eucariotos possuem enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPx), que reagem com os compostos oxidantes e protegem as células e os tecidos do estresse oxidativo. Os radicais  $O_2^\bullet$  são convertidos a  $H_2O_2$  pelas enzimas Cu/Zn-SOD e Mn-SOD. Por conseguinte, CAT e a GPx, de forma independente, convertem o  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ , porém a primeira de forma específica. Na reação catalisada pela GPx, ocorre consumo de GSH, porém este tripeptídeo pode ser novamente convertido à sua forma reduzida (GSH), pela ação da glutatona redutase (GR), às custas de NADPH, portanto, com ação antioxidante de forma indireta. A enzima G6PD fornece NADPH, o qual é oriundo da via das pentoses (Figura 2) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

**Figura 2-** Esquema simplificado da produção de EROs, sistema de defesa antioxidante e suas consequências biológicas nos sistemas celulares.



(PHS) Prostaglandina H sintase; (LPO) lipoxigenase; (P450) Citocromo P450.

Fonte: Adaptado de HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007.

### 2.3.1 Enzimas Antioxidantes

#### 2.3.1.1 Superóxido dismutase (SOD)

É uma metaloenzima essencial em todos os tecidos e células. Esta enzima remove o  $O_2^{\bullet-}$  pela dismutação para  $O_2$  e  $H_2O_2$  (Figura 2) e foi a primeira enzima antioxidante descoberta e descrita na literatura (McCORD; FRIDOVICH, 1969). Nos eritrócitos, encontra-se ligada a um metal, cobre (Cu-SOD) ou zinco (Zn-SOD), constituindo assim, a porção ativa da enzima. Nesse sítio, ocorre a transferência do elétron do  $O_2^{\bullet-}$  para o metal. A dieta deficiente desses metais pode levar a uma

diminuição de sua atividade enzimática (HARVEY, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

### **2.3.1.2 Catalase (CAT)**

É uma hemoproteína responsável pela redução específica do  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$  (Figura 2). Sua atividade é dependente do ferro presente na porção heme. Como o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é uma molécula extremamente estável e difusível, passa do meio extracelular de outros tecidos do organismo para os eritrócitos e vice-versa, constituindo-se em uma molécula sinalizadora importante. Sendo assim, a presença desta enzima nos eritrócitos também é capaz de atenuar a degradação oxidativa de outros tecidos (HARVEY, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

### **2.3.1.3 Glutaciona peroxidase (GPx)**

Esta enzima possui um resíduo de selenocisteína, por isso a presença do selênio é indispensável para a atividade desta enzima (SEN, 1997). Junto com a catalase, constitui um dos principais mecanismos de defesa contra o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e outros hidroperóxidos (Figura 2). A GPx possui atuação preferencialmente quando ocorre pequena produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pois possui maior afinidade ao  $\text{H}_2\text{O}_2$ , enquanto que a catalase atua em altas concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A reação catalisada pela GPx utiliza como substrato a GSH, onde este tripeptídeo sofre oxidação, originando a glutaciona oxidada (GSSG), importante marcador de estresse oxidativo (EO) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

### **2.3.1.4 Glutaciona redutase (GR)**

A GR é a enzima responsável pela redução do GSSG para GSH, regenerando a GSH e mantendo-a em concentrações ideais (Figura 2). Além disso, necessita de dois co-fatores para esta reação: o NADPH, o qual é produto da via das pentoses, e a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), que é um derivado fosforilado da riboflavina (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

### 2.3.2 Antioxidantes não-enzimáticos

Os antioxidantes não-enzimáticos podem ser produzidos no organismo, por exemplo a glutathiona reduzida (GSH), a qual é o principal antioxidante não enzimático de todos organismos aeróbios. A GSH é o principal tiol celular de baixa massa molecular, principalmente devido à elevada concentração, a qual ocorre na ordem de milimolar, mais especificamente, aproximadamente 1 mM a 10 mM, tanto em eritrócitos e hepatócitos humanos, como nos demais tecidos de todos os organismos aeróbios (WILHELM FILHO et al., 2000; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; HUBER et al., 2008).

Conhecida como tiol não proteico, é um tripeptídeo constituído de ácido glutâmico, cisteína e glicina, sendo sintetizado nas hemácias pelas enzimas  $\gamma$ -glutamilcisteína-sintetase, e glutathiona sintetase com consumo de energia sob a forma de ATP (HUBER et al., 2008; SÁNCHEZ, 2012).

Em sua estrutura, possui o radical SH da cisteína, o qual é a porção ativa da molécula, atuando como aceptor de elétrons, mantendo assim, os grupos SH da célula na forma reduzida (WU et al., 2004; HUBER et al., 2008). Existem algumas enzimas que são responsáveis pela regeneração de GSH para célula, como as enzimas glicolíticas hexoquinase e G6PD, além da GGT, uma enzima de membrada (FROSALI et al., 2004; WU et al., 2004; ARESE et al., 2012).

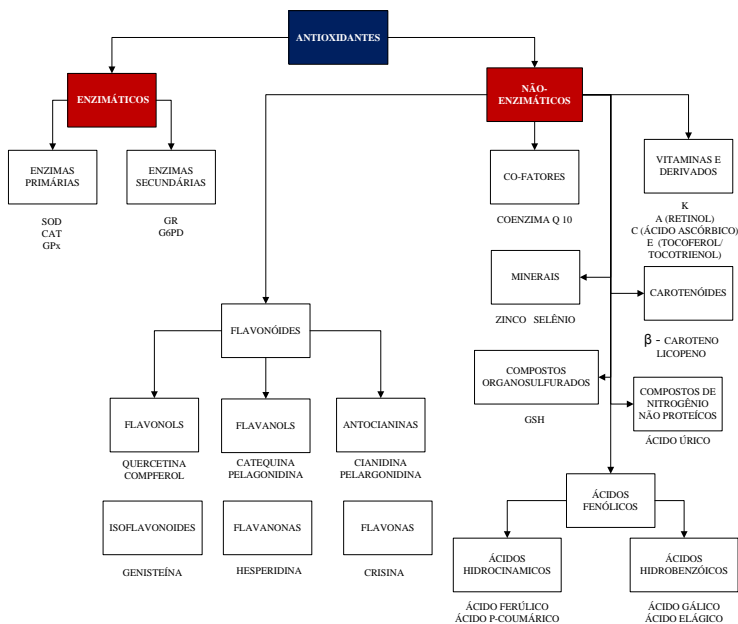
A importância da GSH não se deve apenas à sua grande ubiquidade e quantidade nas células, mas também devido à sua funcionalidade como antioxidante generalista de primeira linha de ação. Além disso, ela exerce um papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos, processos catalisados principalmente pela GST. Esta enzima catalisa o ataque nucleofílico da forma reduzida da glutathiona (GSH) a compostos que apresentam um carbono, um nitrogênio ou um átomo de enxofre eletrofílico (HUBER et al., 2008).

Outro importante antioxidante endógeno é o ácido úrico (AU), o qual em concentrações fisiológicas impede a formação de oxidantes formados pela reação da hemoglobina com peróxidos. O AU protege as membranas de eritrócitos da lipoperoxidação e também impede a lise por peroxidação. Esse antioxidante também tem se mostrado um potente capturador de  $^1\text{O}_2$  e  $\text{HO}^\bullet$  (KAND'ÁR; ZÁKOVÁ; MUZÁKOVÁ, 2006; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007)

Além desses antioxidantes produzidos biologicamente, o ser humano e vários outros organismos dispõem de antioxidantes

provenientes da dieta (Figura 3), como o  $\alpha$ -tocoferol, principal e mais abundante componente da vitamina E, vitamina C (também chamado de ácido ascórbico), carotenóides (destacando-se o  $\beta$ -caroteno e licopeno), além de compostos fenólicos (flavonóides, principalmente) (BARREIROS; DAVID, 2006).

**Figura 3-** Principais antioxidantes naturais enzimáticos e não-enzimáticos.



**Fonte:** Adaptado de COROCHO; FERREIRA, 2013.

### 2.3.2.1 Vitaminas E e C

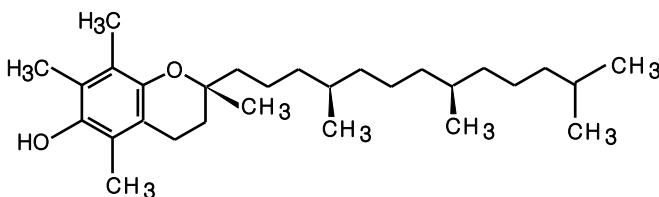
As vitaminas são micronutrientes orgânicos, sem valor energético, necessárias para o organismo humano em pequenas quantidades, e que devem, na maioria dos organismos, ser fornecidas pela dieta. Algumas podem formar-se em quantidades variáveis no organismo, como a niacina a partir do triptofano, e a vitamina D por exposição à luz solar, outras são sintetizadas em parte por bactérias intestinais, como a vitamina K. Porém, esta síntese não é suficiente para

cobrir as necessidades diárias de indivíduo, sendo por isso, dependente da dieta (LEHNINGER, NELSON; COX, 2008;).

A vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) foi descoberta há cerca de 100 anos, quando foi necessária para evitar a reabsorção fetal em ratas gestantes deficientes em vitamina E, que se alimentavam de gordura, as quais eram facilmente oxidáveis. Inicialmente foi denominado “inibitol”, pois foram observadas as mesmas propriedades físico-químicas dos inibitois isolados da alface, gérmen de trigo, semente de algodão e óleo de palma. Posteriormente, ocorreram descobertas de múltiplas formas de tocoferol, os quais mostraram ser eficientes antioxidantes (NIKI; TRABER, 2012).

Vitamina E é o termo dado a uma família de 8 antioxidantes sintetizados por plantas, quatro tocoferóis ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , e  $\delta$ ), e secundariamente por 4 trienóis ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , e  $\delta$ ), sendo o  $\alpha$ -tocoferol (Figura 4) o mais importante, devido ele ser mais encontrado no reino vegetal, e conseqüentemente através da dieta, no plasma humano e em vários tecidos. A vitamina E é eficiente inibidor da peroxidação de lipídios *in vivo*, através da doação de H para o radical peroxil, interrompendo a reação radicalar em cadeia. Cada tocoferol pode reagir com até dois radicais peroxil e, nesse caso, o tocoferol é irreversivelmente desativado. Para que não ocorra desativação, é necessário que ocorra regeneração de forma sinérgica com o ascorbato nas membranas celulares e com a ubiquinona na membrana mitocondrial (TRABER; STEVENS, 2011; BARREIROS; DAVI, 2006).

**Figura 4-** Estrutura química do  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E).



**Fonte:** do autor

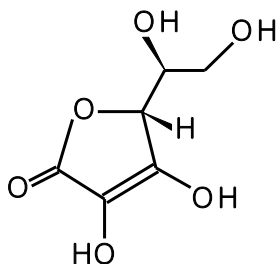
O ácido L-ascórbico, também conhecido como ácido ascórbico ou vitamina C (Figura 5), é um dos micronutrientes necessários para o ser humano e demais organismos. O ascorbato é sintetizado por plantas e por alguns vertebrados, porém não é produzido por primatas, devido ao fato deste grupo não possuir a enzima gulonolactona oxidase, a qual



catalisa a última reação na síntese enzimática de ascorbato (DU; CULEN; BUETTNER, 2012).

A principal consequência clínica da deficiência de ácido ascórbico é o escorbuto, porém a recomendação dietética atual de ácido ascórbico é de 60 mg/dia, a qual é baseada na prevenção do escorbuto com uma pequena margem adicional de proteção. Essa recomendação parte do princípio da base biológica que para seres humanos deve-se levar em consideração a absorção e a distribuição do ascorbato, que é regulado pela biodisponibilidade e absorção no trato gastrointestinal, concentração plasmática na circulação, distribuição no tecido, excreção e metabolismo (RUMSEY; LEVINE, 1998).

**Figura 5-** Estrutura química do ácido ascórbico (vitamina C)



**Fonte:** do autor

O ascorbato é oxidado de forma reversível, com a perda de um elétron, para formar o radical semidehidroascorbato (também chamado radical ascorbila), o qual é oxidado para ácido dehidroascórbico. O ácido dehidroascórbico pode ser reduzido a ácido ascórbico pelo mesmo radical intermediário, ou ainda por enzimas redutases (RUMSEY; LEVINE, 1998; DU; CULEN; BUETTNER, 2012).

O ascorbato é um excelente antioxidante adjuvante, e em termos químicos isso é um simples reflexo das suas propriedades redox, como relativamente fraco agente redutor (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Em termos fisiológicos, isso significa que ele fornece elétrons para enzimas, compostos químicos que são oxidantes ou outros receptores de elétrons. Além disso, outras propriedades do ascorbato o tornam um excelente doador de elétrons nos sistemas biológicos. Primeiro, o seu radical intermediário é relativamente pouco reativo, especialmente com o oxigênio e em segundo lugar, o produto da

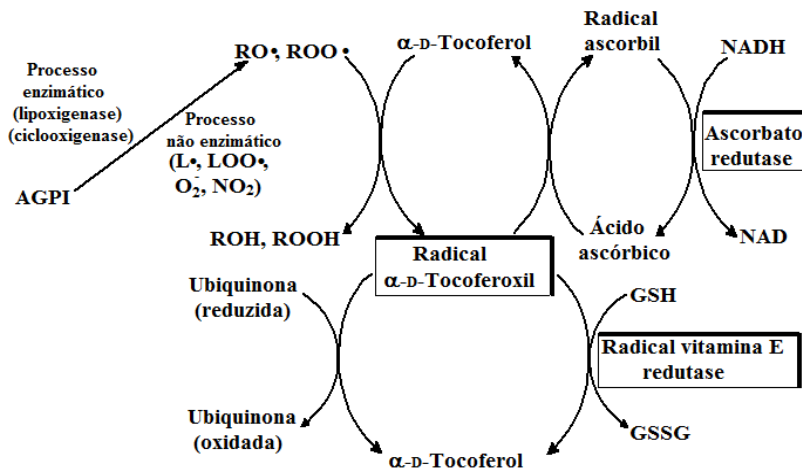
oxidação do ascorbato é reduzido pelas células a ascorbato, o que o torna novamente disponível para sua reutilização nas células (RUMSEY; LEVINE, 1998).

Tanto o ácido dehidroascórbico quanto o ascorbato são transportados através das membranas celulares, e este transporte ocorre através de uma variedade de mecanismos, como por exemplo, transportadores de vitamina C dependentes de sódio, SVCT1 e SVCT2, ou ainda, tem sido amplamente descrito que seu transporte pode ser via transportadores de glicose (GLUT), minoritariamente (CORTI; CASINI; POMPELLA, 2010).

Uma vez no meio intracelular, o ácido dehidroascórbico é reduzido a ácido ascórbico mediado por 2 vias: ação da GR ou por outras enzimas de redução (RUMSEY; LEVINE, 1998).

O intervalo plasmático de ascorbato em seres humanos saudáveis é de cerca de 40-80  $\mu\text{M}$ . Estes níveis plasmáticos o tornam um importante antioxidante endógeno, pois serve como co-antioxidante junto à vitamina E, conforme Figura 6 (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). O ácido ascórbico doa um elétron para radicais oxidantes potencialmente danosos como o radical hidroxil, alcóxil, peróxil, radical tiol, e radical tocoferoxil. Uma característica antioxidante importante do ácido ascórbico é a ação sinérgica com a vitamina E. A vitamina E é solúvel em lipídios, o qual é um antioxidante primário na oxidação de LDL e de membrana lipídica. Seu produto de oxidação de 1 elétron, o radical  $\alpha$ -tocoferoxil, pode ser reduzido pelo ascorbato, regenerando a vitamina E, conforme a Figura 6 (CSALLANY; DRAPPER; SHAH, 1962).

**Figura 6-** Estrutura esquemática do processo de regeneração da vitamina E pela ação sinérgica com a vitamina C.



(AGPI) Ácido graxo poliinsaturado; ( $ROO^\bullet$ ) Radical peroxil; ( $RO^\bullet$ ) Radical alcoxil; ( $L^\bullet$ ) Radical alcoxil lipídico; ( $LOO^\bullet$ ) Radical peroxil lipídico.

**Fonte:** Adaptado de CHAN et al., 1999

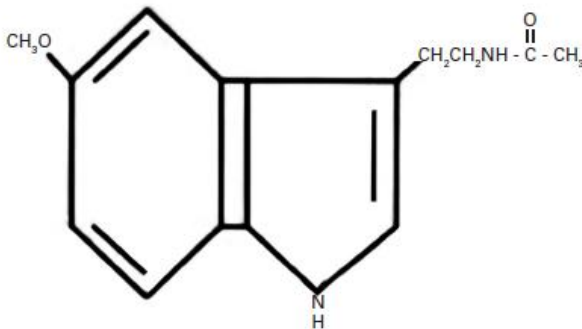
### 2.3.2.2 Melatonina

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) (MEL) é uma indolamina (Figura 7) que possui dois grupos funcionais, os quais além de serem decisivos para especificidade de ligação ao receptor, são responsáveis pela anfifilicidade, permitindo que a molécula entre em qualquer fluido ou compartimento celular, atravessando inclusive a barreira hematoencefálica (HARDELAND; PANDI-PERUMAL; CARDINALI, 2006; NETO; CASTRO, 2008). Ela atua através de receptores acoplados à proteína G expressa em várias áreas do sistema nervoso central e nos tecidos periféricos. Além disso, paralelamente pode conduzir a outros mecanismos de sinalização celular, incluindo várias cinases, fatores de transcrição e canais iônicos (HARDELAND et al., 2011)

Este neurohormônio é produzido e secretado principalmente na glândula pineal dos vertebrados, embora possa ser produzido em outros tecidos. Na glândula pineal, a MEL é sintetizada em três etapas:

primeiramente, a partir do aminoácido triptofano em serotonina (5-hidroxitriptamina), e em seguida por acetilação pela acetiltransferase arilalquilamina N (AA-NAT), antes de ser finalmente convertida em melatonina por ação da hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT), que representa o passo limitante da biossíntese (ESPINO; PARIENTE; RODRIGUEZ, 2012).

**Figura 7-** Estrutura química da melatonina.



**Fonte:** TERESA GALVÁN et al., 2008.

A secreção de melatonina pineal segue um padrão circadiano e é máxima durante a noite. Este padrão circadiano é regulado pelo relógio biológico de mamíferos dentro do núcleo supraquiasmático do hipotálamo. A MEL tem um papel fundamental em diversas funções fisiológicas incluindo a regulação dos ritmos circadianos, homeostase do sono, a modulação do comportamento, e envelhecimento (HARDELAND et al., 2011).

A MEL e muitos de seus metabólitos ou isômeros são potentes varredores de RL e reguladores de enzimas do ciclo redox. A diminuição da produção de MEL em indivíduos mais velhos, podem ser um dos principais fatores que contribuem para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas associadas com a idade (CORRALES et al., 2013).

A ação antioxidante da MEL ocorre em nível de todos os compartimentos celulares: membrana, citosol, mitocôndria e núcleo.

Devido sua lipofilicidade, mencionada anteriormente, atravessa membranas facilmente e as funções como antioxidante incluem: função neutralizante direta de RL, estimula a atividade de enzimas antioxidantes mediante a regulação da expressão de determinadas enzimas de oxi-redução, aumenta a eficiência da fosforilação oxidativa mitocondrial e diminui o escape de elétrons e aumenta a eficiência de outros antioxidantes. A eliminação de EROs pela MEL se dirige especificamente aos HO• e ROO•, porém possui ação também sobre outras EROS, como peróxidos e oxigênio singlete. A capacidade de eliminação de HO• está relacionada a sua estrutura química, a qual possui um grupamento metila na posição 5-OH do anel indol, enquanto que o grupamento N-acetil exerce uma ação sinérgica com a vitamina C e E (TERESA GALVÁN et al., 2008).

Estudo realizado por Corrales e colaboradores (2013) mostrou que a administração de MEL promoveu uma melhoria da aprendizagem espacial impedindo a degeneração colinérgica camundongos TsDn65, um modelo murinho de SD. Além disso, outro estudo realizado pelo mesmo grupo de pesquisa (CORRALES et al., 2014), mostrou que a administração de MEL em camundongos trissômicos (TS) adultos aumentou significativamente a densidade de células em proliferação, a densidade de neuroblastos em diferenciação, e a densidade de células granulares maduras, enquanto que diminuiu os níveis de peroxidação lipídica.

## **2.4 ESTRESSE OXIDATIVO E AS CONSEQUÊNCIAS BIOLÓGICAS**

É aparentemente contraditório que, apesar da produção das EROs ser parte normal do metabolismo interno da mitocôndria e essenciais à vida (daqueles que dependem de oxigênio), paralelamente, possuem efeitos deletérios sobre o corpo humano através de sua ação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; COROCHO; FERREIRA, 2013). Um excesso de EROs pode conduzir à oxidação exacerbada dos lipídios e proteínas, a qual está associada às alterações na sua estrutura e função.

Sendo assim, o estresse oxidativo (EO) é caracterizado pelo desequilíbrio entre as moléculas pró e antioxidantes, com predomínio daquelas pró-oxidantes, resultando na indução de danos celulares. Tais danos podem atingir todos os tipos de moléculas, incluindo DNA,

lipídeos, proteínas e carboidratos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

#### **2.4.1 Dano ao DNA e a proteínas**

As EROs e ERN, tais como  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $HO^{\bullet}$  e  $^{\bullet}NO$ , além de outros metabólitos biológicos desempenham um papel importante na carcinogênese. EROs produzem dano ao DNA pela modificação dos pares de bases (pB) nitrogenadas e ligação cruzada do DNA com proteínas. Numerosos estudos propõem a participação das EROs na mutação e carcinogênese. A indução da carcinogênese, o mais conhecido dos efeitos biológicos da radiação, ocorre principalmente devido a danos ao DNA pelo  $^{\bullet}OH$ . A reação dos radicais  $^{\bullet}OH$  ocorre principalmente por reação de adição de dupla ligação das bases de pirimidina e da captação do  $H^+$  a partir da porção glicosídica, resultando numa reação em cadeia de DNA. Estes efeitos provocam mutagênese de células e os lipídios peroxidados são também responsáveis pela ativação dos carcinógenos (LOBO et al., 2010). O mecanismo dessa ruptura tem como principais produtos 5'-8-ciclo-2'-desoxiadenosina (8OHdA) e 5'-8-ciclo-2'-desoxiguanosina (8OHdG) (BARREIROS; DAVI, 2006).

As proteínas podem ser modificadas por oxidação através de 3 maneiras: modificação oxidativa de um aminoácido específico, clivagem de um peptídeo mediado por RL e formação de uma ligação cruzada, devido à reação com os produtos da peroxidação lipídica. As proteínas que contêm aminoácidos como metionina, cisteína, arginina e histidina parecem ser os mais vulneráveis à oxidação (FREEMAN; CRAPO, 1982). A modificação oxidativa ocorrida nas proteínas aumenta a suscetibilidade à proteólise enzimática. Além disso, os produtos do dano oxidativo das proteínas podem afetar a atividade de enzimas, receptores e transporte de membrana.

Estes mesmos produtos podem conter grupos muito reativos, culminando com danificação da membrana e de outras funções celulares (LOBO et al., 2010). O radical  $RO_2^{\bullet}$  é considerado um RL que oxida proteínas.

As EROs podem também danificar as proteínas e formar grupamentos carbonil e outras modificações nos aminoácidos, incluindo a formação de sulfóxido de metionina e peróxido de proteína. A consequência da oxidação de proteínas é a alteração do mecanismo de

transdução de sinal, da atividade enzimática, da estabilidade ao calor e proteólise, o que favorece o envelhecimento (LOBO et al., 2010).

### 2.4.2 Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica gera uma complexa variedade de produtos, muitos dos quais são eletrófilos reativos. Alguns destes reagem com proteínas e DNA, resultando em efeitos tóxicos, conforme descrito anteriormente. As principais reações da peroxidação lipídica ocorrem da seguinte maneira: ácidos graxos poliinsaturados contêm um ou mais grupos metileno posicionados entre as ligações duplas do tipo *cis*. Os grupos metilenos são altamente reativos com agentes oxidantes, e os seus átomos de H são removidos para formar radicais centrados em carbono. Radicais com o carbono no centro reagem com o  $O_2^{\bullet-}$  para formar  $RO_2^{\bullet}$ . Assim, os produtos iniciais da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados são peróxilas polinsaturadas. O destino do  $RO_2^{\bullet}$  depende da posição do carbono na cadeia. Se o radical  $RO_2^{\bullet}$  possui pelo menos uma ligação dupla em sua extremidade, é reduzido a um hidroperóxido. Complexos metálicos e metaloproteínases, que são abundantes nas células reduzem os hidroperóxidos de ácidos graxos, utilizando um elétron do radical  $RO^{\bullet}$ , os quais geram múltiplas reações gerando uma série de produtos. Assim, mesmo o mais simples dos produtos de peroxidação dos lipídios produz, uma gama complexa de epóxidos, hidroperóxidos e compostos carbonil. Como consequência, ocorre a produção de produtos como isoprostanos e malondialdeído (MDA). O MDA tem sido utilizado há muitos anos como um bioindicador para a peroxidação lipídica (MARNETT, 1999; HIGDON et al., 2012).

Em membranas fosfolipídicas, as moléculas que reduzem os radicais peróxil a hidroperóxidos é outra molécula de ácido graxo, ou mesmo a vitamina E. A vitamina E reduz os radicais  $RO_2^{\bullet}$  quebrando a cadeia do radical, diminuindo assim, a peroxidação lipídica (MARNETT, 1999).

### 2.4.3 Radicais livres, Envelhecimento e Neurodegeneração

Pesquisas sugerem que o dano causado pelos EROs na célula conduz a alterações patológicas, as quais estão associadas ao envelhecimento. Além de uma série de doenças, o envelhecimento propriamente dito, mostra relação direta ou indireta com as EROs. O principal mecanismo do envelhecimento é atribuído ao dano no DNA e

acúmulo de danos celulares e funcionais na célula (SASTRE et al., 1996; CANTUTI-CASTEL et al., 2000).

Alguns antioxidantes naturais são capazes de retardar este processo de envelhecimento, sendo assim, parece que o aumento do EO geralmente ocorre durante o processo de envelhecimento, e o *status* antioxidante pode influenciar significativamente os efeitos do dano oxidativo associado com a idade avançada. Sugere-se que as EROs possuem influência significativa sobre o envelhecimento, e assim, os danos causados por essas espécies podem ser controladas com uma defesa adequada, e uma ingestão ótima de nutrientes antioxidantes pode contribuir para a melhoria da qualidade de vida (LOBO et al., 2010).

Existem evidências significativas de que a patogênese de diversas doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Parkinson (DP), a DA, ataxia de Friedreich, esclerose múltipla e esclerose lateral amiotrófica, estão associadas à produção exacerbada de EROs e/ou ERN devido à disfunção mitocondrial. O genoma mitocondrial pode desempenhar um papel essencial na patogênese destas doenças, e as evidências para a mitocôndria ser um local da lesão, em distúrbios neurodegenerativos, é baseado em parte, em diminuições observadas nas atividades complexas da cadeia respiratória na DP, DA e doença de Huntington. Tais defeitos, associados ao desequilíbrio do balanço oxidante/antioxidante, possivelmente são base de defeitos no metabolismo de energia e que podem induzir a degeneração celular através de morte celular por apoptose (CALABRASE et al., 2005; FEDERICO et al., 2012).

#### **2.4.4 $\gamma$ -Glutamyltransferase e Estresse Oxidativo**

A  $\gamma$ -glutamyltransferase (GGT) é uma enzima microsomal responsável por transferir os grupos glutamyl, a partir dos peptídeos gama-glutamyl para outros peptídeos ou aminoácidos. A GGT é um marcador de função hepática não-específica (SIMÃO et al., 2008).

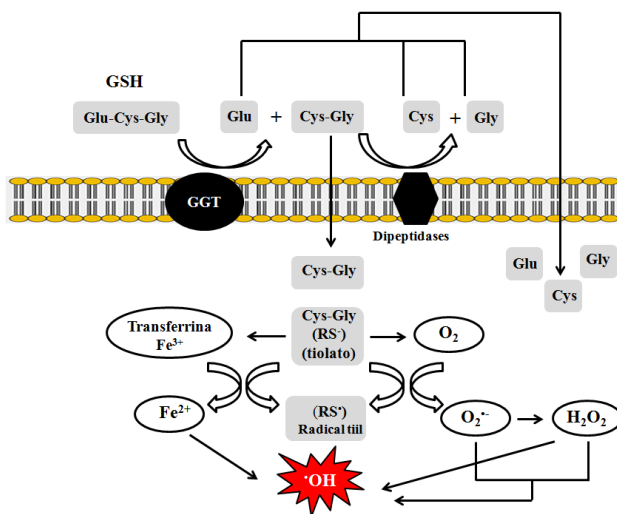
A GGT é a única enzima plasmática e de membrana a qual é capaz de iniciar a desagregação extracelular de GSH através da remoção da porção  $\gamma$ -glutamyl. Os aminoácidos que constituem a GSH e conjugados resultantes são então transferidos para o interior da célula e utilizados para a síntese de GSH. Quanto em concentrações elevadas de transferrina e na presença de agentes redutores específicos, como ânion tiolato, ocorre redução e liberação do íon  $Fe^{2+}$ , podendo produzir  $\bullet OH$



(Figura 8). Devido sua capacidade de proteger da depleção de GSH, a GGT desempenha um importante papel no sistema antioxidante. De forma controversa, pouco se conhece sobre a GGT na atividade mutagênica.

Estudos demonstram o envolvimento da GGT em processos mutagênicos (DROZDZ et al., 1998). Stark e colaboradores (1993) mostraram que a atividade da GGT na presença de transferrina e GSH pode ser relacionada diretamente com a peroxidação lipídica, o que é relevante para processos carcinogênicos hepáticos.

**Figura 8-** Proposta de mecanismo de geração de EROs mediada por GGT.



**Fonte:** Adaptado de DROZDZ et al., 1998; CAVALLI, 2012

A transferrina é uma das principais proteínas de ligação do ferro livre (proteína de transporte) na circulação. Além da função de transporte, atua prevenindo a formação exacerbada de RL. Acredita-se que, uma vez complexado com a transferrina, o ferro sérico é inativo, ou seja, incapaz de gerar EROs. Redutores diversos, incluindo ácido ascórbico e tióis, podem facilitar a redução da transferrina ligada ao ferro sérico e liberar o íon ferroso, o qual pode catalisar a geração de EROs, via Reação de Fenton (DROZDZ et al., 1998).

Além disso, existe uma correlação positiva entre a atividade aumentada da GGT e incidência de tumores, sendo esta explicada pela ligação entre a GGT e o estado redox da célula. Evidências de estudos observacionais mostram que a associação entre GGT e câncer é limitada, porém dois grandes estudos prospectivos mostraram risco elevado de câncer para todas as categorias que apresentavam atividade de GGT elevada, quando comparados aos valores normais. Este aumento foi encontrado para neoplasias malignas do aparelho digestivo, respiratório, mama, além de linfoma e câncer hematopoiético. Apesar destes estudos indicarem que a GGT pode estar envolvida na biologia do tumor, os mecanismos subjacentes permanecem desconhecidos e merecem maior aprofundamento (VAN HEMELRIJCK et al., 2011).

## **2.5 INFLAMAÇÃO E ESPÉCIES REATIVAS**

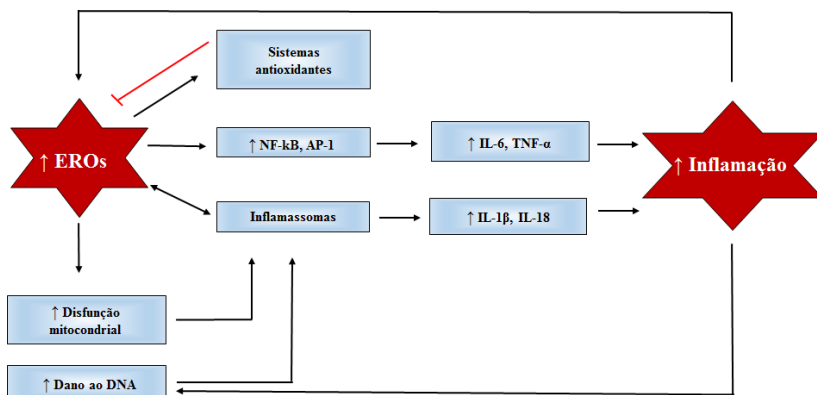
A inflamação é um processo de resposta de um organismo lesado ao agente agressor, no intuito de eliminar o mesmo e restaurar a homeostase tecidual, ou seja, seu estado original. Esse processo de defesa é caracterizado pelo recrutamento do sistema imune afim de que o agressor seja identificado pelo organismo e os processos de defesa sejam ativados e desenvolvidos (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2008; RUBIN et al., 2006). Este processo de ativação de células imunocompetentes, leva a fenômenos inflamatórios locais e/ou sistêmicos podendo levar ao EO.

No processo inflamatório muitos mediadores inflamatórios (citocinas), como por exemplo, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Figura 9), são liberados com o objetivo de eliminar microorganismos e até mesmo restos celulares. Neste contexto, os neutrófilos e as células da linhagem monocitária (linfócitos, monócitos e macrófagos) exercem papel central (SOEHNLEIN; LINDBOM, 2010). Sendo as primeiras células a serem recrutadas, os neutrófilos migram para o local do processo inflamatório e/ou infeccioso, e junto com os macrófagos, são capazes de eliminar o agente agressor.

Dentro dos neutrófilos, existem grânulos azurófilos e acidófilos, chamados de grânulos primários e secundários, respectivamente. Nos grânulos primários, existem enzimas, dentre elas, a mieloperoxidase (MPO), a qual está associada ao processo fagocitário, principalmente de neutrófilos, e minoritariamente de monócitos e macrófagos. Portanto, durante o processo inflamatório, na fase fagocitária, ocorre a liberação

de substâncias microbicidas (PAPAYANNOPOULOS; ZYCHLINSKY, 2009). Nessa etapa, ocorre ativação da enzima NADPH oxidase que, em conjunto com o influxo de íons ativam a atividade da MPO. Essa enzima ativada favorece a produção de HOCl com atividade microbicida, o qual é produzido a partir de  $H_2O_2$  e íons cloreto, podendo causar dano oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

**Figura 9-** Relação entre o Estresse Oxidativo e Processo inflamatório.



**Fonte:** Adaptado de VITALE; SALVIOLI; FRANCESCHI, 2013.

## 2.6 DESEQUILÍBRIO OXIDATIVO NA SÍNDROME DE DOWN E TERAPIA ANTIOXIDANTE

Vários antioxidantes naturais têm sido investigados *in vitro* e em modelos animais para avaliar o potencial terapêutico (ALFADDA; SALLAM, 2012). Além disso, muitos sugerem a importância dos antioxidantes na prevenção de várias doenças. A partir de então, a terapia antioxidante tornou-se alvo de interesse em várias pesquisas, envolvendo tanto antioxidantes naturais (com ou sem modificações estruturais) ou moléculas unicamente sintetizadas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Estudos epidemiológicos prospectivos demonstraram que uma maior ingestão de antioxidantes na dieta está associada com menor risco de doenças coronarianas, alguns tipos de câncer e de doenças neurodegenerativas (FIRUZI et al., 2011). Numerosos estudos têm sido realizados com vários agentes antioxidantes, sendo que o  $\alpha$ -tocoferol,

ácido ascórbico e MEL ocupam destaque dentro deste arsenal de agentes antioxidantes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; FIRUZI et al., 2011).

Na SD há um aumento em 50% na atividade da enzima Cu/Zn SOD em diferentes tipos de células (eritrócitos, leucócitos, plaquetas e fibroblastos). Este aumento na expressão da SOD deve-se ao fato do gene que a codifica estar localizado na região 21q22 do cromossomo 21 (AGUILAR-da-SILVA; MORAES; MORAES, 2003; GARCEZ; PERES; SALVADOR, 2005; MARQUES; MARREIRO, 2006; MUCHOVÁ; ŽITŇANOVÁ; ĎURAČKOVÁ, 2014).

Muitos estudos têm demonstrado um aumento na atividade da GPx em vários tecidos de pessoas com SD. Entretanto, este aumento parece ser uma resposta fisiológica e de proteção para eliminar o excesso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido pela hiperatividade da SOD. Porém, o aumento de 50% na atividade da SOD é maior do que o percentual de aumento usualmente descrito na atividade da GPx (ANI; GRANTHAM-McGREGOR; MULLER, 2000), sendo que provavelmente este percentual também se mantém inalterado no caso da atividade da CAT. Assim sendo, o desequilíbrio entre a razão SOD:GPx, proporciona um quadro de agressão endógena constante (ANI; GRANTHAM-McGREGOR; MULLER, 2000), pois o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não eliminado tende a reagir com metais de transição formando o HO•, culminando no dano celular crônico (AGUILAR-da-SILVA; MORAES; MORAES, 2003).

Existem evidências sobre o aumento do EO, com o aumento do dano ao DNA e peroxidação lipídica em pessoas com SD (ANI; GRANTHAM-McGREGOR; MULLER, 2000). Algumas características como envelhecimento precoce, dano cerebral e modificações bioquímicas encontradas na SD que são secundárias ao dano oxidativo dentro da célula, poderiam ser consequência do desequilíbrio genético-bioquímico (ANI; GRANTHAM-McGREGOR; MULLER, 2000). Além disso, recente estudo realizado em nosso laboratório (GARLET et al., 2013) mostrou um quadro de EO sistêmico em crianças e adolescentes com SD, evidenciando aumento da atividade enzimática de SOD, CAT e GR desses indivíduos, quando comparados a indivíduos sem SD.

Dificuldades na alimentação e ingestão inadequada de nutrientes são comuns em crianças com SD, assim como hábitos e

práticas alimentares impróprios (PIPES; HOLM, 1980). Segundo Giaretta (2007), os maiores problemas alimentares encontrados nessas crianças são: ingestão inapropriada, excessiva ou diminuída de energia e nutrientes, hábitos alimentares pobres e habilidades alimentares atrasadas.

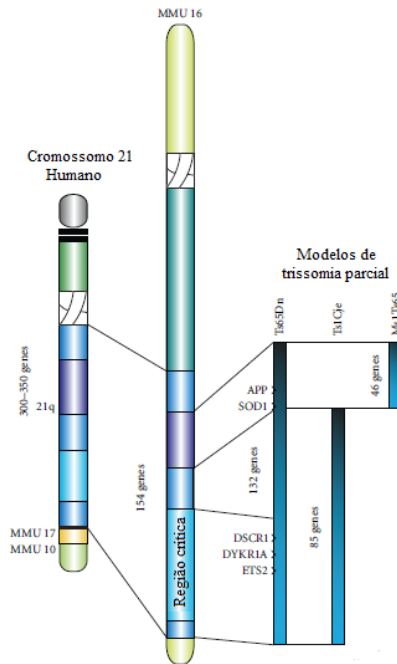
Lockrow e colaboradores (2009) avaliaram o EO após suplementação de vitamina E em cérebros de ratos Ts65Dn (modelo animal de SD), e verificaram que a suplementação diminuiu os marcadores de EO nos cérebros bem como melhorou a performance da memória espacial e atenuou a patologia neuro-colinérgica. Concluíram que a vitamina E atrasa o início das anormalidades cognitivas e morfológicas em modelos animais de SD, e que isso pode representar um seguro e efetivo tratamento precoce na progressão da neuropatologia da SD.

## **2.7 MODELO ANIMAL DE SD: O CAMUNDONGO Ts65Dn**

### **2.7.1 Alterações Cognitivas**

Com base na homologia do cromossoma 16 murino (MMU16) com o cromossoma 21 humano (HSA21), foram gerados distintos modelos animais de SD (LANA-EOLA et al., 2011). Um dos modelos é o Ts65Dn (TS), que é um camundongo que possui triplicado o segmento de MMU16 o qual se estende entre os genes *Mrp139* e *Znf295* e contém aproximadamente 92 genes ortólogos a genes de HSA21 (Figura 10) (STURGEON; GARDINER, 2011). Esse camundongo apresenta numerosas alterações fenotípicas similares àquelas encontradas em pessoas com SD. Em nível comportamental o camundongo TS apresenta alterações motoras e hiperatividade, atraso no desenvolvimento e alterações em distintos processos cognitivos como a atenção, o aprendizado em processos de condicionamento operante (RUEDA; FLÓREZ; MARTÍNEZ-CUÉ, 2012).

**Figura 10-** Representação esquemática dos segmentos de genes envolvidos em diferentes modelos animais de SD comparativamente ao HSA21 humano.



**Fonte:** Adaptado de ANTONARAKIS et al., 2004 e LOCKROW; FORTRESS; GRANHOLM, 2012.

### 2.7.2 Alterações Neuromorfológicas

É sugerido que os déficits cognitivos encontrados na SD e em camundongos TS são devido a distintas alterações neuromorfológicas. Assim como em condições humanas, o camundongo TS apresenta redução no tamanho e densidade neuronal de diferentes áreas cerebrais (BARTESAGHI; GUIDI; CIANI, 2011; RUEDA; FLÓREZ; MARTÍNEZ-CUÉ, 2012), dentre elas, destaca-se o hipocampo por seu papel na aprendizagem e memória.

Esta hipocelularidade na SD e em camundongos TS é devido a uma diminuição da neurogênese nas etapas pré e pós-natal (RUEDA et al., 2012). Existem numerosos trabalhos que demonstraram que a neurogênese adulta está implicada no aprendizado e memória

dependente do hipocampo (MALBERG et al., 2000; SHORS et al., 2001, 2002; SQUIRE; STARK; CLARK, 2004; IMAYOSHI et al., 2008), pois esta redução da neurogênese hipocampal parece ser um dos principais mecanismos implicados nos déficits cognitivos encontrados neste modelo de SD.

### **2.7.3 Neurodegeneração**

Embora alterações da proliferação neuronal, que ocorrem desde estágios pré-natais, sejam responsáveis pelas alterações cognitivas da SD e dos camundongos TS, existem vários mecanismos neurodegenerativos que danificam ainda mais a morfologia e função do cérebro ao longo da vida. Na SD numerosas estruturas atrofiam (KESSLAK et al., 1994; KRASUSKI et al., 2002). Esta perda de neurônios é devido a processos de neuroinflamação, EO e desenvolvimento de neuropatologia do tipo Alzheimer (GRIFFIN et al., 1989; WENK et al., 2000). De fato, a administração de vitamina E em camundongos TS (LOCKROW et al., 2009; SHICHIRI et al., 2011) diminuiu o EO, melhorou a performance cognitiva e diminuiu a perda dos neurônios colinérgicos do pro-encéfalo basal, o que demonstra o papel do EO nestes processos patológicos.

### **2.7.4 Marcadores de Neurogênese**

Existem vários métodos utilizados para avaliação da neurogênese. O método mais utilizado, é bromo-deoxiuridina (BrdU), o qual é um análogo da timina, que se incorpora ao DNA celular em mitose, e assim, após sua incorporação ao DNA, pode-se utilizar anticorpos específicos para BrdU (KANDRATAVICIUS et al., 2007). Porém, o método do BrdU possui limitações como: possibilidade de produzir mutações celulares em tecidos em desenvolvimento. Outra estratégia é a detecção de proteínas neurais utilizando anticorpos específicos, como doublecortina (associada a microtúbulos) e Ki-67, uma proteína nuclear, expressa em células em divisão durante todo o processo de mitose. Ao contrário do BrdU, Ki-67 é um marcador endógeno e portanto não possui qualquer efeito adverso a células vivas (KEE et al., 2002).





### **3. CAPÍTULO 1: MONITORAMENTO DOS NÍVEIS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM SÍNDROME DE DOWN ANTES E APÓS INTERVENÇÃO ANTIOXIDANTE.**

#### **3.1 OBJETIVOS**

##### **3.1.1 Objetivo Geral**

Monitorar o “*status*” antioxidante e o estresse oxidativo no sangue de crianças e adolescentes com SD, antes e após intervenção antioxidante, bem como após igual período (6 meses) de sua interrupção.

##### **3.1.2 Objetivos Específicos**

- ✓ Verificar as diferenças nos valores intraeritrocitários das defesas antioxidantes enzimáticas (CAT, SOD, GPx, GR, GST, e G6PD) presentes no sangue de crianças e adolescentes portadores de SD, antes e após a administração de vitaminas E e C por 6 meses, bem como após igual período de sua interrupção;
- ✓ Verificar as diferenças das defesas antioxidantes não enzimáticas (GSH, ácido úrico e vitamina E), presentes respectivamente, no extrato ácido sanguíneo, soro e plasma desses indivíduos com SD, nos intervalos acima descritos;
- ✓ Analisar os indicadores de dano oxidativo às proteínas (proteína carbonilada - PC), lipídios (substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico - TBARS), no plasma de indivíduos com SD, nos intervalos descritos acima;
- ✓ Avaliar como indicadores de inflamação/antioxidante, atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) bem como o conteúdo de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no soro destes indivíduos, nos intervalos acima descritos;
- ✓ Avaliar a interação do processo antioxidante/pró-oxidante entre GGT e transferrina, pela determinação da atividade sérica da

GGT bem como da concentração de transferrina sérica nesses indivíduos, nos intervalos acima descritos.

## 3.2 SUJEITOS E MÉTODOS

### 3.2.1 Delineamento Experimental

#### 3.2.1.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo prospectivo de “*status*” antioxidante e estresse oxidativo de uma amostra constituída de crianças e adolescentes portadores de SD. Os participantes deste estudo foram recrutados em duas instituições que atende famílias com pessoas com SD, localizadas na grande Florianópolis: Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE) e Associação Amigos Down, os quais também participaram do estudo preliminar de caracterização de marcadores de EO, realizado por Garlet e colaboradores (2013).

#### 3.2.1.2 Sujeitos e considerações éticas

Os indivíduos incluídos neste estudo foram submetidos à terapia antioxidante com as vitaminas C e E. A amostra do presente estudo foi calculada como sendo suficiente para detectar moderadas correlações, baseada em um nível de significância de 0,05. Foram incluídos no estudo crianças e adolescentes com SD (n=21), devidamente autorizados pelos responsáveis legais através de termo livre e esclarecido (Anexo A).

Os participantes da pesquisa receberam 500 mg de vitamina C e 400 mg de vitamina E por dia (NATHENS et al., 2002), durante o período de 6 meses (MACÇÃO et al., 2007), com interrupção de 6 meses e seguida de nova suplementação de 6 meses (BUDNI, 2011). A dose de vitamina E foi inferior (abaixo da metade) recomendada para adultos (até 1000 mg/dia), a qual é baseada no limite superior tolerável de ingestão (UL), que é segura e não apresenta qualquer efeito adverso (KAPPUS; DIPLOCK, 1992). As vitaminas C (Energil C®) e E (E-TBABS®) foram cedidas pela EMS Medicamentos®/SP. As atividades foram iniciadas logo após o parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – CEPESH, sob o número de protocolo n° 2112/2011 (Anexo B).

O protocolo experimental atendeu ao que determina a Resolução n° 196/1996, do Conselho Nacional de Saúde, sobre pesquisas clínicas bem como princípios éticos, científicos e técnicos consoantes com os padrões de aceitação internacional para ensaios

clínicos (normas de *Good Clinical Practice*). Cada responsável pelo participante preencheu e assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

### **3.2.1.3 Critérios de inclusão**

Os indivíduos deste estudo foram admitidos como sendo portadores de SD, considerando as características físicas evidentes e confirmação de diagnóstico pelos pais/responsáveis, bem como da instituição que os acompanha.

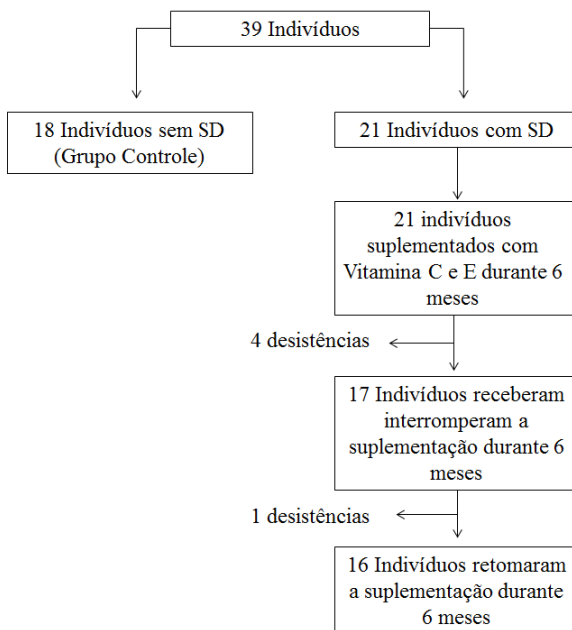
Foram incluídos no estudo crianças e adolescentes portadores de SD, com diagnóstico clínico e cariotipagem para SD (trissomia total ou parcial do 21, mosaicismo ou translocação), na faixa etária de 3 a 14 anos de idade, que frequentavam, no momento da triagem dos participantes, ao menos uma das instituições que aderiram ao estudo. A inclusão no projeto foi de espontânea responsabilidade dos pais ou responsáveis legais pelos menores, após estes receberem informações detalhadas sobre o projeto. Após concordância, recebiam as instruções necessárias e assinavam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO A).

### **3.2.1.4 Critérios de exclusão**

Foram estabelecidos como critérios de exclusão a presença de outras afecções patológicas sistêmicas associadas, tais como obesidade (através de verificação do índice de massa corporal – IMC), infecções ou neoplasias, distúrbios auto-imunes, dados clínicos ou biológicos sugestivos de doença renal crônica. Também foram excluídos pacientes que estavam participando de outros estudos, utilização prévia de suplementos que possuíam composições vitamínicas ou utilização de qualquer medicação que pudesse interferir nos resultados do presente estudo. Além disso, excluiu-se também aqueles com características que eram impossibilitados de fornecer dados relevantes ao estudo.

### **3.2.1.5 Grupos**

O estudo com crianças e adolescentes com SD (Grupo Down) foi constituído de 21 indivíduos com idade entre 3-14 anos. O grupo controle foi constituído de amostras de 18 crianças em perfeito estado de saúde (marcadores inflamatórios dentro da faixa de normalidade), da mesma faixa etária, obtidas no Hospital Infantil Joana de Gusmão, de Florianópolis/SC, conforme o fluxograma da Figura 11.

**Figura 11-** Fluxograma da amostra.

**Fonte:** do autor.

### 3.2.1.6 Coleta de amostras e processamento

Amostras de sangue (6 mL) foram coletadas em 2 tubos (um com e outro sem anticoagulante) antes e após o início da suplementação. Imediatamente após a coleta da amostra sanguínea de cada indivíduo, procedeu-se a separação do material da seguinte forma: do tubo com anticoagulante EDTA, uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  de sangue total foi precipitada em 800  $\mu\text{L}$  ácido tricloroacético 12% (1:5, v:v), amostra esta denominada extrato ácido, que foi utilizada para a determinação do conteúdo de GSH e estocadas imediatamente em nitrogênio líquido ( $\cong 170^\circ\text{C}$ ), até a realização da análises. Além disso, 200  $\mu\text{L}$  de sangue total foi reservado para o ensaio da G6PD. A separação dos eritrócitos e plasma que foram utilizados para os ensaios dos marcadores de estresse oxidativo/defesas antioxidantes, foi realizada por centrifugação (5000 g durante 3 min) do sangue total, para obtenção da fração plasmática (para determinação de vitamina E, TBARS, PC) e eritrócitos. Nos tubos sem anticoagulante, depois de 30 min de coagulação, os tubos foram

centrifugados e o conteúdo sérico foi separado para a determinação da atividade da GGT e MPO bem como do conteúdo de ácido úrico, transferrina, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

Após a retirada do material coletado (plasma), os eritrócitos foram lavados duas vezes com solução salina e depois centrifugadas (5000 g durante 3 min), para posteriormente, sofrerem lise em água destilada (diluição 1:5, v:v) e por dois sucessivos congelamentos e descongelamentos. Uma última centrifugação (5000 g, durante 5 min) forneceu o sobrenadante (hemolisado) para análise dos diferentes parâmetros.

Para a determinação da atividade das demais enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPx, GR), utilizou-se o sobrenadante do hemolisado (diluição 1:5, v:v), e para atividade da GST utilizou-se (1:10, v:v), após centrifugação a 5000 g por 5 min. A análise de todas as enzimas antioxidantes foram mensuradas em duplicata.

No final do processamento, as amostras foram fracionadas em sangue total, extrato ácido, plasma, hemolisado e soro (após centrifugação do segundo tubo de coleta sem anticoagulante), e armazenadas em nitrogênio líquido até a análise correspondente.

### **3.2.2 Determinação das Defesas Antioxidantes Não Enzimáticas**

#### **3.2.2.1 Glutaciona reduzida (tióis não-proteicos)**

O conteúdo de glutaciona reduzida (GSH) foi avaliado no sangue total pela determinação dos tióis não-proteicos, pois a GSH representa  $\cong 95\%$  do total destes tióis. Primeiramente, para realização do ensaio, foi feito extrato ácido, adicionando 0,2 mL de sangue total em 0,8 mL de ácido tricloroacético a 12% (TCA 12%). Após homogeneização, foi realizada centrifugação (5000 g, por 5 min) e o sobrenadante então foi utilizado para o ensaio. Adicionou-se 0,2 mL de ácido 2-nitrobenzóico (DTNB) 2,5 mM nas cubetas contendo 1,9 mL de tampão fosfato 0,2 M pH 8,0 e 0,1 mL da amostra, permitindo, após cerca de 3 min e agitação intermitente da cubeta, a obtenção máxima de formação do ânion tiolato (TNB) de cor amarela, mensurável em 412 nm. Os valores medidos em duplicata foram expressos em  $\mu\text{mol.mL}^{-1}$  (BEUTLER et al., 1963).

### 3.2.2.2 Ácido úrico

O conteúdo de ácido úrico (AU) sérico foi determinado através de *kit* comercial da Analisa®, onde o AU é oxidado pela uricase em alantoína, CO<sub>2</sub> (gás carbônico) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Através de uma reação oxidativa, catalisada pela peroxidase, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado reage com o diclorohidroxibenzeno sulfonato (DHBS) e 4-aminoantipirina (4-AMP), produzindo uma antipirilquinonimina, de cor vermelha. A absorvância do complexo formado, medida em 520 nm, é diretamente proporcional à concentração de AU da amostra. De acordo com as instruções do *kit*, foram adicionados 20 µL da amostra e padrão nos seus respectivos tubos contendo 1 mL de reagente de trabalho, constituído de tampão e uricase (4:1). Em seguida, os tubos foram homogeneizados e incubados por 10 min, a 37°C. Na sequência foi realizada leitura das absorvâncias em 520 nm, acertando o zero com o branco (1 mL do reagente de trabalho). A análise de todas as amostras foram feitas em duplicata e os resultados foram expressos em mg.dL<sup>-1</sup>.

### 3.2.2.3 Vitamina E

A quantificação das concentrações plasmáticas de vitamina E foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC/CLAE), com detecção UV, em 292 nm, pelo método descrito por Nicoletti e colaboradores (2001). Primeiramente, adicionou-se 100 µL de plasma em 100 µL de etanol e agitou-se em vórtex por 10s. Em seguida, foi adicionado 100 µL de hexano, agitado em vortex por 45 s, centrifugado a 8000 g durante 5 min. O sobrenadante (75 µL) foi transferido para um tubo e o hexano foi evaporado em nitrogênio. Posteriormente, adicionou-se 25 µL de dietileter e 75 µL de metanol, com injeção de 20 µL desse extrato no sistema cromatográfico. As colunas foram eluídas isocriticamente com metanol e o fluxo foi de 1 mL.min<sup>-1</sup>. A concentração plasmática de  $\alpha$ -tocoferol foi determinada a partir de uma curva-padrão e os valores foram expressos em µmol.mL<sup>-1</sup>.

### **3.2.3 Determinação da Atividade das Enzimas Antioxidantes (Defesas Enzimáticas)**

#### **3.2.3.1 Superóxido dismutase (SOD)**

A atividade da SOD foi medida espectrofotometricamente em 480 nm, de acordo com o método de Misra e Fridovich (1972), modificado por Boveris et al., (1983), mediante a oxidação da adrenalina (mudança de pH 2,0 para pH 10,0), que forma o ânion superóxido e um cromóforo róseo, o adrenocromo, onde a enzima presente na amostra retarda sua formação. Os valores da SOD ( $\text{USOD.mL}^{-1}$ ) foram expressos em termos de atividade da enzima, onde uma unidade arbitrária de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para diminuir à metade a velocidade de formação do adrenocromo (MISRA; FRIDOVICH, 1972). As amostras foram previamente lavadas com solução de clorofórmio:etanol (3:5, v:v), com o intuito de eliminar a interferência da hemoglobina e impedir a geração do ânion superóxido artefactual no ensaio (MISRA; FRIDOVICH, 1972). Em uma cubeta contendo 1,95 mL de glicina 50 mM, pH 10,2, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de adrenalina 60 mM (pH 2,0 aproximadamente, gelo e frasco âmbar). A velocidade inicial de formação do adrenocromo foi monitorada durante cerca de 100s do início da reação, com acréscimo de absorvância a cada intervalo de 15s em torno de 0,013-0,015 unidades, para então adicionar a alíquota da amostra, geralmente em torno de 20 a 100  $\mu\text{L}$ , dependendo da concentração e atividade da enzima presente nesta alíquota, totalizando um tempo de aproximadamente 3 minutos. Curvas de 3 ou 4 pontos permitiram avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD. Os valores foram expressos em  $\text{USOD.mL}^{-1}$ .

#### **3.2.3.2 Catalase (CAT)**

A atividade da enzima catalase foi determinada segundo o método descrito por Aebi (1984), que quantifica a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio, em 240 nm durante 20 s, pela enzima presente na amostra. Utiliza-se a solução de peróxido de hidrogênio 10 mM em tampão fosfato 50 mM pH 7,0 preparada e titulada no dia da análise. Para isso, adicionou-se 2 mL desta solução na cubeta, com acréscimo de 20  $\mu\text{L}$  da amostra, em seguida realizou-se leitura da queda da absorvância. Os valores foram expressos em  $\text{mmol.min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ .



### 3.2.3.3 Glutaciona peroxidase (GPx)

A determinação da atividade da glutaciona peroxidase foi realizada de acordo com o método de Flohé e Gunzler (1984), no qual a reação é baseada na redução do terc-butilhidroperóxido (t-BuOOH) pela oxidação de GSH e formação de GSSG, catalisada pela GPx. Assim, a medida consiste na oxidação (verificada pela queda da absorbância) do NAPH medido em 340 nm, uma vez que o NADPH é utilizado na regeneração de GSH pela enzima GR. Portanto, a velocidade de oxidação do NAPH é proporcional à velocidade de produção de GSSG a partir de GSH, catalisada pela GPx presente na amostra a analisada. O procedimento técnico foi realizado pelo preparo de um meio de reação contendo 25 mL de tampão fosfato (0,1 M pH 7,0), 8,6 mg de NADPH, 10 mL de ácido dietilenotriaminopentacético (DPTA, 5 mM pH 7,0), 15 mL de água destilada, 24 mg de GSH, 3,8 µL de GR 5U e 100 µL de KCN 50 mM, sob refrigeração, no momento do ensaio. A adição do KCN tem como objetivo evitar interferência (superavaliação da enzima), devido à oxidação da hemoglobina presente nos lisados, convertendo assim hemoglobina em meta-hemoglobina, a qual não é detectada na leitura. Posteriormente, em temperatura ambiente, foram adicionados 10 µL de amostra e 10 µL de t-BuOOH em 1 mL de um meio de reação na cubeta. Os valores foram expressos em  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

### 3.2.3.4 Glutaciona redutase (GR)

A mensuração da atividade da GR foi determinada pelo método de Calberg e Mannervick (1985), o qual verifica em 340 nm, a taxa de oxidação do NADPH devido à formação de GSH, a partir da GSSG, pela ação desta enzima presente na amostra. O procedimento foi realizado primeiramente com a preparação de um meio de reação contendo tampão fosfato 0,1 M pH 7,0; 8,6 mg de NADPH; 30,6 mg de glutaciona oxidada e DPTA 5 mM (preparo realizado em gelo). Em seguida, sob temperatura ambiente, foi adicionado diretamente na cubeta 0,95 mL de meio de reação, e a adição de 50 µL de amostra (lisado) deu início à reação, que foi monitorada durante 3 min, gerando uma curva decrescente. Os valores da atividade desta enzima foram também expressos em  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

### 3.2.3.5 Glutaciona S-transferase (GST)

A atividade da GST foi determinada espectrofotometricamente de acordo com Habig e colaboradores (1976). A reação baseia-se na

capacidade da GST em conjugar GSH no substrato, formando uma substância mensurável em 340 nm, monitorada durante 3 minutos. A amostra (lisado) foi adicionada diretamente na cubeta contendo 1 mL de um meio formado de 10  $\mu\text{L}$  de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 0,1 M (CDNB) (substrato), 10  $\mu\text{L}$  de GSH 0,1 M e 970  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 (preparado previamente sob refrigeração), além da cubeta de referência, na qual foram adicionados os mesmos reagentes, com exceção da amostra. Os valores foram expressos em  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Neste ensaio, o hemolisado utilizado foi diluído 1:10 (v:v), diferentemente das demais determinações, para evitar densidades ópticas elevadas na cubeta, o que poderia interferir na avaliação da cinética enzimática.

### 3.2.3.6 $\gamma$ -Glutamilttransferase (GGT)

A determinação da atividade da GGT foi realizada utilizando o *kit* comercial Doles®. O princípio do método baseia-se em que a  $\gamma$ -glutamilttransferase (GGT) é uma enzima catalisadora da transferência do grupo glutamila, da  $\gamma$ -glutamila-p-nitroanilida (substrato), para a glicilglicina (receptor), com liberação de p-nitroanilina. Amostras de soro ou plasma (25  $\mu\text{L}$ ) foram adicionadas a um tubo de ensaio contendo 250  $\mu\text{L}$  de substrato de uso e incubou-se durante 10 min a 37°C. Em seguida, foi adicionado 1,25 mL de solução inibidora, adicionou-se 1 gota de nitrito de sódio 1,5% e foi deixado em repouso por 3 min. Posteriormente, adicionou-se 1 gota de sulfamato de amônio 10% e feita homogenização. Após 2 min de repouso foi acrescentado 500  $\mu\text{L}$  de Reagente de Cor e realizada a leitura em 530 nm. Os resultados foram expressos em U.LL<sup>-1</sup>

### 3.2.3.7 Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)

A determinação da atividade da G6PD foi realizada utilizando o *kit* comercial Neolisa G6PD® (Intercientífica®). Para isso, o protocolo experimental foi desenvolvido da seguinte forma: foram pipetados 5  $\mu\text{L}$  de sangue total e controles (normal, intermediário e deficiente) em microplacas de fundo “U”. Em seguida, foram adicionados 75  $\mu\text{L}$  de reagente de eluição e agitados em agitador orbital durante 20 min. Foram transferidos 15  $\mu\text{L}$  do eluído para uma microplaca de fundo chato e, posteriormente acrescentado 75  $\mu\text{L}$  de reagente de trabalho e agitados por 10 min. Foi realizada uma primeira leitura em 405 nm para determinação da concentração de hemoglobina nas amostras de sangue e controles. Adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de reagente de cor, e efetuada leitura

cinética, em 550 nm, durante 10 min, com medidas das alterações da densidade óptica com intervalos de 1 min. Todas as medidas foram realizadas em duplicata e os resultados foram expressos em  $U.gHb^{-1}$ .

### **3.2.4 Marcadores de Dano Oxidativo**

#### **3.2.4.1 Peroxidação lipídica (TBARS)**

A avaliação da peroxidação lipídica endógena foi realizada em duplicata, por detecção em 535 nm dos derivados de seus produtos de oxidação, através de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA) -TBARS, destacando-se o malondialdeído (MDA), produzindo uma base de Schiff de coloração rosa (BIRD; DRAPER, 1984). Para este ensaio, em tubos de ensaio contendo 1 mL de TCA 12% foi adicionado 100  $\mu$ L de plasma e homogeneizado em vórtex. Em seguida, acrescentou-se 0,9 mL de Tampão Tris-HCl, 60 mM, pH 7,4 (0,1mM DTPA) e 1 mL de ácido tiobarbitúrico 0,73%. Após nova homogeneização seguida de incubação de 60 min a 100°C, o material foi resfriado durante 30 min a 4°C e centrifugado (5000 g por 5 min). O sobrenadante foi utilizado para a leitura e os resultados expressos em  $mmol.mL^{-1}$ .

#### **3.2.4.2 Proteína carbonilada (PC)**

Objetivando analisar o dano oxidativo a proteínas por carbonilação, foram determinados os níveis plasmáticos de proteína carbonilada, segundo método de Levine e colaboradores (1990). Em tubos do tipo eppendorf contendo 600  $\mu$ L de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) foi adicionado 100  $\mu$ L de plasma e homogeneizado em vórtex. Posteriormente, foi incubado durante 1 h (à temperatura ambiente, protegido da luz, sob agitação). Em seguida, foi adicionado 600  $\mu$ L de TCA 20%, seguido de agitação e refrigeração (banho de gelo) por 10 min e centrifugado por 5 min a 800 g. O pellet formado foi lavado por 3 vezes, seguidas de centrifugação durante 5 min a 800 g, utilizando 600  $\mu$ L de etanol:acetado de etila (1:5). Após a última lavagem, o excesso de etanol:acetado de etila foi removido com auxílio de um cotonete e foram adicionados 800  $\mu$ L de guanidina e incubado por 60 min a 37°C e na sequência, realizada a leitura em 360 nm. A concentração de proteínas totais (PT) foi determinada de acordo com o método de Lowry e colaboradores (1951), utilizando uma curva padrão de albumina. A concentração de proteína carbonilada foi expressa em  $nmol. mg^{-1}$ .

### 3.2.5 Conteúdo de Transferrina

A determinação do conteúdo de transferrina sérica foi realizada segundo *kit* Biotecnica® e utilizando o calibrador da marca Labtest®, o qual é baseado no método imunoturbidimétrico em que os anticorpos específicos formam com a transferrina um complexo insolúvel, conferindo uma turbidez, cuja intensidade é proporcional à quantidade de transferrina no soro. Para tal determinação, em uma placa de 96 poços foram pipetados 250 µL de reagente contento os anticorpos, soro e calibrador Labtest® (ambos pré-diluídos 1:15 em solução fisiológica). Incubou-se a 37°C durante 10 min, em seguida determinou-se a absorbância em 340 nm. Os resultados foram expressos mg.dL<sup>-1</sup>.

### 3.2.6 Marcadores Inflamatórios

#### 3.2.6.1 Mieloperoxidase (MPO)

A atividade da mieloperoxidase sérica foi mensurada segundo o método descrito por Rao e colaboradores (1993). Primeiramente, as amostras foram descongeladas gradualmente e 20 µL foram transferidos para placas contendo 150 µL de meio de reação (0,167 mg.mL<sup>-1</sup> de *o*-dianisidina 2HCl, 0,0005% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O destilada e NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM). Após 15 min de incubação em temperatura ambiente a reação foi interrompida com a adição de 30 µL de azida sódica 1%. Após incubação de 10 min à temperatura ambiente, a densidade óptica foi medida em 450 nm em placas de Elisa e comparadas com uma curva-padrão de atividades conhecidas de MPO (0,7 a 140 mU.mL<sup>-1</sup>). Os resultados foram expressos em mU.mL<sup>-1</sup>, com auxílio da equação da reta.

#### 3.2.6.2 Conteúdo de TNF-α e IL-1β

Para a análise das concentrações de TNF-α e IL-1β, alíquotas de 100 µL foram processadas para quantificar estas citocinas. Neste protocolo, *kits* comerciais disponíveis (BD Biosciences®) foram utilizados com anticorpos monoclonais específicos para cada citocina. As concentrações das citocinas foram mensuradas utilizando-se a técnica de ELISA tipo sanduíche, realizados de acordo com as instruções do fabricante. Curvas-padrão com concentrações conhecidas de cada citocina, TNF-α (0 – 1000 pg.mL<sup>-1</sup>) e IL-1β (0 - 125 pg.mL<sup>-1</sup>) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo-se a quantificação dos valores desconhecidos com o auxílio da equação da

reta. Os valores das citocinas e suas respectivas curvas-padrão foram realizadas por meio da medida colorimétrica em 450 nm, realizadas em leitor de ELISA (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA). Os valores foram expressos em  $\text{pg.mL}^{-1}$ .

### 3.2.7 Equipamentos e Reagentes

Os reagentes utilizados para os ensaios de estresse oxidativo e de marcadores inflamatórios foram adquiridos juntos à Sigma Chemical® Co (Ohio, EUA). Os demais reagentes foram de grau analítico provenientes de empresas nacionais (Merck®, Vetec® e Reagen®). Também foram adquiridos *kits* para as determinações bioquímicas GGT (Doles®), Transferrina (Biotecnica®), G6PD (Intercientífica®), ácido úrico (Analisa®) e citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (BD Biosciences®).

As soluções reagentes assim como os meios, foram preparados utilizando balança analítica marca Ohaus® modelo AR2140 e pHmetro marca Digimed®, modelo DM20. Para as avaliações bioquímicas, foi utilizado espectrofotômetro UV-visível, duplo feixe, marca/modelo GBC916 acoplado a um software apropriado, ou ainda, leitor de placas, marca TECAN® do Laboratório Multiusuário do Centro de Ciências Biológicas (CCB/UFSC).

### 3.2.8 Análise Estatística

A análise estatística empregada foi análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas, admitindo um nível de significância mínimo de  $p < 0,05$ . O emprego do teste *t* de Student foi usado comparando indivíduos controles e os pertencentes ao Grupo com SD antes das intervenções. Para todas as análises foi utilizado o Software Prism 5.0.

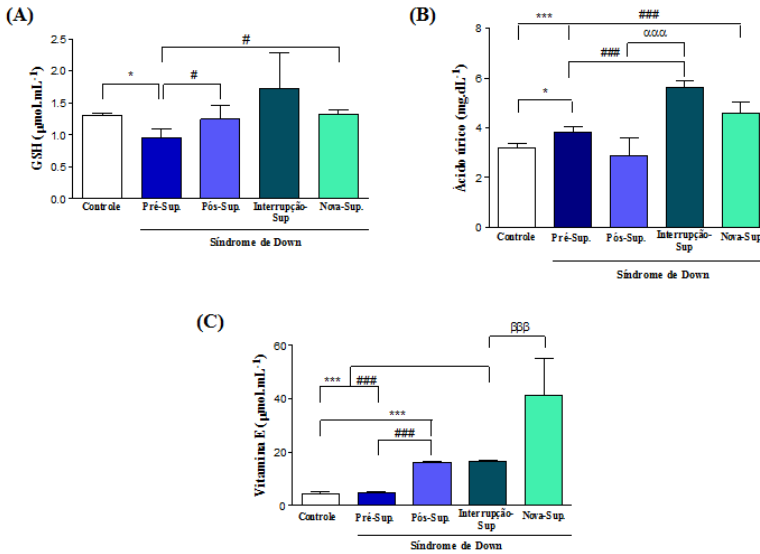


### 3.3 RESULTADOS

As concentrações no sangue total de GSH foram diminuídas (27%) nos indivíduos com SD, quando comparados com os controles, ao passo que, após 6 meses de suplementação com antioxidantes, tais concentrações foram restauradas (30%, Figura 12A). Após interrupção da suplementação, assim como após nova suplementação, os valores mantiveram-se semelhantes, ou seja, não houve diferença estatística quando comparado ao grupo suplementado.

O ácido úrico mostrou-se aumentado no grupo SD antes da suplementação (19%), sendo que após a suplementação não houve diferença estatística, quando comparado ao grupo controle e nem ao grupo SD pré-suplementação. Após interrupção da suplementação com as vitaminas, houve significativo aumento, quando comparado ao grupo SD suplementado (93%) (Figura 12B). Além disso, depois da nova suplementação, os valores mantiveram-se constantes em relação ao período de interrupção da suplementação, porém quando comparados com o grupo Pré-Suplementação, houve diferença estatística.

O conteúdo plasmático de vitamina E não esteve alterado no grupo de crianças com SD antes da suplementação vitamínica. Porém, após 6 meses de suplementação houve significativo aumento (260%) desse analito no plasma da população estudada. Esses valores mantiveram-se semelhantes após 6 meses da interrupção da suplementação, ou seja, não foi encontrada diferença estatística deste analito no plasma. (Figura 12C). Após nova suplementação houve um aumento significativo (149%) nas concentrações plasmáticas de vitamina E.

**Figura 12-** Defesas antioxidantes não enzimáticas

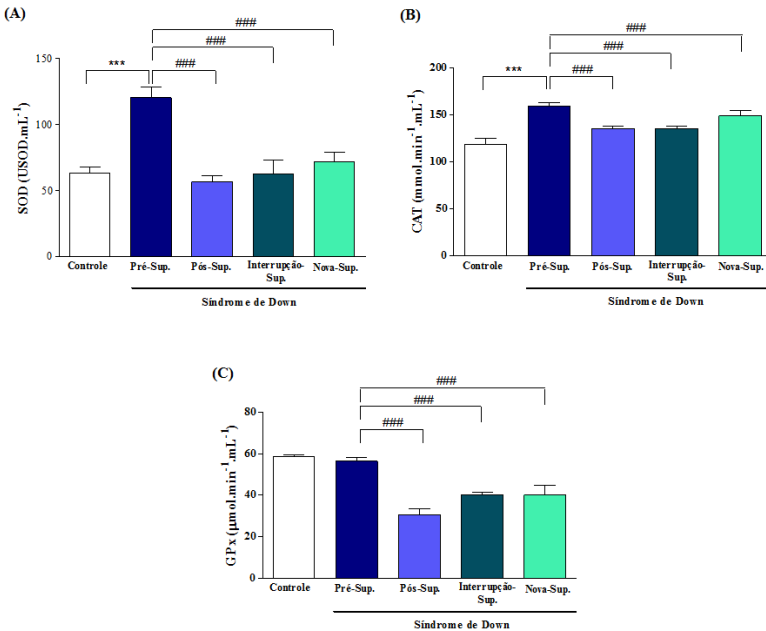
**(A)** Concentrações sanguíneas de GSH dos diferentes grupos analisados. **(B)** Concentrações séricas de ácido úrico dos diferentes grupos analisados. **(C)** Níveis plasmáticos de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) dos diferentes grupos analisados. (Controle) Crianças sem SD (n=18); (Pré-Sup) Crianças com SD antes da suplementação (n=21); (Pós-Sup) Crianças com SD após a suplementação com vitaminas E e C (n=21); (Interrupção-Sup) Crianças com SD com a interrupção da suplementação com vitaminas E e C (n=17); (Nova-Sup) Crianças suplementadas novamente com vitaminas E e C. Valores expressos em Média±EP. (\*) (\*\*\*) representa a diferença estatística com  $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente, em relação ao Controle. (#) (###) representa a diferença estatística com  $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente, em relação ao grupo Pré-Sup. ( $\alpha\alpha\alpha$ ) representa a diferença estatística com  $p < 0,001$  em relação ao grupo Pós-Sup. ( $\beta\beta\beta$ ) representa a diferença estatística com  $p < 0,001$  em relação ao grupo Interrupção-Sup.



A atividade enzimática da SOD mostrou-se elevada (47%) nos indivíduos com SD antes da suplementação antioxidante. Após a administração das vitaminas, a atividade enzimática normalizou-se, chegando a valores próximos aos controles (diminuição de 46%); (Figura 13A). Além disso, mesmo após a interrupção da terapia, os valores mantiveram-se, ou seja, não houve diferença estatística após a interrupção da suplementação. Após nova suplementação, os valores desta enzima mais uma vez mantiveram-se constantes.

A CAT apresentou perfil semelhante ao da SOD. A atividade enzimática da CAT mostrou-se elevada (aproximadamente 25%) nos indivíduos com SD antes da suplementação antioxidante. Após a administração das vitaminas, a atividade enzimática diminuiu significativamente (15 %); (Figura 13B). Além disso, mesmo após a interrupção da terapia, os valores não se mostraram alterados, não havendo diferença estatística entre o grupo Pós-Suplementação e o grupo o qual suplementação suspensa. Mesmo após nova suplementação, os valores enzimáticos não mostraram alteração.

Entretanto, a atividade da GPx não mostrou diferença estatística nos indivíduos com SD antes da administração das vitaminas. Porém, após a suplementação, houve significativa diminuição dos valores deste analito (46%). Após a retirada da suplementação, os valores subiram novamente (13%), porém não chegando aos valores anteriores à suplementação, mesmo assim, houve diferença estatística em relação ao grupo Pré-Suplementação (diminuição de 47 %) assim como comparativamente ao grupo de suplementados (aumento de 31%) (Figura 13C). Não houve diferença estatística após nova suplementação.

**Figura 13-** Enzimas antioxidantes

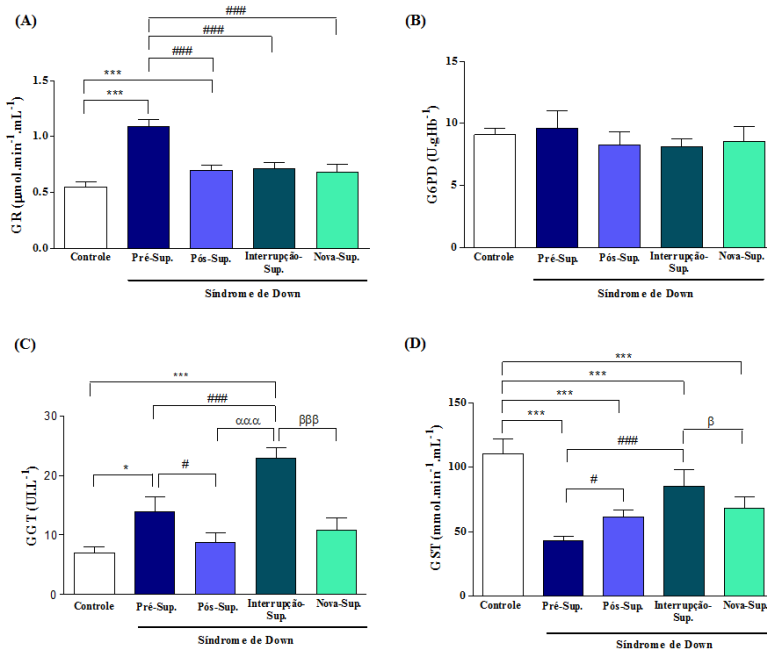
Atividade da superóxido dismutase (SOD); **(A)**, catalase (CAT); **(B)** e glutationa peroxidase (GPx); **(C)** no hemolisado dos diferentes grupos analisados (Controle) Crianças sem SD (n=18); (Pré-Sup) Crianças com SD antes da suplementação (n=21); (Pós-Sup) Crianças com SD após a suplementação com vitaminas E e C (n=21); (Interrupção-Sup) Crianças com SD com a interrupção da suplementação com vitaminas E e C (n=17); (Nova-Sup) Crianças suplementadas novamente com vitaminas E e C (n=16). Valores expressos em Média $\pm$ EP. (\*\*\*) representa a diferença estatística com  $p < 0,001$  em relação ao Controle. (###) representa a diferença estatística com  $p < 0,001$  em relação ao grupo Pré-Sup.

O comportamento da GR acompanhou as atividades enzimáticas da SOD e CAT, Primeiramente, mostrou-se elevado (98%) nos indivíduos com SD antes do início da terapia antioxidante, sendo que, após os 6 meses de terapia, houve diminuição (36%) significativa da atividade desta enzima, permanecendo praticamente nos mesmos valores (sem diferença estatística) após a parada da suplementação, assim como após a retomada da suplementação (Figura 14A).

Não ocorreram alterações significativas na atividade da G6PD em todos os grupos analisados, após a suplementação antioxidante (Figura 14B).

A GGT seguiu o mesmo perfil encontrado na SOD, CAT e GR, apresentando valores elevados (97%) nos participantes com SD não suplementados. Após a terapia antioxidante, houve diminuição (37%) significativa na atividade desta enzima. Porém, após a retirada dos suplementos, houve elevação (163%) acentuada e significativa na atividade desta enzima. Após retomada a suplementação a atividade da GGT diminuiu consideravelmente (53%) (Figura 14C).

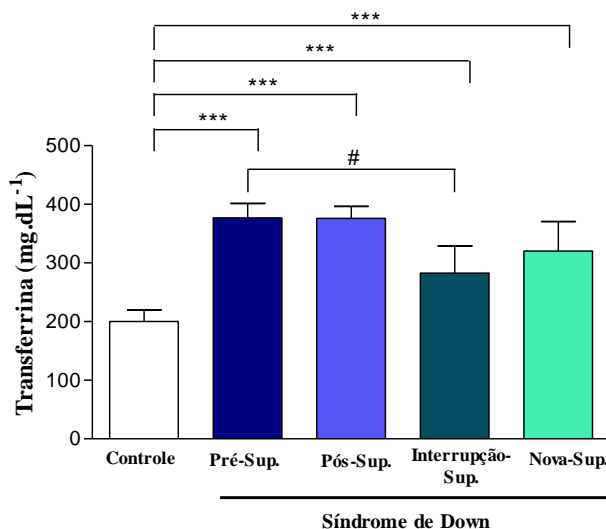
Interessantemente, houve diminuição (61%) na atividade da GST em indivíduos SD, comparativamente aos controles antes da suplementação. Entretanto, revelou aumento significativo (44%) depois da intervenção antioxidante (Figura 14D). Mesmo interrompendo e depois retomada a suplementação, os valores mantiveram-se sem diferença estatística, comparativamente à suplementação.

**Figura 14-** Enzimas antioxidantes envolvidas com a GSH

Atividade da glutatona redutase (GR) no hemolisado; **(A)**, glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) no sangue total; **(B)**,  $\gamma$ -glutamyltransferase (GGT) no soro; **(C)** e glutatona S-transferase (GST) no hemolisado; **(D)**, dos diferentes grupos analisados. (Controle) Crianças sem SD (n=18); (Pré-Sup) Crianças com SD antes da suplementação (n=21); (Pós-Sup) Crianças com SD após a suplementação com vitaminas E e C (n=21); (Interrupção-Sup) Crianças com SD com a interrupção da suplementação com vitaminas E e C (n=17); (Nova-Sup) Crianças suplementadas novamente com vitaminas E e C (n=16). Valores expressos em Média±EP. (\*)(\*\*\*) representa a diferença estatística com  $p<0,05$  e  $p<0,001$ , respectivamente, em relação ao Controle. (#)(###) representa a diferença estatística com  $p<0,05$  e  $p<0,001$ , respectivamente, em relação ao grupo Pré-Sup. (ααα) representa a diferença estatística com  $p<0,001$  em relação ao grupo Pós-Sup. (βββ) representa a diferença estatística com  $p<0,001$  em relação ao grupo Interrupção-Sup.

As concentrações séricas de transferrina mostraram valores aumentados (88%) nas crianças com SD antes e após a suplementação com vitamina E e C, em relação aos controles. Porém, quando comparadas entre si não mostraram diferença significativa (Figura 15), até mesmo após a parada da suplementação seguida de nova suplementação.

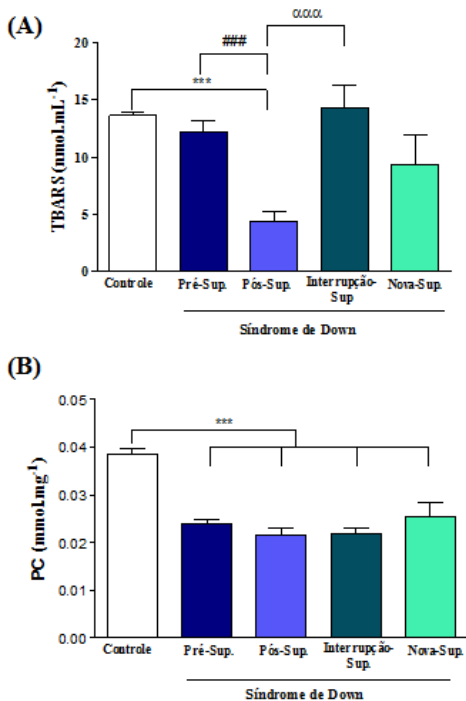
**Figura 15-** Concentrações de Transferrina.



Concentrações séricas de transferrina dos diferentes grupos analisados. (Controle) Crianças sem SD (n=18); (Pré-Sup) Crianças com SD antes da suplementação (n=21); (Pós-Sup) Crianças com SD após a suplementação com vitaminas E e C (n=21); (Interrupção-Sup) Crianças com SD com a interrupção da suplementação com vitaminas E e C (n=17); (Nova-Sup) Crianças suplementadas novamente com vitaminas E e C (n=16). Valores expressos em Média±EP. (\*\*\*) representa a diferença estatística com  $p < 0,001$  em relação ao Controle. (#) representa a diferença estatística com  $p < 0,05$  em relação ao Pré-sup.

Não foram detectadas alterações significativas nos valores plasmáticos de TBARS antes da suplementação com antioxidantes em relação ao grupo controle. No entanto, após a intervenção antioxidante foi observado decréscimo (181%) significativo deste analito (Figura 16A). Após a interrupção da terapia os valores de TBARS foram aumentados (32%). Quando retomada a suplementação, os valores tenderam a uma diminuição, porém não houve diferença estatística quando comparada a interrupção da suplementação.

Já as concentrações de PC mostraram-se diminuídas (40%) no grupo SD antes da terapia em comparação ao controle, mas nenhuma diferença estatística foi observada entre o momento da intervenção e retirada dos antioxidantes, assim como no momento da nova suplementação (Figura 16B).

**Figura 16-** Marcadores de dano oxidativo.

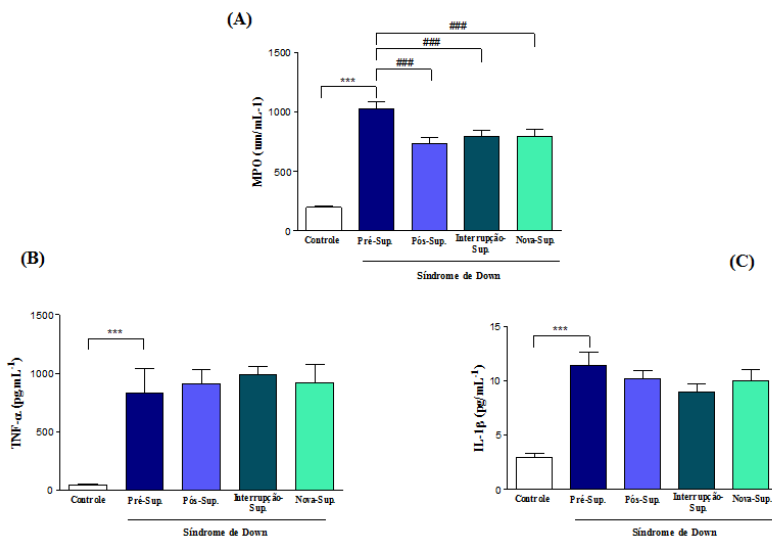
**(A)** Conteúdo plasmático de TBARS dos diferentes grupos analisados. **(B)** Conteúdo plasmático de proteína carbonilada (PC) dos diferentes grupos analisados. (Controle) Crianças sem SD (n=18); (Pré-Sup) Crianças com SD antes da suplementação (n=21); (Pós-Sup) Crianças com SD após a suplementação com vitaminas E e C (n=21); (Interrupção-Sup) Crianças com SD com a interrupção da suplementação com vitaminas E e C (n=17); (Nova-Sup) Crianças suplementadas novamente com vitaminas E e C (n=16). Valores expressos em Média±EP. (\*\*\*) representam a diferença estatística com  $p < 0,001$ , em relação ao Controle. (###) representa a diferença estatística com  $p < 0,001$  em relação ao Pré-Sup. (ααα) representa a diferença estatística com  $p < 0,001$  em relação ao grupo Pós-Sup.

A atividade da MPO apresentou valores aumentados (420%) antes da suplementação da vitamina E e C, e após a terapia antioxidante houve diminuição de 28% da atividade desta enzima (Figura 17A). Após a interrupção da suplementação e seguida de nova suplementação, os valores desta enzima mantiveram-se constantes.

Os valores de TNF- $\alpha$  mostraram-se elevados (1626%) no grupo SD antes da suplementação, comparativamente ao grupo controle. Porém, após as suplementações, interrupção da terapia e nova suplementação, não houve diferença estatística nestes grupos (Figura 17B).

O conteúdo sérico de IL-1 $\beta$  mostrou-se aumentado (293%) no grupo SD antes da suplementação, quando comparados ao grupo controle. Porém, não houve diferença estatística após a suplementação, bem como após a interrupção seguida de nova suplementação de vitaminas (Figura 17C).



**Figura 17-** Marcadores inflamatórios.

**(A)** Atividade da mieloperoxidase sérica (MPO), **(B)** Conteúdo sérico de TNF- $\alpha$  e nos diferentes grupos analisados. **(C)** Conteúdo sérico de IL-1 $\beta$  nos diferentes grupos analisados. (Controle) Crianças sem SD (n=18); (Pré-Sup) Crianças com SD antes da suplementação (n=21); (Pós-Sup) Crianças com SD após a suplementação com vitaminas E e C (n=21); (Interrupção-Sup) Crianças com SD com a interrupção da suplementação com vitaminas E e C (n=17); (Nova-Sup) Crianças suplementadas novamente com vitaminas E e C (n=16). Valores expressos em Média $\pm$ EP. (\*\*\*) representam a diferença estatística com  $p < 0,001$ , em relação ao Controle. (###) representa a diferença estatística com  $p < 0,001$  em relação ao Pré-Sup.



### 3.4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com as enzimas antioxidantes mostraram a existência de processo de EO sistêmico em crianças com SD. Após a intervenção com a suplementação das vitaminas E e C ocorreu queda da atividade enzimática em praticamente todos os marcadores enzimáticos.

Os resultados apresentados pela SOD mostraram aumento de quase 50% na atividade desta enzima nos indivíduos portadores da trissomia 21, quando comparados ao grupo controle. Fato esperado, pois esses indivíduos possuem maior expressão desta enzima, pois o gene que a codifica encontra-se na região 21q22 do cromossomo 21, a qual é considerada uma região crítica para a SD (DSCR) (ANTONARAKIS, 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Após a terapia antioxidante, ocorreu uma queda significativa da atividade da SOD, chegando a valores semelhantes ao grupo controle, o que mostra o efeito modulador da suplementação das vitaminas E e C sobre esta importante enzima antioxidante (CACHIA et al., 1998; TRABER; ATKINSON, 2007).

Um estudo realizado em sangue de cabras demonstrou que a vitamina E é capaz de controlar o efeito do EO por modulação da enzima SOD e interleucina-2 (IL-2) em leucócitos desses animais, através da redução da expressão desta enzima e citocina, respectivamente (DAS et al., 2012).

Além destas propriedades antioxidantes, o  $\alpha$ -tocoferol possui a capacidade de inibir a proteína cinase C (PKC) em vários tipos celulares, levando a uma conseqüente inibição da produção do ânion  $O_2^{\bullet-}$  em monócitos e macrófagos, pelo sistema NADPH oxidase (CACHIA et al., 1998; TRABER; ATKINSON, 2007).

Outro estudo cujos dados são semelhantes aos resultados deste estudo, é o trabalho realizado por Golestani e colaboradores (2006), onde observaram que doses não-tóxicas de vitamina E em alguns níveis pode regular a atividade da SOD, sendo que o efeito cumulativo das mesmas doses pode levar a uma atenuação da atividade da SOD, o que seria interessante no caso de portadores de SD, atenuando o EO característico dessa condição genética. Este fato foi observado neste estudo (Figura 10A), pois a suplementação permitiu que a atividade da SOD quase igualasse os valores dos controles (indivíduos sem SD e saudáveis)

Porém, um estudo realizado com células neuronais para modelo *in vitro* de SD, através da indução de apoptose por produção de  $H_2O_2$ , mostrou que o  $\gamma$ -tocotrienol não foi capaz de proteger estas células, o que sugere que não são todos os trienóis e tocoferóis que possuem capacidade de neuroproteção (THEN, 2012).

Verificou-se também um aumento significativo na atividade enzimática da CAT (aproximadamente 25%) no grupo de crianças com SD, comparativamente ao grupo controle. Segundo Pastor e colaboradores (1998), este aumento da atividade da CAT decorreria de uma resposta fisiológica com o objetivo de eliminar o excesso de  $H_2O_2$  produzido pelo excesso da atividade da enzima SOD decorrente da trissomia. Apesar disso, o aumento da atividade da SOD (quase 50%) é muito maior que o percentual de aumento da CAT, o que levaria a uma condição de EO sistêmico.

Após a terapia antioxidante, ocorreu diminuição significativa da atividade da CAT, resultado esperado, uma vez que, após a suplementação a atividade da SOD chegou a valores semelhantes ao grupo controle, o que possivelmente resultou em menor produção endógena de  $H_2O_2$ , permitindo que a CAT não fosse tão ativada como na fase pré-suplementação.

A eficiência da suplementação combinada de vitaminas E e C em relação ao EO já fora mostrada por Manjula e colaboradores (2013), os quais investigaram o efeito desta combinação em modelo de envelhecimento em ratos. Verificaram que a suplementação com ambas as vitaminas diminuía a atividade da CAT e SOD, assim como os níveis de  $H_2O_2$  formado no hipotálamo destes animais. Outro estudo que reforça esta hipótese (EBUEHI et al., 2012) verificou que a administração oral de vitaminas E e C, em ensaios de toxicidade com chumbo, diminuiu significativamente a concentração de chumbo no sangue, levando à significativa melhora da lesão hepática, atenuando também o EO no cérebro de ratos por diminuição da atividade da SOD e CAT.

Além disso, um outro estudo mostrou que o  $\alpha$ -tocoferol administrado de forma oral consiste em potente agente protetor no combate à nefrotoxicidade induzida pelo glutamato monossódico, em um modelo animal relacionado com o EO. Neste modelo foi verificada diminuição da atividade das enzimas antioxidantes, dentre elas a CAT (PAUL et al., 2012). Não foram encontrados na literatura estudos que demonstrem o efeito da suplementação antioxidante no sangue de

crianças e/ou adultos com SD, com os mesmos marcadores oxidativos, principalmente em relação à enzima CAT.

Apesar de não haver diferença estatística entre o grupo controle e o grupo SD não suplementado, a atividade enzimática da GPx diminuiu significativamente após a suplementação vitamínica. A diminuição da atividade desta enzima, poderia ser decorrência da ação sinérgica entre as vitaminas E e C, ou ainda, devido à diminuição da atividade da SOD, causando menor produção de  $H_2O_2$  (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A GPx possui como fração enzimática o GPx-fosfolípídio hidroperóxido, o qual possui a capacidade de reagir com fosfolípidios, impedindo/diminuindo o processo de peroxidação lipídica dessas membranas (ARTHUR, 2000; IMAI; NAKAGAWA, 2003), aspecto que, aparentemente, poderia ocorrer nos resultados de TBARS, onde seus níveis permaneceram inalterados nas crianças com SD, quando comparadas ao grupo controle.

A GR apresentou aumento de sua atividade no grupo SD antes de iniciar a terapia antioxidante, comparativamente aos controles. Este resultado deve estar relacionado ao conteúdo de GSH sanguíneo diminuído, pois esta enzima converte a GSSG para GSH através da oxidação do NAPH à NADP (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Após a terapia antioxidante houve queda acentuada da atividade da enzima GR, da mesma forma que os valores de GSH, os quais foram restaurados após a intervenção antioxidante. Este resultado reforça a eficácia do efeito redutor da suplementação vitamínica.

Outro resultado semelhante aos dados deste estudo, e que vai ao encontro dos dados obtidos com os ensaios referentes à GR e GSH, consiste na atividade enzimática da GGT (Figura 14C), a qual mostrou aumento no grupo SD pré-suplementação, quando comparados ao controle, pois a GGT promove “*turnover*” de GSH, provavelmente indicando que esta enzima estaria tentando restaurar as concentrações intracelulares de GSH, as quais se mostraram diminuídas antes da intervenção antioxidante (Figura 12A). A GGT possui a capacidade de metabolizar a GSH extracelular, permitindo que os aminoácidos precursores desta molécula sejam reutilizados para síntese de GSH no interior da célula (DROZDZ et al., 1998).

Após a suplementação, assim como ocorreu com a GR, houve queda da atividade enzimática da GGT, pois os níveis de GSH se normalizaram em relação aos controles, mostrando a participação desta enzima na manutenção dos níveis de GSH eritrocitários. Existem dois estudos que sugerem que a atividade da GGT no soro poderia ser

considerada um marcador precoce de EO (LIM et al., 2004; LEE et al., 2004; ONUR et al., 2014). Além disso, conforme descrito anteriormente, outros autores levantam outra hipótese sobre esta enzima, a qual poderia ser considerada um marcador de EO, e que atividades muito elevadas na presença de transferrina, poderiam estar relacionadas a processos mutagênicos, devido às consequências pró-oxidantes da produção de  $\cdot\text{OH}$  (DROZDZ et al., 1998).

Os valores de transferrina séricos encontrados mostraram aumento da concentração desta proteína transportadora de ferro no grupo SD antes do início da terapia antioxidante. Entretanto, não houve diferença nos níveis séricos desta proteína após a suplementação com as vitaminas. Aparentemente, com os resultados obtidos, a transferrina não exerceria um papel importante no processo de EO, pois, mesmo aumentada nas crianças com SD, seria necessário, que concomitantemente, a atividade da GGT estivesse extremamente elevada. Além disso, no grupo SD em que houve interrupção da suplementação, houve diminuição (Figura 15) das concentrações séricas de transferrina acompanhada de aumento da atividade da GGT, mostrando uma provável correlação negativa em relação a estas duas enzimas.

A mieloperoxidase (MPO) é considerada um marcador de inflamação, a qual participa do mecanismo de defesa do sistema imune inato através da formação de espécies oxidantes microbicidas e espécies radiculares difusíveis (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A atividade da MPO mostrou-se elevada no grupo SD antes da suplementação. Após a suplementação ocorreu diminuição da atividade da MPO, sugerindo que a ação da terapia antioxidante, não apenas diminuiria a produção de EROs, como também apresentaria ação anti-inflamatória. Coerentemente, alguns estudos mostraram ação anti-inflamatória de formas do  $\alpha$ -tocoferol em sistemas biológicos. Wang e Jiang (2012) mostraram que o  $\gamma$ -trienol, uma forma natural da vitamina E, apresentou atividade anti-inflamatória por inibição do fator nuclear kappa beta (NF $\kappa$ B) e proteína potencializadora de ligação C (C/EBP $\beta$ ) em macrófagos. Esses dois fatores de transcrição promovem a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL8, TNF- $\alpha$ , além de regularem genes para seus receptores (MUKAIDA et al., 1991; STEGMAIER et al., 2008). A IL-8 é um mediador de inflamações, estimulando a quimiotaxia de células T e de neutrófilos, assim como sua degranulação (ROEBUCK et al., 1999). Nestes grânulos, a MPO é uma enzima de destaque, a qual está presente

nos grânulos azurófilos dos polimorfonucleares e monócitos. A MPO gera EROs, como por exemplo, o HOCl, que, uma vez produzido em grande quantidade pode gerar lesão lipídica, proteica e em nível de DNA (HANSSON et al., 2006; MALLE et al., 2007).

Além disso, os resultados referentes às citocinas próinflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  mostraram-se elevados no grupo de crianças com SD antes da suplementação com as vitaminas, comparado ao grupo controle. Um estudo realizado por Griffin e colaboradores (1989) mostrou aumento de IL-1 $\beta$  na SD. Segundo estes autores, a interação entre APP, S100B e IL-1 $\beta$  que estariam aumentadas devido ao aumento da expressão de genes que codificam tais proteínas, poderiam levar a vários insultos neurais, cada um dos quais relacionados à neuroinflamação e com o desenvolvimento de risco de alterações neuropatológicas da DA.

Os genes que codificam os receptores para INF- $\alpha$ 1, INF- $\alpha$ 2 e INF- $\gamma$  (IFNAR1, IFNAR2 e IFNGR2) estão localizados no cromossoma 21, e portanto estão sujeitos à triplicação. IFNAR1 e IFNAR2 ativam vias de sinalização de indução de citocinas próinflamatórias, incluindo expressão de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  (WILCOCK et al., 2013). Porém, após a suplementação com as vitaminas E e C não houve mudanças nos níveis dessas citocinas, o que provavelmente deve-se ao fato destas citocinas estarem aumentadas naturalmente, e estas vitaminas não teriam capacidade de interferir na expressão dessas citocinas.

A ocorrência do EO associado à condição genética de indivíduos portadores de SD, está associado à ocorrência de dano a biomoléculas, dentre elas lipídios, proteínas, ou ainda, ao DNA (ANI; GRANTHAM-McGREGOR; MULLER, 2000). Um exemplo é o estudo realizado por Jovanovic e colaboradores (1998), que mostrou elevação dos conteúdos de (8OHdG) (marcador de dano oxidativo ao DNA) e MDA (marcador de dano lipídico).

Apesar de existirem estudos contraditórios, a sua maioria mostra a presença de uma condição oxidativa nos indivíduos SD, a qual levaria a consequências danosas. Nossos resultados também sugerem a ocorrência de EO sistêmico, pois as enzimas antioxidantes, em sua grande maioria, mostraram-se claramente induzidas nesses indivíduos (GARLET et al., 2013). Entretanto, não houve diferença significativa entre o grupo constituído por crianças com SD e o controle em relação aos níveis de TBARS, importante marcador de dano oxidativo.

Campos e colaboradores (2011) também mostraram que crianças com SD não apresentam diferenças significantes nos

marcadores de dano lipídico, incluído o TBARS, quando comparados a um grupo controle (crianças sem SD). Os mesmos pesquisadores atribuíram estes resultados à maior concentração de AU nas crianças com SD, uma vez que o AU é considerado um importante antioxidante plasmático/urinário (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; TIANO et al., 2008). Este aspecto foi observado no presente estudo, pela dosagem de AU sérico, onde nas crianças com SD, as quais ainda não haviam iniciado a terapia antioxidante, mostraram níveis elevados em relação ao grupo controle.

O AU é responsável por cerca de 60% da eliminação de EROs plasmáticos (SIMÃO et al., 2008). O mecanismo antioxidante do AU pode ser resumido pela reação com a maioria dos agentes oxidantes em velocidade superior a das outras purinas (NIETO et al., 2000). O AU reage rapidamente com o HO<sup>•</sup>. Porém, o urato é inerte às espécies superóxido (HOO<sup>-</sup>), radical ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), peróxidos (ROOH) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Essa grande atividade contra os radicais peroxil seria a base do seu efeito antioxidante protetor do DNA e lipídios. Como ocorre em meio aquoso, o AU reage com os radicais peroxil antes de atingirem a membrana e iniciarem seus danos. O AU é também capaz de recuperar estruturas já atacadas, que se tornaram RL através da doação de um elétron e um próton (BARREIROS et al., 2006). Além disso, segundo Domazou e colaboradores (2012), ele não é apenas capaz de impedir o dano lipídico, como também o dano às proteínas e ao DNA.

Outro indicativo de que o AU estaria atenuando a peroxidação lipídica seria o fato de não existir diferença estatística nos níveis de vitamina E plasmáticos entre o grupo de crianças SD não suplementado e o controle, o que poderia sugerir que o urato estaria sendo utilizado, provavelmente poupando a vitamina E no sistema. Porém, já se evidenciou diminuição nos níveis de vitaminas C e E em crianças com SD em relação a crianças normais e saudáveis sem qualquer intervenção ou tratamento com antioxidantes (MEGUID et al., 2010).

No presente trabalho, após a suplementação antioxidante, verificou-se uma queda significativa nos níveis de TBARS dos indivíduos com SD, resultado esperado, uma vez que a vitamina E atua impedindo a cadeia de propagação da lipoperoxidação (MARNETT, 1999; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Meguid e colaboradores (2010) mostraram que a terapia antioxidante com homocisteína, ácido fólico e vitamina B<sub>12</sub>, em mães gestantes de filhos com SD, também



diminuiu os níveis plasmáticos de TBARS nas crianças, após o nascimento.

Lockrow e colaboradores (2009) avaliaram a suplementação de vitamina E no cérebro de ratos Ts65Dn (modelo animal de SD), em condição de EO. Verificaram que a suplementação não só diminuiu os marcadores de EO no cérebro, como melhorou a performance da memória espacial e atenuou a patologia neuro-colinérgica nos animais. Concluíram que a vitamina E atrasa o início das anormalidades cognitivas e morfológicas em modelos animais de SD, e que isto poderia representar um seguro e efetivo tratamento precoce na progressão da neuropatologia da SD.

Outro estudo que evidenciou a eficiência da vitamina E foi realizado por Shichiri e colaboradores (2011) em modelo animal de SD (igualmente em animais Ts65Dn), no que a terapia crônica com  $\alpha$ -tocoferol em ratas grávidas foi capaz de atenuar os produtos da lipoperoxidação nos recém-nascidos, melhorando assim, a cognição dos animais após o nascimento, além de apresentar melhora da hipocelularidade no giro denteado (região do hipocampo mais vulnerável ao envelhecimento) no cérebro desses animais, ou seja, diminuindo morte neuronal nessa região do cérebro.

Proteínas carboniladas (PC) são formadas por ataque de RL nas cadeias laterais de aminoácidos (Sousa et al., 2015) Existem poucos dados na literatura relacionando dano proteico à suplementação antioxidante em amostras de sangue na população SD, como por exemplo, o estudo realizado por Ordóñez (2012) e colaboradores, que avaliaram as concentrações de PC antes e após exercício aeróbio moderado em adolescentes com SD, o qual verificou diminuição do conteúdo de PC nesse grupo. Žitňanová e colaboradores (2006), avaliou marcadores de EO no plasma de crianças com SD, dentre eles dano proteico, através da dosagem de PC, porém não verificaram diferença nos valores de dano proteico. Da mesma forma, porém em urina, Nachvak e colaboradores (2014) não encontraram diferenças no conteúdo de 8-OHdG em crianças com SD suplementadas com  $\alpha$ -tocoferol e ácido lipóico. De acordo com nossos dados, um recente estudo na saliva de pacientes com SD não apresentou diferença no conteúdo de PC nesses indivíduos em comparação a um grupo controle (SOUSA et al., 2015). Porém, esses dados poderiam ser relacionados com dano ao DNA. Jovanovic e colaboradores (1998) mostraram significativa alteração dos biomarcadores de EO na urina de indivíduos com SD, dentre eles a 8-OHdG.

Com relação aos valores de transferrina sérica, os indivíduos com SD mostraram valores elevados quando comparados aos do grupo controle. A suplementação mostrou-se capaz de diminuir significativamente essa proteína de transporte, até mesmo após a interrupção da suplementação. Também não existem dados relacionados às concentrações séricas desse analito, assim como de ferro sérico na população de estudo. Apesar do aumento significativo, aparentemente parece não exercer papel oxidativo, uma vez que a atividade da GGT mostrou-se dentro dos valores de referência ( $<18,00$  UI/L), exceto após a interrupção da suplementação, onde ocorreu considerável aumento, porém naquele momento as concentrações de transferrina sofreram uma tendência a retornar às concentrações normais (não havendo diferença em relação aos controles).

Apesar de muitas controvérsias no universo científico e médico, existem diversos estudos consistentes que recomendam a suplementação combinada com antioxidantes, principalmente as vitaminas E e C, tanto de forma preventiva, como muitas vezes, de forma terapêutica. Atualmente tem-se relatado mais de 200 doenças que estudos experimentais comprovem a ocorrência do desbalanço oxidativo, como por exemplo, doenças cardiovasculares, neurológicas, endócrinas, respiratórias, imunológicas, câncer, assim como a progressão de tumores, entre outras (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; SELLES, 2011).

O tema sobre a eficácia da terapia antioxidante é ainda controverso dentro da comunidade científica. As discussões baseiam-se em formulações que contenham produtos antioxidantes, sejam administrados unicamente, ou como complemento da fórmula, para a terapia de doenças específicas. De fato, tem-se sugerido alguma relação entre a progressão da etiologia da enfermidade e a presença de EO de alguma forma. Além disso, a maioria dos protocolos de ensaios clínicos realizados no âmbito da terapia antioxidante não leva em consideração a intervariação do EO entre os pacientes (SELLES, 2011).

Existem vários estudos que defendem o uso da suplementação em doenças humanas. Winklhofer-Roob e colaboradores (1995) mostraram que a resistência da LDL à oxidação é prejudicada em pacientes com fibrose cística com deficiência em vitamina E, porém esta capacidade mostrou-se normalizada dentro de dois meses, quando a vitamina E foi administrada em concentrações suficientes. Além disso, outro estudo realizado em humanos, mostrou que a suplementação com

vitamina E aumenta efetivamente a resistência à oxidação da LDL (DIEBER-ROTHENEDER et al., 1991).

Reaven e colaboradores (1993) realizaram um estudo de 2 fases em grupo de voluntários. Na primeira fase os indivíduos receberam 60 mg/dia de  $\beta$ -caroteno por 3 meses, após receberam, além do  $\beta$ -caroteno, 1g de vitamina E e 2 g de vitamina C por dia, pelo mesmo período. Na segunda fase receberam apenas vitamina E por 5 meses. Os resultados mostraram que, na fase 1, ocorreu aumentos das concentrações de  $\alpha$ -tocoferol da LDL em 2,5 vezes. Além disso, ocorreu diminuição (30-40%) da suscetibilidade da LDL à oxidação. Na fase 2, a suscetibilidade à oxidação das LDL foi diminuída em aproximadamente 50%. Outro estudo confirmou estes dados da literatura (DAVI et al.,1997) mostrando que a suplementação com  $\alpha$ -tocoferol em humanos num período de 2 semanas, atenuou 35% da excreção urinária de F2-isoprostanos em indivíduos com hipercolesterolemia e diabetes, de forma dose-dependente (100-600 mg/dia).

Com relação à SD existem igualmente dados consistentes na literatura sobre a ocorrência do EO (PALLARDÓ et al., 2006; CAMPOS et al., 2010; CAMPOS et al., 2011; GARLET et al., 2013, KOMATSU et al., 2013). Porém não foram encontrados, até o presente momento, estudos de intervenção com antioxidantes em humanos, especialmente crianças, os quais analisaram, detalhadamente, os níveis de distintos marcadores de EO.

Interessantemente, após a interrupção da suplementação, ocorreu manutenção ou persistência da capacidade antioxidante sistêmica dos indivíduos com SD. As defesas antioxidante não enzimáticas GSH e vitamina E mantiveram valores semelhantes aos do período de suplementação, enquanto que no conteúdo de AU ocorreu aumento significativo. Isso indica a ação antioxidante do AU (SIMÃO et al., 2008) nesses indivíduos, pois, mesmo após a interrupção da suplementação, houve restauração das concentrações de AU nos pacientes SD. Essa persistência na capacidade antioxidante já fora evidenciada em outros trabalhos de nosso grupo de pesquisa, em que, após um intervalo (também de 6 meses) sem suplementação, pacientes chagásicos (BUDNI, 2011) mantiveram valores de EO intermediários, não retornando aos níveis iniciais.

Com relação às enzimas antioxidantes, após a retirada da suplementação, a maioria delas (SOD, CAT, GR,e GGT) mantiveram os valores do período de suplementação, assim como a MPO (marcador inflamatório e de liberação de HOCl) e os níveis de transferrina séricos.

A GPx manteve níveis intermediários, enquanto que a GST aumentou, porém se igualando aos níveis dos controles. Apesar disso, os níveis de peroxidação lipídica (TBARS) e PC foram restaurados. A atividade da G6PD permaneceu inalterada em todos os grupos analisados, o que sugere provável ausência de sua participação direta no processo antioxidante nesses indivíduos.

Portanto, de maneira geral, houve uma persistência na capacidade antioxidante sistêmica dos indivíduos SD examinados, mesmo após o período de 6 meses de interrupção da terapia, confirmando o efeito prolongado da terapia antioxidante. Esta atenuação persistente do EO sistêmico provavelmente pode ser atribuída ao efeito cumulativo associado à lipofilicidade do  $\alpha$ -tocoferol, o qual é pouco solúvel em meio aquoso, penetrando nos tecidos lipídicos ou migrando através do corpo para domínios hidrofóbicos (WANG; QUINN, 1999)

Neste sentido, a eficácia da suplementação antioxidante incidente sobre a depleção de marcadores de EO e seus efeitos deletérios associados, bem como no *status* antioxidante dos indivíduos suplementados, já fora verificada em estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa. Em pacientes com cardiopatia chagásica crônica (MAÇAO et al., 2007; RIBEIRO et al., 2010; BUDNI et al. 2013), e pacientes com hepatite C (FARIAS et al., 2012), foi igualmente constatada uma significativa melhora nas defesas antioxidantes presentes no sangue dos pacientes chagásicos, além de uma diminuição dos marcadores enzimáticos de EO, após 6 meses de suplementação com as vitaminas C e E, confirmando a eficácia desta intervenção.

Adicionalmente, nos pacientes chagásicos, mesmo após a interrupção da intervenção antioxidante durante períodos de 12 meses, foi constatada uma relativa persistência do efeito antioxidante, antes de uma nova suplementação (BUDNI, 2011), resultados estes que corroboram os dados deste presente trabalho, após a interrupção da suplementação. Ainda no mesmo projeto com os pacientes chagásicos, foi verificado um efeito antioxidante do uso do carvedilol quando associado às vitaminas C e E, mostrando não apenas a importância do uso destas vitaminas isoladamente, como também associada ao tratamento da cardiopatia chagásica crônica (BUDNI et al., 2013). É importante ressaltar que esta intervenção antioxidante promoveu melhora clínica em pacientes chagásicos na fase I (inicial) da doença (BARBOSA et al. 2014).

Outros estudos realizados por nosso grupo de pesquisa mostrou a eficiência da terapia em humanos que apresentam a condição de EO

instalada devido à exposição a ambientes alterados (contaminação ocupacional). Wilhelm Filho e colaboradores (2010) mostraram que, após instalada a condição de EO em trabalhadores expostos à incineração de resíduos de saúde e também em trabalhadores de minas de carvão, foi igualmente realizada suplementação antioxidante com vitaminas E e C por 6 meses (protocolo semelhante ao utilizado neste trabalho). De modo análogo, foi verificada queda da atividade das enzimas antioxidantes, assim como nos marcadores de dano, sugerindo, igualmente, a eficácia da terapia combinada destas duas vitaminas antioxidantes, salientando o provável efeito sinérgico entre ambas (VAN HAAFTEN et al., 2003), aspecto geralmente negligenciado em estudos congêneres. Um trabalho semelhante foi realizado pelo mesmo grupo, porém desta vez foi testada a terapia antioxidante em trabalhadores e residentes próximos a uma termoeletrica do sul do estado de Santa Catarina, expostos à combustão de carvão mineral, e, da mesma maneira, após a suplementação antioxidante, ocorreu normalização de quase todos marcadores de EO (TBARS, PC, GSH, SOD, GP<sub>x</sub>, GR e GST) (POSSAMAI et al., 2010).

A partir de um amplo levantamento de dados congêneres pode-se levantar questões relevantes que devem ser consideradas na resposta desses estudos contraditórios. Apesar de dados bioquímicos, celulares e moleculares acerca do  $\alpha$ -tocoferol terem sido acumulados consiste e drasticamente nos últimos anos, muitos fenômenos a ele associados ainda estão longe de ser totalmente elucidados. Vários estudos de intervenção clínica não consideram importantes fatores, como, por exemplo, os polimorfismos da vitamina E. Muitos desses estudos condenam o uso da terapia antioxidante, mas não levam em consideração os níveis basais de tocoferol no plasma dos pacientes antes e após a suplementação, ou ainda que os efeitos pró-oxidantes da vitamina E possam ser protegidos pelo ácido ascórbico (RICCIARELLI et al., 2007).

Além disso, normalmente os estudos não levam em consideração a existência de proteínas de ligação do  $\alpha$ -tocoferol, ou ainda, as complexidades de absorção do  $\alpha$ -tocoferol e seu metabolismo, os quais constituem outras variáveis envolvendo a problemática da utilização “*in vivo*” da vitamina E. Adicionalmente, os aspectos clínicos também merecem ser debatidos: é bem possível que em alguns estudos tenha sido escolhida a fase adiantada (irreversível) da doença a ser avaliada, pois a idade não é o único fator a se levar em consideração

neste particular. Estudos mostram que a determinação da fase da doença é muito importante, e que o tratamento com vitamina E deveria ser iniciado de forma precoce, além de ser consumido conjuntamente à vitamina C, para que seu efeito torne-se efetivo e mensurável. Ainda, é possível que novas reações e novos genes sejam encontrados sob controle do  $\alpha$ -tocoferol, permitindo esclarecer as relações entre eventos moleculares e clínicos (RICCIARELLI et al., 2001; RICCIARELLI et al., 2007).

Apesar da polêmica e discussão sobre os benefícios da suplementação de vitaminas antioxidantes para o tratamento de várias doenças crônicas, sugerimos através dos resultados do presente trabalho, que a terapia antioxidante com vitaminas C e E, que não tem efeitos adversos nas doses aqui utilizadas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007), poderia trazer benefícios clínicos para crianças e adolescentes com SD. Adicionalmente, caso adotada precocemente (ainda durante o desenvolvimento fetal, ou logo após o nascimento), poderia promover, provavelmente, melhora da função cognitiva, de acordo com o efeito encontrado em um modelo murino (LOCKROW et al., 2009), ou, pelo menos, atenuar as condições neurodegenerativas nesses pacientes. Neste sentido, mais estudos são necessários para esclarecer os possíveis benefícios, especialmente os neurológicos, de tal suplementação.

### 3.5 CONCLUSÃO

A intervenção antioxidante diária com as vitaminas E e C atenuou consistentemente o EO sistêmico que estão acometidas as crianças e adolescentes com SD. Além disso, o efeito da intervenção antioxidante persistiu após a interrupção da suplementação antioxidante. Porém, esta intervenção não foi capaz de alterar significativamente todos os marcadores inflamatórios.





## **4. CAPÍTULO 2: EFEITO DA MELATONINA (MEL) SOBRE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO (EO) E NEUROGÊNESE EM UM MODELO ANIMAL DE SÍNDROME DE DOWN.**

### **4.1 OBJETIVOS**

#### **4.1.1 Objetivo Geral**

Estudar a atividade da melatonina (MEL) em modelos bioquímicos e histológicos, a fim de investigar o efeito no estresse oxidativo e neurogênese em um modelo animal de SD.

#### **4.1.2 Objetivos Específicos**

- ✓ Avaliar os biomarcadores enzimáticos de EO (SOD, CAT, GPx, GR) em córtex e hipocampo de camundongos TS jovens e adultos, a fim de verificar o possível mecanismo de ação da MEL, assim como sua capacidade de modulação da atividade das enzimas antioxidantes.
- ✓ Avaliar os marcadores de dano oxidativo (TBARS e PC) em córtex e hipocampo de camundongos TS jovens e adultos, a fim de verificar o possível mecanismo de ação da MEL, assim como sua ação sobre o EO.
- ✓ Estudar os efeitos da MEL sobre a neurogênese de animais TS jovens (em adultos são dados já publicados pelo grupo de pesquisa da UC, CORRALES et al., 2014) através de técnicas de imunohistoquímica para marcadores de neurogênese (DAPI e imunohistoquímica para Ki-67).



## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Animais

Foram utilizados camundongos trissômicos parciais machos Ts65Dn (TS) criados no biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Cantábria (UC), a partir de uma população feminina TS reprodutoras proporcionadas pelo *Robertsonian Chromosome Resources* (The Jackson Laboratory, Harbor Bar, Maine, USA).

Em todos os experimentos foram comparados camundongos TS com seus irmãos dissômicos (CO) das mesmas ninhadas. Os animais foram genotipados com 6-8 semanas de idade mediante PCR em tempo real, utilizando o protocolo de Liu e colaboradores (2003), o qual segue os seguintes procedimentos:

1) Extração: em microtúbulos, contendo uma amostra de cauda de camundongo, foi adicionado 300  $\mu$ L de NaOH 50mM e incubadas a 99° C a seco durante 1 hora (com homogeneização em vórtex aos 30 min e 60 min). Após este período, a extração foi neutralizada com 30  $\mu$ L de tampão Tris-HCl 1M, pH 7,6 e realizada homogeneização em vórtex, seguida de centrifugação por 10 min a 13.000 rpm, a 4° C. O sobrenadante foi utilizado para medir a concentração de DNA (em 260 nm);

2) Diluição: a amostra foi diluída à 20 ng/ $\mu$ L em água milique para a realização do PCR.

3) Reação em cadeia de polimerase (PCR): Como marcadores, foram utilizados os genes codificantes para a proteína App e de resistência a Mixovírus 1 (Mx1), os quais estão localizados no cromossoma MMU16 e portanto, encontram-se triplicados. Como gene de referência, foi utilizado o gene da apolipoproteína B (ApoB) que está localizado no cromossoma MMU12, e portanto, presente em dose dupla em todos os animais. A amplificação do DNA genômico dos animais foi realizada utilizando os primers e sondas (tipo TaqMan) descritos no Quadro 4.

Para a quantificação simultânea do número de cópias dos genes, foram utilizados fluorocromos com comprimentos de ondas diferentes: HEX para o gene ApoB e FAM para App e Mx1. Para isso, foi utilizado

o seguinte protocolo: foram adicionadas em placas de 96 poços 8  $\mu\text{L}$  da amostra diluída a 20  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  da TaqMan, 0,2  $\mu\text{L}$  de cada primer de cada gene (40  $\mu\text{M}$ ) e 0,6  $\mu\text{L}$  de cada uma das sondas (5  $\mu\text{M}$ ) e depois iniciadas as reações em termociclador Mx3000P. As condições de amplificação foram as seguintes: um ciclo de 50°C durante 2 min, depois um ciclo a 95°C de 10 min, seguido de 40 ciclos a 95° durante 15 min e por último, 60°C por 1 min.

Os resultados obtidos foram analisados pelo método  $\Delta\Delta\text{Ct}$ , o qual representa a expressão gênica relativa de cada um dos genes App e Mx1, normalizados com ApoB.

**Quadro 4-** Primers e sondas utilizadas para realização do cariótipo dos animais do estudo.

	<b>App</b>	<b>Mx1</b>	<b>ApoB</b>
<b>Primer</b>	5'-TGC TGA AGA TGT	5'-TCT CCG ATT AAC CAG	5'-CAC GTG GGC TCC
<b>Sentido</b>	GGG TTC GA-3'	GCT AGC TAT-3'	AGC ATT-3'
<b>Primer</b>	5'-GAC AAT CAC GGT TGC	5'-GAC ATA AGG TTA GCA	5'-TCA CCA GTC ATT
<b>Anti-sentido</b>	TAT GAC AA-3''	GCT AAA GGA TCA-3'	TCT GCC TTT G-3'
<b>Sonda</b>	5'- <b>FAM</b> -CAA AGG CGC CAT CAT CGG ACT CATAMRA-3'	5'- <b>FAM</b> -CTT TCC TGG TCG CTG TGC A- TAMRA-3'	5'- <b>HEX</b> -CCA ATG GTC GGG CAC TGC TCA- ATAMRA-3'

#### **4.2.2. Tratamentos e amostras**

Grupos de animais trissômicos (TS) e controles/dissômicos (CO) foram tratados com melatonina (MEL) ou apenas com seu diluente (Veículo) formando 4 grupos experimentais: TS+Mel (n=12), CO+Mel (n=12), TS+Veículo (n=12) e CO+Veículo (n=12). A Melatonina (100 mg/L) foi dissolvida em álcool absoluto e adicionada à água de beber a uma concentração final de 0,06%, sendo que esta solução de MEL foi preparada em garrafas protegidas da luz duas vezes por semana.

A estimativa de ingestão diária de MEL para cada camundongo foi de 0,5 mg, com base numa taxa média diária de consumo de água de 5 mL/dia.

Inicialmente, os animais adultos foram tratados durante 16 semanas. Todos os camundongos tinham entre 5 e 5,5 meses de idade no início do tratamento e entre 10 e 10,5 meses de idade durante o experimento (CORRALES et al., 2013; CORRALES et al., 2014). No caso dos animais jovens entre 5 e 5,5 meses, o tratamento foi realizado nas mesmas concentrações e condições, porém realizado nas fêmeas prenhas, e após nascimento, os filhotes continuaram a receber o tratamento até a realização dos experimentos (5-5,5 meses), da mesma maneira que os adultos.

Foram utilizados 12 animais em cada grupo experimental, 6 animais foram utilizados para as avaliações bioquímicas e os outros 6 foram perfundidos para a avaliação imunohistoquímica do cérebro desses animais.

#### **4.2.3 Concentrações de melatonina**

Antes da realização dos experimentos, amostras de urina foram coletadas de cada camundongo, no final das 12 h de luz (dia) e também nos períodos escuros (noite). O conteúdo total do metabólito da melatonina, o sulfato de 6-hidroxi melatonina (aMLTs), foi avaliado em amostras de urina como uma medida indireta da secreção cíclica de melatonina pela glândula pineal. A concentração urinária de aMLTs foi determinada a partir de amostras duplicadas de urina utilizando kit de ensaio imunoenzimático (ELISA) (IBL International GMBH, Hamburg, Germany), com protocolo seguido de acordo com as instruções do fabricante.

## **4.2.4 Marcadores de Estresse Oxidativo**

### **4.2.4.1 Preparação da amostra**

Os animais selecionados para as análises bioquímicas foram eutanasiados por deslocamento cervical e retirados os cérebros, com posterior separação de córtex e hipocampo.

Para as medidas de estresse oxidativo (descritas na sequência), foi preparado homogenatos de córtex e hipocampo (1:30, peso:volume), em tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 7,4, 0,1% Triton X-100, 150 mM de NaCl (CAVALLI et al., 2013).

### **4.2.4.2 Enzimas antioxidantes**

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi medida em 480 nm de acordo com o método da auto-oxidação da adrenalina (MISRA; FRIDOVICH, 1972) e modificado por Boveris e colaboradores (1983). A catalase (CAT) foi determinada pela medição do consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 240 nm (AEBI, 1984). A glutathiona peroxidase (GPx) foi medida em 340 nm, através do sistema glutathiona/NADPH/glutathiona redutase, pela redução do terc-butilhidroperóxido (FLOHÉ; GUNZLER, 1984). A atividade da glutathiona redutase (GR) foi mensurada segundo método de Carlberg e Mannervick (1985), onde se verifica, em 340 nm, a taxa de oxidação do NADPH devido à redução da glutathiona oxidada (GSSG) pela GR presente na amostra. As atividades enzimáticas foram corrigidas com peso dos tecidos e expressas por g de tecido, exceto para PC, a qual foi expressa por mg de proteína. Todos os protocolos das enzimas antioxidantes também seguiram as etapas descritas no Capítulo 1, porém com volumes adaptados à microplaca.

### **4.2.4.3 Lipoperoxidação (TBARS)**

A lipoperoxidação foi medida nos homogenatos dos tecidos (córtex e hipocampo) espectrofotometricamente em 535 nm, pelo método das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) (BIRD; DRAPER, 1984), conforme protocolo descrito no Capítulo 1.

#### **4.2.4.4 Proteína carbonilada (PC)**

As concentrações de proteína carbonilada foram determinadas nos homogenatos de tecidos (córtex e hipocampo) segundo Levine e colaboradores (1990), conforme protocolo descrito no Capítulo 1.

#### **4.2.5 Estudo Neuromorfológico: Neurogênese**

##### **4.2.5.1 Preparação dos tecidos**

Os animais foram perfundidos por via intracardíaca primeiro com salina (0,95%) e depois com paraformaldeído (4%) em tampão fosfato (0,1 mol/L). Os cérebros foram mantidos em fixador durante 24 h e logo após, transferidos para sacarose 30%. Foram cortadas fatias de 50 µm de espessura de um bloco congelado com um micrótomo, sendo que para cada animal obteve-se 9 secções representativas do cérebro. Foram armazenados os cortes a -20°C em uma solução crioprotetora (25 % etilenoglicol, 25 % glicerina, 50% tampão fosfato salino (PBS)). Para cada um dos estudos foram utilizados cortes de pelo menos 6 animais por grupo.

##### **4.3.5.2 Coloração de Nissl e quantificação dos neurônios granulares do hipocampo**

Uma seção aleatória das 9 séries de cortes de cada animal para quantificação dos neurônios granulares foi corada com Nissl, de acordo com o seguinte protocolo: primeiramente, os cortes foram lavados em tampão fosfato (*phosphate buffer* - PB) 0,1N e posteriormente montados em lâminas gelatinizadas. Após montadas as lâminas, as mesmas foram secas (por 3 dias) e submersas em azul de toluidina 5% (10 min). Em seguida, foi retirado o excesso com água destilada. Posteriormente, as lâminas foram submersas em etanol 70% (2 min), seguido de etanol 96% (2 min) e etanol absoluto (2 min) e xileno (2 min). Após coradas, foi adicionado meio de montagem e cobertas com lamínulas. As lâminas (cortes) foram analisadas em microscópio (Zeiss Axioskop 2 plus, Carl Zeiss Microscopy, LLC, USA) à 4x, focando e registrando através de imagens a região do giro denteado localizada no hipocampo. As imagens foram analisadas através de quantificação da área do giro denteado e perímetro da camada subgranular do giro denteado (SGZ) (onde estão localizadas as células progenitoras de neurônios), segundo o método de Cavalieri, conforme descrito por Llorens-Martin e colaboradores (2006).



### 4.2.5.3 Imunohistoquímica para Ki-67 e DAPI

Os experimentos de imunohistoquímica e imunofluorescência foram realizados segundo protocolo descrito por Llorens Martín et al. (2006). Uma seção de cada série de 9 do cérebro de cada animal foi selecionada aleatoriamente e lavada 3 vezes de 5 min com PB 0,1N, e posteriormente permeabilizadas com PB-TBSA (PB 0,1N com Triton X-100 (0,5%) e BSA (0,1%)) por 5 min e submetida à incubação com os anticorpos primários (anti-Ki67 monoclonal de camundongo (Santa Cruz 1:750), e diluídas em PB-TBSA durante 48 h a 4°C. Em seguida, as seções foram incubadas durante 20 h com os anticorpos secundários (anti-camundongo de cabra conjugado com biotina (Pierce, 1:1000) durante 24 h à 4°C. Na sequência as seções foram lavadas 3 vezes com PB 0,1 N e incubadas com DAPI (1:1000, em PB 0,1N) durante 12 min. Após retirado o DAPI, as seções foram lavadas em PB 0,1N por 5 min e em seguida com etanol 70% por 5 min. Posteriormente, foi adicionado às seções 3 gotas de eliminador de autofluorescência (Autofluorescence eliminator reagente-ERA) por 5 min, lavados 3 vezes por 1 min em etanol 70% e finalmente lavados em PB 0,1. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e adicionado gerbatol entre lâmina e lamínula. A contagem das células Ki-67 positivas na camada subgranular do hipocampo foram realizadas em microscópio de fluorescência e o resultado corrigido de acordo com o perímetro da camada subgradular obtina na coloração de Nissl. Os resultados foram expressos em células Ki-67/mm<sup>2</sup> e células DAPI/μm<sup>3</sup>.

### 4.2.6 Análise Estatística

A análise estatística empregada foi RM MANOVAs (genótipo x tratamento), admitindo um nível de significância mínimo de  $p < 0,05$ . O emprego do teste *t* de Student foi usado comparando os grupos. Para todas as análises foi utilizado o SPSS (version 22.0, Chicago, IL, USA) para Windows.



### 4.3 RESULTADOS

O conteúdo urinário de aMLTs não se mostrou alterado quando comparado o genótipo dos animais analisados (Controles × Trissômicos). Porém, em relação ao tratamento (Veículo × Melatonina), houve aumento significativo de aMLTs nos grupos que receberam o tratamento com MEL (Tabela 1).

**Tabela 1-** Conteúdo de aMLTs na urina dos diferentes grupos tratados com Veículo e Melatonina, no período noturno e diurno.

	TRATAMENTO				ESTATÍSTICA		
	VEÍCULO		MELATONINA		MANOVA F <sub>(1,21)</sub>		
Concentração de aMLTs	CO	TS	CO	TS	Genótipo (GEN)	Tratamento (TTO)	GEN x TTO
<b>ng/12 h (dia)</b>	0.11 ± 0.02	0.09 ± 0.01	100.21** ± 26.55	70.39** ± 16.97	0.82, p=0.37	<b>30.79, p&lt;0.001</b>	0.82, p=0.37
<b>ng/12 h (noite)</b>	0.11 ± 0.01	0.15 ± 0.02	142.57*** ± 9.7	163.60** ± 4.09	<b>6.57, p=0.019</b>	<b>910.09, p&lt;0.001</b>	<b>6.53, p=0.019</b>

(CO) Controle; TS (Trissômico); (GEN) Genótipo; (TTO) Tratamento. (\*\*)(\*\*\*) representa a diferença estatística com p<0,01 e p<0,001, respectivamente, de Veículo x Melatonina.

A atividade da SOD mostrou-se aumentada no córtex e no hipocampo de camundongos TS durante a fase pré e pós-natal. (Figura 18A), assim como em adultos (Figura 18B). Entretanto, a administração de MEL durante a vida adulta não diminuiu a atividade da SOD nesta região do cérebro. O tratamento pré e pós-natal não modificou a atividade desta enzima no hipocampo, porém os seus níveis foram normalizados no córtex dos camundongos TS.

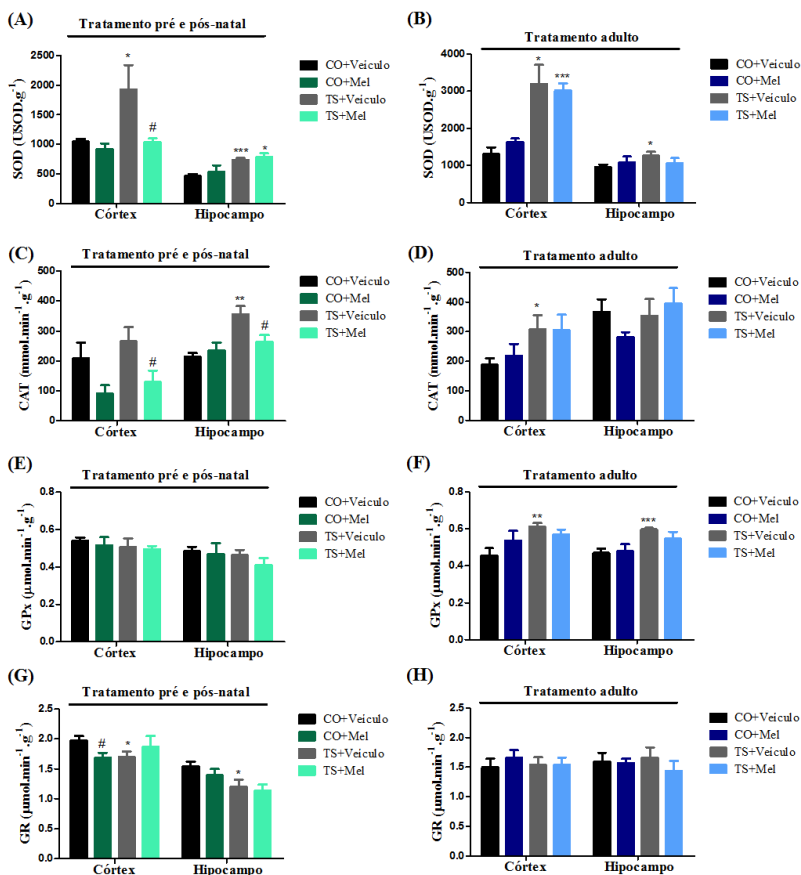
A atividade da CAT apresentou-se aumentada no hipocampo de animais TS jovens (Figura 18C) e no córtex dos camundongos TS adultos (Figura 18D). No entanto, o tratamento pré e pós-natal com a MEL diminuiu a atividade da CAT no córtex e hipocampo dos animais TS (Figura 18C). Entretanto, a atividade da CAT não se alterou após o tratamento crônico com MEL durante a vida adulta (Figura 18D).

Com relação à atividade da GPx no córtex e hipocampo de animais jovens, os quatro grupos de animais não diferiram em seus valores (Figura 18E). No entanto, os animais TS adultos apresentaram aumentos da atividade da GPx, em ambas as estruturas do cérebro (Figura 18F). O tratamento com a MEL em qualquer fase da vida não produziu efeito significativo sobre a atividade desta enzima.

A atividade da GR no córtex e hipocampo não mostrou diferenças entre os quatro grupos de animais tratados com veículo e MEL durante a vida adulta (Figura 18H). No entanto, naqueles animais TS tratados com veículo nas fases pré e pós-natal, a atividade da GR mostrou-se diminuída no córtex e no hipocampo, enquanto que a administração de MEL, nos estágios precoces não aumentou a sua atividade (Figura 18G).

Na maioria dos grupos, os níveis de TBARS não mostrou diferença estatística no córtex e hipocampo de camundongos TS tratados com MEL durante as fases pré e pós natais (Figura 19A). No entanto, o tratamento com este antioxidante diminuiu a peroxidação lipídica apenas no hipocampo dos animais durante a fase adulta (Figura 19B).

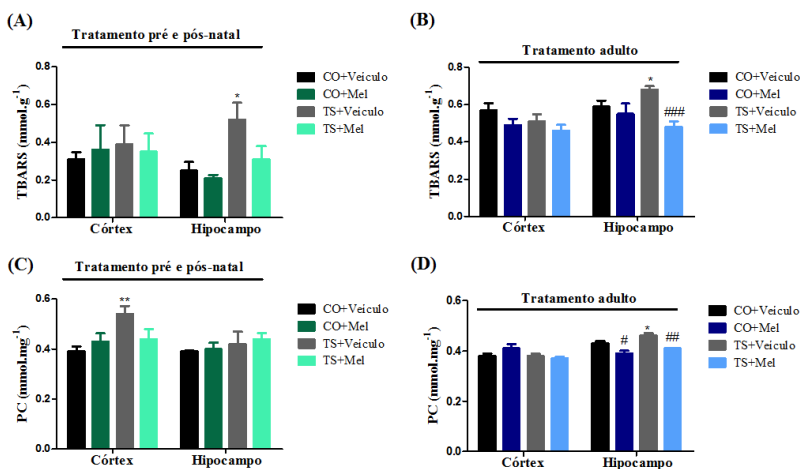
**Figura 18-** Defesas antioxidantes enzimáticas no córtex e hipocampo de animais jovens e adultos.



Atividade da superóxido dismutase (SOD), (A), (B); catalase (CAT), (C) e (D); glutatona peroxidase (GPx), (E) e (F); e glutatona redutase (GR), (G) e (H), no homogenato de Córtex e Hipocampo, de animais jovens e adultos, respectivamente, dos diferentes grupos experimentais. (CO+Veículo) Grupo controle tratado com veículo (n=6); (CO+Mel). Grupo controles tratado com melatonina (n=6); (TS+Veículo) Grupo de trissômicos tratados com veículo (n=6); (TS+Mel) Grupo de trissômicos tratados com melatonina (n=6); Valores expressos em Média±EP. (\*)(\*\*)(\*\*\*) representa a diferença estatística com  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente, de Trissômicos x Controle. (#) representa a diferença estatística com  $p < 0,05$ , do tratamento Veículo x Controle.

Observou-se um aumento significativo no nível de PC no córtex de animais TS jovens (Figura 19C) e no hipocampo dos animais TS adultos (Figura 19D). Administração de MEL de forma contínua diminuiu significativamente os valores de PC encontradas no hipocampo dos camundongos CO e TS adultos (Figura 19D). No entanto, a administração deste composto durante as fases de pré e pós-natal não alterou os níveis de PC nesta estrutura nos mesmos animais (Figura 19B).

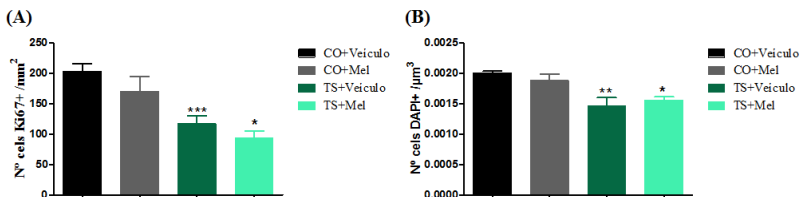
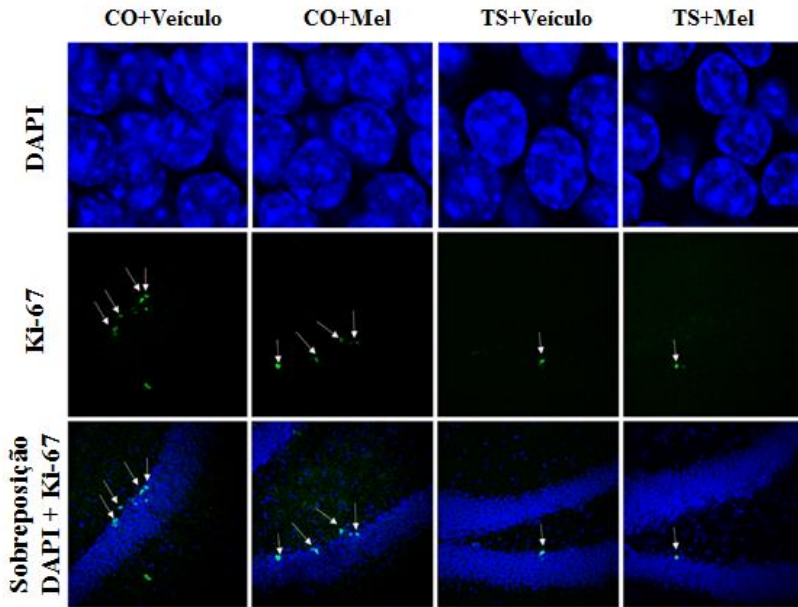
**Figura 19-** Marcadores de dano oxidativo no córtex e hipocampo de animais jovens e adultos.



(A), (B) Conteúdo de TBARS do homogenato de córtex e hipocampo dos diferentes grupos experimentais, de animais jovens e adultos, respectivamente. (C), (D) Conteúdo de proteína carbonilada (PC) do homogenato de córtex e hipocampo dos diferentes grupos experimentais, de animais jovens e adultos, respectivamente. (CO+Veículo) Grupo controle tratado com veículo (n=6); (CO+Mel). Grupo controles tratado com melatonina (n=6); (TS+Veículo) Grupo de trissômicos tratados com veículo (n=6); (TS+Mel) Grupo de trissômicos tratados com melatonina (n=6); Valores expressos em Média±EP. (\*) (\*\*) representa a diferença estatística com  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente, de Trissômicos x Controle. (#) (##) (###) representa a diferença estatística com  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente, do tratamento Veículo x Controle.

A densidade de células Ki-67+ (na camada subgranular do giro denteado) e DAPI+ (no giro denteado) mostrou-se diminuída nos animais TS (tratados com veículo e/ou melatonina), comparativamente aos controles (Figura 20A e Figura 20B, respectivamente). No entanto, a análise estatística mostrou que o tratamento com MEL não foi capaz de modificar a densidade de células Ki-67+ e DAPI+ em ambos os genótipos.

**Figura 20-** Imunohistoquímica para Ki-67 e Imunofluorescência para DAPI em animais TS jovens.



**(A)** Quantidade de células Ki-67 positivas na camada subgranular do hipocampo de animais jovens dos diferentes grupos analisados. **(B)** Quantidade de células DAPI positivas no giro denteado no hipocampo de animais jovens dos diferentes grupos analisados. (CO+Veículo) Grupo controle tratado com veículo (n=6); (CO+Mel). Grupo controles tratado com melatonina (n=6); (TS+Veículo) Grupo de trissômicos tratados com veículo (n=6); (TS+Mel) Grupo de trissômicos tratados com melatonina (n=6); Valores expressos em Média±EP. (\*)(\*\*)(\*\*\*) representa a diferença estatística com  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente, de Trissômicos x Controle.



## 4.4 DISCUSSÃO

Atualmente, as propriedades citoprotetoras tornaram-se um importante campo de pesquisa, dentre as quais se destaca o uso da MEL. As ações relevantes desta substância têm sido estudadas em vários órgãos, em particular, as ações neuroprotetoras.

A MEL possui capacidade antioxidante por ser um metoxiindol, a qual é um potente varredor de numerosas EROs, particularmente o HO<sup>•</sup>, extremamente reativo, carcinogênico e mutagênico (TAN et al., 1993). Além disso, uma única molécula de MEL pode gerar produtos de uma cascata sequestrante que pode eliminar de forma coletiva até dez RL (ROSEN et al., 2006). Nesse ponto torna-se interessante a terapia antioxidante com MEL, pois em concentrações fisiológicas, do ponto de vista estequiométrico, os níveis podem ser presumidamente insuficientes para uma contribuição significativa para a detoxificação de RL (HARDELAND et al., 2011).

Adicionalmente, as ações antioxidantes da MEL não se restringe apenas ao “*scavenger*” de RL, apesar dela interagir eficientemente com várias EROs e ERN, bem como radicais orgânicos. Entre suas ações, estudos mostram a regulação negativa de enzimas antioxidantes, como GPx, GR, GGT e G6PD, às vezes SOD e CAT, e regulação negativa de enzimas pró-oxidantes (NO sintase e lipoxigenases) (HARDELAND; PANDI-PERUMAL; CARDINALI, 2006).

De forma geral, os diferentes marcadores enzimáticos de EO mostraram aumento do EO no cérebro (córtex e/ou hipocampo) nos animais TS jovens e adultos, quando comparados com os controles. Novamente, a SOD, assim como no estudo com crianças e adolescentes com SD (Capítulo 1), está com a atividade de aproximadamente 50% maior em animais TS (Figura 18A, 18B). As atividades da CAT (Figura 18C, 18D) e da GPx (Figura 18E, 18F) não acompanharam o mesmo percentual de aumento da atividade da SOD, ou nem mesmo aumentou (CAT no hipocampo de animais adultos e GPx de córtex e hipocampo de animais jovens). Esse aumento da atividade da CAT e GPx novamente decorreria da tentativa de eliminação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido em excesso, devido à atividade da SOD muito elevada, decorrente da trissomia. Já a atividade da GR, apresentou diminuição nos animais TS

jovens em comparação com os controles (Figura 18G) e não ocorreu alteração de sua atividade nos animais adultos (Figura 18H). Esta diminuição da atividade sugere uma diminuição da reposição de GSH no sistema, diminuindo assim, a capacidade antioxidante do tecido, uma vez que a GSH é o principal antioxidante não-enzimático endógeno de organismos aeróbios, como descrito anteriormente.

Resultados anteriores do grupo espanhol de pesquisa mostraram que a MEL foi capaz de melhorar o perfil comportamental dos animais TS adultos (CORRALES et al., 2013). Esse fato pode estar relacionado ao EO que poderia acometer esses animais. Apesar que de maneira geral, a MEL não foi capaz de modular a atividade das principais enzimas antioxidantes no hipocampo dos animais, pois a atividade da SOD, GPx e GR não foi alterada, já a atividade da CAT diminuiu apenas em animais TS jovens. Uma justificativa no caso da atividade GR estar inalterada, poderia ser devido à ação da MEL retirando EROs do sistema, poupando GSH e, assim, a atividade da GR preservada.

Um antioxidante pode exercer sua atividade sem interferir na atividade enzimática. Os antioxidantes agem em três linhas de defesa orgânica contra as EROs. A primeira linha, é a de prevenção, a qual se caracteriza pela proteção contra a formação das substâncias agressoras. A segunda linha é a interceptação, e neste estágio, os antioxidantes precisam interceptar os RL, os quais, uma vez formados, iniciam suas atividades deletérias. A última linha é o reparo. Ela ocorre quando a prevenção e a interceptação não foram completamente efetivas e os produtos da ação pelos RL estão sendo continuamente formados em baixas quantidades e, desta forma, podem se acumular no organismo (SANTOS; CRUZ, 2001).

A provável ação da MEL seria a retirada de RL e/ou reparo de estruturas danificadas. Este fato pode ser observado nos níveis de TBARS analisados no hipocampo de animais jovens e adultos. Em jovens não houve mudança dos níveis de TBARS analisados (Figura 19A), enquanto que em adultos houve uma diminuição significativa (Figura 19B).

No córtex, não houve mudanças nos níveis de lipoperoxidação, tanto em jovens quanto em adultos (Figura 19A, Figura 19B), porém no grupo de animais jovens, ocorreu diminuição da atividade da SOD e CAT em animais TS. Apesar de existir estudos que relatam modulação

dessas enzimas (RODRIGUEZ et al., 2004), nossos dados mostraram que em animais jovens não existe efeito de proteção no córtex (níveis de TBARS inalterados), assim como no hipocampo, o que resultaria em nenhuma melhora de cognição.

Trabalhos documentando a influência da MEL sobre a atividade das enzimas antioxidantes mostraram amplificação da atividade da SOD e GPx no cérebro de ratos e em outros tecidos, como o fígado (OZTURK et al., 2000; RODRIGUEZ et al., 2004). A MEL também tem a capacidade de influenciar a expressão do gene de enzimas antioxidantes. Antolin e colaboradores (1996) verificaram aumento da expressão de mRNA para SOD na glândula de Harder em um modelo murino após administração exógena de 500 µg/kg de MEL. Já em um estudo recente, realizado por Demirtas e colaboradores (2015), a MEL diminuiu a atividade da SOD e não alterou a atividade da CAT em um modelo de síndrome metabólica induzida por EO. Não foram encontrados estudos relacionando atividade da GR com a MEL.

O efeito de proteção antioxidante na MEL ficou claramente mostrado no hipocampo dos animais TS adultos tratados com MEL, no qual ocorreu diminuição dos níveis de PC nesta região desses animais (Figura 19D). Apesar de não ter ocorrido mudança no conteúdo de PC nos animais em tratameto pré e pós-natal (Figura 19C), no córtex dos animais TS tratados com MEL, houve apenas uma tendência em diminuir as concentrações de PC, porém sem diferença estatística.

Não foram encontrados estudos avaliando o efeito da administração de MEL no EO em pacientes ou animais com SD, exceto um estudo do grupo de pesquisa espanhol, em que Corrales e colaboradores (2014), verificou diminuição de 4-hidroxinonal, um produto de peroxidação lipídica, no hipocampo de animais TS adultos, além de melhora comportamental nesses animais.

Na maioria dos modelos experimentais conhecidos, a MEL mostrou capacidade antioxidante sobre processos degenerativos crônicos relacionados com dano oxidativo, como: prevenção da lesão oxidativa mitocondrial causada pela proteína β-amilóide, diminuição da peroxidação lipídicas do córtex e diencéfalo, fígado, pulmão, íleo e rim de ratos (TERESA GALVÁN et al., 2008). Além disso, Kumar e colaboradores (2002) verificaram que a MEL promoveu aumento da capacidade antioxidante total e diminuição da peroxidação lipídica em

um modelo de EO promovido pelo exercício intenso. A capacidade de “scavenging” de RL da MEL é o dobro da vitamina E, e além disso, a MEL é particularmente interessante em termos neuronais pois atravessa livremente a barreira hematoencefálica (PIERI et al., 1994; CHEN et al., 2012).

Segundo os resultados do grupo de pesquisa espanhol (CORRALES et al., 2014), a MEL foi capaz de aumentar a quantidade de células positivas para os imunomarcadores de neurogênese doublecortina e Ki-67 no cérebro de camundongos Ts65Dn adultos. Uma justificativa para que o tratamento pré e pós-natal (jovens) com MEL não tenha modificado os marcadores de neurogênese analisados, seria o processo de dano oxidativo nas etapas iniciais da vida ainda não terem sido causado, e que, com a idade, o processo de EO tenha causado efeito de cronicidade, apenas se verificando mudanças em etapas adultas.

Rennie e colaboradores (2009) verificaram que a suplementação com MEL aumentou significativamente o número de neurônios imunorreativos para doublecortina no giro denteado, proteína expressa em neurônios recém-nascidos, após pinealectomia. Ramírez-Rodríguez e colaboradores (2012) verificaram que a MEL exógena promoveu a sobrevivência de novas células no giro denteado (> 50%) após 3,6 e 9 meses de tratamento. Além disso, a MEL aumentou o número de células marcadas com doublecortina após 6 e 9 meses de tratamento (> 150%), o que indicaria que a MEL também modula o processo neurogênico no hipocampo durante o envelhecimento normal em ratos.

Por fim, são necessários estudos mais detalhados para melhor avaliar os efeitos da MEL na SD e provavelmente sobre o envelhecimento, podendo assim elucidar melhor o papel dessa substância frente aos processos bioquímicos e comportamentais da SD, bem como seu possível efeito anti-envelhecimento proposto.

## 4.5. CONCLUSÃO

- ✓ A administração de MEL durante as fases pré e pós-natal diminuiu a peroxidação lipídica no hipocampo dos animais TS, assim como diminuiu a atividade da SOD e CAT no córtex desses animais. No entanto, o tratamento não diminuiu as concentrações elevadas de PC no córtex. Além disso, a MEL administrada durante as fases pré e pós-natais não aumentou a atividade da GR nos animais TS jovens, que por sua vez, poderia afetar o sistema antioxidante glutatona durante este período.
- ✓ Os efeitos de melhoria cognitiva da MEL descritas por Corrales e colaboradores (2014), em animais TS, poderiam ser devido à sua propriedade antioxidante, apesar de que no cérebro dos animais TS adultos, a MEL não parece ter efeitos benéficos pela regulação da atividade das enzimas antioxidantes. Os efeitos de aumento cognitivo poderia ser devido à sua ação como um captador de RL, pois o tratamento com este composto durante a vida adulta atenuou o dano oxidativo (TBARS e PC) no hipocampo dos animais TS.
- ✓ A administração de MEL durante as fases pré e pós-natal não modificou os marcadores de neurogênese analisados.



## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ Apesar da polêmica discussão sobre os benefícios da intervenção antioxidante para o tratamento de várias doenças crônicas, propomos que a terapia antioxidante com vitaminas C e E, pode trazer benefícios clínicos para crianças com SD, ou pelo menos atenuar as condições neurodegenerativas associadas nesses pacientes. No entanto, mais estudos são necessários para esclarecer os possíveis benefícios neurológicos de tal suplementação.
- ✓ Além disso, outros antioxidantes, como por exemplo a melatonina, poderiam enriquecer o arsenal de tal intervenção antioxidante, promovendo melhoria na qualidade de vida desses pacientes.





## 6. PERSPECTIVAS

- ✓ Ampliação do presente estudo com um número maior de indivíduos e com várias faixas etárias;
- ✓ A partir dos resultados de GSH (depleção) que se encontram em andamento, implementar a terapia com NAC durante o mesmo período (6 meses);
- ✓ Determinar outros biomarcadores de dano lipídico mais sensíveis e específicos para determinação, como MDA por HPLC ou fluorescência;
- ✓ Avaliação adicional de dano proteico, como por exemplo, determinação de diTirosina (diTyr), bem como avaliação de dano ao DNA, através da 8-OHdG.
- ✓ Usar a técnica de FRAP, importante indicador genérico de EO, quando associado aos demais parâmetros analisados.
- ✓ Implementar a terapia antioxidante associando a vitamina C e/ou E com melatonina;
- ✓ Apesar das evidências recentes relacionadas com o grupo de pesquisa da UFSC voltado para a suplementação antioxidante em diferentes patologias (MAÇAO et al., 2007; FARIAS et al., 2012; BUDNI et al., 2013), onde claramente fica demonstrado o benefício de seu uso, são ainda necessários mais estudos bioquímicos e clínicos acerca da suplementação antioxidante e suas implicações.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*, v. 204, p. 234-254, 1984.

AGUILAR-DA-SILVA, R. H.; MORAES, T. P.; MORAES, G. Implicações do estresse oxidativo sobre o metabolismo eritrocitário de pessoas com Síndrome de Down. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 25, n. 4, p. 231-223, 2003.

ALFADDA, A.A.; SALLAM, R.M. Reactive oxygen species in health and disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2012, p. 1-14, 2012.

ANI, C.; GRANTHAM-McGREGOR, S.; MULLER, D. Nutritional supplementation in Down syndrome: theoretical considerations and current status. *Developmental Medicine and Child Neurology*, v. 42, p. 207-213, 2000.

ANTOLÍN, I.; RODRÍGUEZ, C.; SAÍNZ, R.M.; MAYO, J.C.; URÍA, H.; KOTLER, M.L.; RODRÍGUEZ-COLUNGA, M.J.; TOLIVIA D.; MENÉNDEZ-PELÁEZ, A. Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB Journal*, v. 10, p. 882-890, 1996.

ANTONARAKIS, S.E. 10 years of genomics, chromosome 21, and Down syndrome. *Genomics*, v. 51, n. 1, p. 1-16, 1998.

ANTONARAKIS, E.E.; LYLE, R.; DERMITZAKIS, E.T.; REYMOND, A.; DEUTSCH, S. Chromosome 21 and Down Syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nature Reviews. Genetics*, v. 5, 725-738, 2004.

ARESE, P.; GALLO, V.; PANTALEO, A.; TURRINI, F. Life and death of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficient erythrocytes - role of redox stress and band 3 modifications. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, v. 39, n. 5, p. 328-334, 2012.

ARTHUR, JR. The glutathione peroxidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 57, n. 13-14, p. 1825-1835, 2000.

BARBOSA, J.L.; THIERS, C.A.; PEREIRA, B.B.; NASCIMENTO, E.M.; BUDNI, P.; RIBEIRO, C. M. ; PEDROSA, R. C. ; WILHELM-FILHO, D. Impact of the use of benznidazole followed by antioxidant supplementation in the prevalence of ventricular arrhythmias in patients with chronic Chagas' disease: pilot study. *American Journal of Therapeutics*, 2014.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Revista de Nutrição*, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARINI, R.; STELLA, J.H.; RIBEIRO, S.T.; BOTCHERLUIZ, F.; ISFER, E.V.; SANCHEZ, R.C.; FAÚNDES, A.; SILVA, J.L.P. Performance of prenatal ultrasound in the diagnosis of fetal chromosomal abnormalities in a tertiary center. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 24, n. 2, p. 121-127, 2002.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 17, n. 1, p. 113-123, 2006.

BARTESAGHI, R.; GUIDI, S.; CIANI, E. Is it possible to improve neurodevelopmental abnormalities in Down syndrome? *Reviews in the Neurosciences*, v. 22, p. 419-455, 2011.

BERK, M.; MALHI, G.S.; GRAY, L.J. The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 34, n. 3, p. 167-177, 2013.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. *The Journal of Laboratory Clinical Medicine*, v. 61, p. 882-890, 1963.

BIRD, R.P.; DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. *Methods in Enzymology*, v. 90, p.105-110, 1984.

BOVERIS, A.; FRAGA, C.G.; VARSAVSKY, A.I.; KOCH, O.R. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 227, n. 2, p. 534-541, 1983.

BRASIL, 2012. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. [http://conselho.saude.gov.br/ultimas\\_noticias/2012/21\\_mar\\_sindromeD own.html](http://conselho.saude.gov.br/ultimas_noticias/2012/21_mar_sindromeD own.html).

BRUWIER, A.; CHANTRAIN, C.F. Hematological disorders and leukemia in children with Down syndrome. *European Journal of Pediatrics*, v. 171, n. 9, p. 1301-1307, 2012.

BUDNI, P. Efeito do carvedilol e monitoramento e de terapias antioxidantes ao longo de 7 anos em pacientes cardiopatas chagásicos crônicos. 214 fl. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2011.

BUDNI, P.; PEDROSA, R.C.; DALMARCO, E.M.; DALMARCO, J.B.; FRÖDE, T.S.; WILHELM FILHO, D. O carvedilol potencializa o efeito antioxidante das vitaminas E e C na cardiopatia chagásica crônica. *Revista Brasileira de Cardiologia*, v. 101, n. 4, p. 304-310, 2013.

CACHIA, O.; BENNA, J.E.; PEDRUZZI, E.; DESCOMPS, B.; GOUGEROT-POCIDALO, M.A.; LEGER, C.L.  $\alpha$ -Tocopherol inhibits the respiratory burst in human monocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 49, 32801–32805, 1998.

CALABRESE, V.; LODI, R.; TONON, C.; D'AGATA, V.; SAPIENZA, M.; SCAPAGNINI, G.; MANGIAMELI, A.; PENNISI, G.; STELLA, A.M.; BUTTERFIELD, D.A. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 233, n. 1-2, p. 145-162, 2005.

CALBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase from rat liver. *Methods in Enzymology*, v. 113, p. 484-490, 1985.

CAMPOS, C.; GUZMÁN, R.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, E.; CASADO, A. Evaluation of urinary biomarkers of oxidative/nitrosative stress in children with Down syndrome. *Life Sciences*, v. 89, p. 655-661, 2011.

CAMPOS, C.; GUZMÁN, R.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, E.; CASADO, A. Urinary uric acid and antioxidante capacity in children and adults with Down syndrome. *Clinical Biochemistry*, v. 43, p. 228-233, 2010.

CANTUTI-CASTEL, I.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J.A. Neurobehavioral aspects of antioxidants in aging. *International Journal of Developmental Neurosciences*, v. 18, 367–381, 2000.

CARVALHO, M.H.B. Rastreamento combinado aumenta a sensibilidade para a detecção de cromossomopatias.. <http://www.fleury.com.br/medicos/medicina-e-saude/artigos/Pages/rastreamento-combinado-aumenta-a-sensibilidade-para-a-deteccao-de-cromossomopatias.aspx>. Acesso em: 11/11/2013.

CAVALLI, V.L.L.O. Alterações bioquímicas induzidas pelo herbicida glifosato-Roundup sobre células testiculares de ratos pré-púberes. 2013. 165 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2013.

CHAN, A.C.; CHOW, C.K.; CHIU, D. Interation of antioxidants and their implication in genetic anemia. *Experimental Biology and Medicine*, v. 222, n. 3, 274-282, 1999.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiology Review*, v. 59, p. 527-602, 1979.

CHEN, Y.C.; SHEEN, J.M.; TAIN, Y.; CHEN, C.C.; TIAO, M.M.; HUANG, Y.H.; HESIEH, C.S.; HUANG, L.T. Alterations in NADPH oxidase expression and blood-brain barrier in bile duct ligation-treated young rats: effects of melatonin. *Neurochemistry International*, v. 60, p. 751-758, 2012.

CHOI, H.; VAN RIPER, M.; THOYRE, S. Decision making following a prenatal diagnosis of Down syndrome: an integrative review. *Journal of Midwifery & Womens Health*, v. 57, n. 2, 156-64, 2012.

CHURCHILL, S.S.; KIECKHEFER, G.M.; LANDIS, C.A.; WARD, T.M. Sleep measurement and monitoring in children with Down syndrome: a review of the literature, 1960-2010. *Sleep Medicine Reviews*, v. 16, n. 5, p. 477-488, 2012.

COROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, v. 51, p. 15-23, 2013.

CORRALES, A.; VIDAL, R.; GARCÍA, S.; VIDAL, V.; MARTÍNEZ, P.; GARCÍA, E.; MARTÍNEZ-CUÉ, C.; RUEDA, N. Chronic melatonin treatment rescues electrophysiological and neuromorphological deficits in a mouse model of Down syndrome. *Journal of Pineal Research*, v. 56, n. 1, p. 51-61, 2014.

CORRALES, A.; MARTÍNEZ, P.; GARCÍA, S.; VIDAL, V.; GARCÍA, E.; FLÓREZ, J.; SANCHEZ-BARCELÓ, E.J.; MARTÍNEZ-CUÉ, C.; RUEDA N. Long-term oral administration of melatonin improves spatial learning and memory and protects against cholinergic degeneration in middle-aged Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. *Journal of Pineal Research*, v. 54, n. 3, p. 346-58, 2013.

CORTI, A.; CASINI, A.F.; POMPELLA, A. Cellular pathways for transport and efflux of ascorbate and dehydroascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 500, p. 107-115, 2010.

CSALANI, A.S.; DRAPER, H.H., SHAH, S.N. Conversion of d-alpha-tocopherol-C14 to 1302 tocopheryl-p-quinone in vivo. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 98, p. 142-145, 1962.

DAS, T.K.; MANI, V.; DE, S.; BANERJEE, D.; MUKHERJEE, A.; POLLEY, S.; KEWALRAMANI, N.; KAUR, H. Effect of vitamin E supplementation on mRNA expression of superoxide dismutase and interleukin-2 in arsenic exposed goat leukocytes. *Bulletin of*

*Environmental Contamination and Toxicology*, v. 89, n. 6, p. 1133-1137, 2012.

DAVI, G.; ALESSANDRINI, P.; MEZZETTI, A.; MINOTTI, G.; BUCCIARELLI, T.; COSTANTINI, F.; CIPOLLONE, F.; BOM, G.B.; CIABATTONI, G., PATRONO, C. In vivo formation of 8-Epi-prostaglandin F2 alpha is increased in hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, v. 17, n. 11, 3230-3235, 1997.

DEMIRTAS, C.Y.; PASAOGLU, O.T.; BIRCAN, F.S.; KANTAR, S.; TURKOZKAN, N. The investigation of melatonin effect on liver antioxidant and oxidant levels in fructose-mediated metabolic syndrome model. *European Review Medical and Pharmacological Sciences*, v. 19, n. 10, p. 1915-1921, 2015.

DESAI, S.S.; FAYETTEVILLE, N.Y. Down Syndrome: A review of the literature. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, v. 84, p. 279-285, 1997.

DIEBER-ROTHENEDER, M.; PUHL, H.; WAEG, G.; STRIEGL, G.; ESTERBAUER, H. Effect of oral supplementation with D-alpha-tocopherol on the vitamin E content of human low density lipoproteins and resistance to oxidation. *The Journal of Lipid Research*, v. 32, n. 8, 1325-1332, 1991.

DOMAZOU, A.S.; ZHU, H.; KOPPENOL, W.H. Fast repair of protein radicals by urate. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 52, n. 9, 1929-1936.

DROZDZ, R.; PARMENTIER, C.; HACHAD, H.; LEROY, P.; SIEST, G.; WELLMAN, M. Gamma-Glutamyltransferase dependent generation of reactive oxygen species from a glutathione/transferrin system. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 25; n.7, p. 786-792, 1998.

DU, J.; CULLEN, J.; BUETTNER, G. Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1286, n. 2, p. 443-457, 2012.



EBUEHI, O.A.; OGEDEGBE, R.A.; EBUEHI, O.M. Oral administration of vitamin C and vitamin E ameliorates lead-induced hepatotoxicity and oxidative stress in the rat brain. *Nigerian Quarterly Journal of Hospital Medicine*, v. 22, n. 2, p. 85-90, 2012.

ESPINO, J.; PARIENTE, J.A.; RODRIGUEZ, A.B. Oxidative stress and immunosenescence: therapeutic effects of melatonin. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, p. 1-9, 2012.

FARIAS, M.S.; BUDNI, P.; RIBEIRO, C.M.; PARISOTTO, E.B.; SANTOS, C.E.; DIAS, J.F.; DALMARCO, E.M.; FRÖDE, T.S.; PEDROSA, R.C.; WILHELM FILHO, D. Antioxidant supplementation attenuates oxidative stress in chronic hepatitis C patients. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v. 35, n. 6, 386-394, 2012.

FEDERICO, A.; CARDAIOLI, E.; DA POZZO, P.; FORMICHI, P.; GALLUS, G.N.; RADI, E. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *The Journal of Neurological Sciences*, v. 322, n. 1-2, 254-262, 2012.

FIRUZI, O.; MIRI, R.; TAVAKKOLI, M.; SASO, L. Antioxidant therapy: current status and future prospects. *Current Medicinal Chemistry*, v. 18, n.25, p. 3871-3888, 2011.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, v. 105, p. 114-121, 1984.

FREEMAN, B.A.; CRAPO, J.D. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation*, v. 47, p. 412-426, 1982.

FRIDMAN, C.; GREGÓRIO, S.P.; NETO, E.D.; OJOPI, E.P. Alterações genéticas na doença de Alzheimer. *Revista de Psiquiatria Clínica*, v. 31, p. 119-125, 2004.

FRIDOVICH, I. Superoxide and evolution. *Horizons in Biochemistry and Biophysics*, v. 56, p. 1-37, 1974.

FROSALI, S.; DI SIMPLICIO, P.; PERRONE, S.; DI GIUSEPPE, D.; LONGINI, M.; TANGANELLI, D.; BUONOCORE, G. Glutathione

recycling and antioxidant enzyme activities in erythrocytes of term and preterm newborns at birth. *Biology of the Neonate*, v. 85, n. 3, p. 188-194, 2004.

GARCEZ, M. E.; PERES, W.; SALVADOR, M. Oxidative Stress and Hematologic and Biochemical Parameters in Individuals with Down syndrome. *Mayo Clinical Proceedings*, v. 80, n. 12, p.1607–1611, 2005.

GARLET, T.R.; PARISOTTO, E.B.; DE MEDEIROS, G.D.; PEREIRA, L.C.; MOREIRA, E.A.; DALMARCO, E.M.; DALMARCO, J.B.; WILHELM FILHO, D. Systemic oxidative stress in children and teenagers with Down syndrome. *Life Sciences*, v.16, n. 16, p. 558-563, 2013.

GERSCHMAN, R.; GILBERT, D. L.; NYE, S. W.; DWYER, P.; FENN, W. O. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science*, v. 119, 623–626, 1954.

GIARETTA, A. G. Família, Pessoa com Síndrome de Down & Nutricionista: resignificando o ato de comer. 236fl. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, Florianópolis, 2007.

GOLESTANI, A.; RASTEGAR, R.; SHARIFTABRIZI, A.; KHAGHANI, S.; PAYABVASH, S.M.; SALMASI, A.H.; DEHPUR, A.R.; PASALAR, P. Paradoxical dose-and time-dependent regulation of superoxide dismutase and antioxidant capacity by vitamin E in rat. *Clinica Chimica Acta*, v. 365, n. 1-2, 2005.

GRIFFIN, W.S.; STANLEY, L.C.; LING, C.; WHITE, L.; MACLEOD, V.; PERROT, L.J.; WHITE, C.L.; ARAOZ, C. Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 86, p. 7611–7615, 1989.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JACOBY, W.B. Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 249, 7130-7139, 1976.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. ed. 4. Oxford: Clarendon Press, 2007.

HANSSON, M.; OLSSON, I.; NAUSEEF, W.M. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 445, p. 214-224, 2006.

HARDELAND, R.; CARDINALI, D.P.; SRINIVASAN, V.; SPENCE, D.W.; BROWN, G.M.; PANDI-PERUMAL, S.R. Melatonin - a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Progress in Neurobiology*, v. 93, n. 3, 350-384, 2011.

HARDELAND, R.; PANDI-PERUMAL, S.R.; CARDINALI, D.P. Melatonin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 38, n. 3, p. 313-6, 2006.

HARVEY, J.W. The erythrocyte: physiology, metabolism, and biochemical disorders. In: KANEKO, J.J. et al. Clinical biochemistry of domestic animals. San Diego: Academic Press, 1997. Cap.7, p. 157-203.

HASSOLD, T.; CHIU, D. Maternal age specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Human Genetics*, v. 70, p.11-17, 1985.

HIGDON, A.; DIERS, A.R.; OH, J.Y.; LANDAR, A.; DARLEY-USMAR, V.M. Cell signalling by reactive lipid species: new concepts and molecular mechanisms. *Biochemical Journal*, v. 442, n. 3, 453-464, 2012.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; FATIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

IMAI, H.; NAKAGAWA, Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 34, n. 2, 2003.

IMAYOSHI, I.; SAKAMOTO, M.; OHTSUKA, T.; TAKAO, K.; MIYAKAWA, T.; YAMAGUCHI, M.; MORI, K.; IKEDA, T.; ITOHARA, S.; KAGEYAMA, R. Roles of continuous neurogenesis in

the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nature Neuroscience*, v. 11, 1153-1161, 2008.

JANÁKY, R.; DOHOVICS, R.; SARANSAARI, P.; OJA, S.S. Modulation of [<sup>3</sup>H]dopamine release by glutathione in mouse striatal slices. *Neurochemical Research*, v. 32, n. 8, 1357-1364, 2007.

JOVANOVIĆ, S.V.; CLEMENTS, D.; MACLEOD, K. Biomarkers of oxidative stress are significantly elevated in Down syndrome. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 25, n. 9, p. 1044-1048, 1998.

KAND'AR, R.; ZÁKOVÁ, P.; MUZÁKOVÁ, V. Monitoring of antioxidant properties of uric acid in humans for a consideration measuring of levels of allantoin in plasma by liquid chromatography. *Clinica Chimica Acta*, v. 365, n. 1-2, p. 249-56, 2006

KANDRATAVICIUS, L.; MONTEIRO, M.R.; ROMCY-PEREIRA, R.N.; ARISI, G.M.; CAIRASCO, N.G.; JOÃO PEREIRA LEITE, J.P. Neurogênese no cérebro adulto e na condição epiléptica. *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*, v. 13, n. 3, 119-123, 2007.

KAPPUS, H.; DIPLOCK, A.T. Tolerance and safety of vitamin E: A toxicological position report. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 13, p. 55-74, 1992.

KEE, N.; SIVALINGAM, S.; BOONSTRA, R.; WOJTOWICZ, J.M. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *Journal of Neurosciences Methods*, v. 115, n. 1, p. 97-105, 2002.

KESSLAK, J.P.; NAGATA, S.F.; LOTT, I.; NALCIOUGLU, O. Magnetic resonance imaging analysis of age-related changes in the brains of individuals with Down's syndrome. *Neurology*, v. 44. p. 1039-1045, 1994.

KOMATSU, T.; DUCKYOUNG, Y.; ITO, A.; KUROSAWA, K.; MAEHATA, Y.; KUBODERA, T.; IKEDA, M.; LEE, M.C. Increased oxidative stress biomarkers in the saliva of Down syndrome patients. *Archives of Oral Biology*, v. 58, n. 9, p. 1246-1250, 2013.

KRASUSKI, J.S.; ALEXANDER, G.E.; HORWITZ, B.; RAPOPORT, S.I.; SCHAPIRO, M.B. Relation of medial temporal lobe volumes to age and memory function in nondemented adults with Down's syndrome: implications for the prodromal phase of Alzheimer's disease. *The American Journal of Psychiatry*, v. 159, p. 74-81, 2002.

KUMAR, K.V.; NAIDU, M.U.R. Effect of oral melatonin on exercise-induced oxidant stress in healthy subjects. *Indian Journal of Pharmacology*, v. 34, p. 256-259, 2002.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R. N. *Robbins - Patologia básica*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

LANA-EOLA, E.; WATSON-SCALES, S.D.; FISHER, E.M.C.; TYBULEWICZ, V.L.J. Down syndrome: searching for the genetic culprits. *Disease Models & Mechanisms*, v. 4, p. 586-595, 2011.

LEE, D.H.; BLOMHOFF, R.; JACOBS-JR, D.R. Is serum gamma glutamyltransferase a marker of oxidative stress? *Free Radical Research*, v. 38, n. 6, p. 535-539, 2004.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. *Lehninger principles of biochemistry*.5. ed. New York: W. H. Freeman, 2008. p. 1119.

LEVINE, R.L.; GARLAND, D.; OLIVER, C.N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A.G.; AHN, B.W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, v.186. p. 464-478, 1990.

LIM, J.S.; YANG, J.H.; CHUN, B.Y.; KAM, S.; JACOBS-JR, D.R., LEE, D.H. Is serum  $\gamma$  glutamyltransferase inversely associated with serum antioxidants as a marker of oxidative stress? *Free Radical Biology and Medicine*, v. 37, n. 7, 1018-1023, 2004.

LIPINSKI, B. Hydroxyl Radical and its Scavengers in health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v.11, p. 1-9, 2011.

LIU, D.P.; SCHMIDT, C.; BILLINGS, T.; DAVISSON, M.T. A quantitative PCR genotyping assay for the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Biotechniques*, v. 35, 1170-1174, 2003.

LLORENS-MARTÍN, M.; TORRES-ALEMÁN, I.; TREJO, J.L. Pronounced individual variation in the response to the stimulatory action of exercise on immature hippocampal neurons. *Hippocampus*, v. 16, p. 480-490, 2006.

LOBO, V.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals and functional foods: impact on human health. *Pharmacognosy Review*, v. 4, n. 8, p. 118-126, 2010.

LOCKROW, J.; PRAKASAM, A.; HUANG, P.; BIMONTE-NELSON, H.; SAMBAMURTI, K.; GRANHOLM, A.C. Cholinergic degeneration and memory loss delayed by vitamin E in a Down syndrome mouse model. *Experimental Neurology*, v. 216, n. 2, p. 278-289, 2009.

LOCKROW, J.P.; FORTRESS, A.M.; GRANHOLM, A.E. Age-Related Neurodegeneration and Memory Loss in Down Syndrome. *Current Gerontology and Geriatrics Research*, v. 2012, p. 1-13, 2012.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v.193. p. 265-275, 1951.

MAÇAO, L.B.; WILHEL FILHO, D.; PEDROSA, R.C.; PEREIRA, A.; BACKES, P.; TORRES, M.A.; FRÖDE, T.S. Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas' disease. *International Journal of Cardiology*, v.123, n. 1, p. 43-49, 2007.

MALBERG, J.E.; EISCH, A.J.; NESTLER, E.J.; DUMAN, R.S. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, v. 20, 9104-9110, 2000.

MALLE, E.; FURTMÜLLER, P.G.; SATTLER, W.; OBINGER, C. Myeloperoxidase: a target for new drug development? *British Journal of Pharmacology*, v. 152, n. 6, p.838-854, 2007.

MANJULA, K.R.; SUBRAMANYAM, M.V.; ASHA-DEVI, S. Protection against oxidative stress caused by intermittent cold exposure by combined supplementation with vitamin e and C in the aging rat hypothalamus. *Neurochemical Research*, v. 38, n. 4, p. 876-885, 2013.

MARNETT, L.J. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research*, v. 424, n. 1-2, p.83-95, 1999.

MARQUES, R. C.; MARREIRO, D.N. Aspectos metabólicos e funcionais do zinco na Síndrome de Down. *Vernáculo de Nutrição de Campinas*, v. 19. n. 4. p. 501-510, 2006.

MATOS, S.B.; SANTOS, L.C.; PEREIRA, C.S.; BORGES, K.S. Down Syndrome: Advances and perspectives. *Revista Saúde e Comunidades*, v. 3, n. 2, 2007.

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

MEGARBANE, A.; RAVEL, A.; MIRCHER, C.; STURTZ, F.; GRATTAU, Y.; RETHORÉ, M.O.; DELABAR, J.M.; MOBLEY, W.C. The 50th anniversary of the discovery of trisomy 21: The past, present, and future of research and treatment of Down syndrome. *Genetics in Medicine*, v. 11, n. 9, 611– 616, 2009.

MEGUID, N.A.; DARDIR, A.A.; EL-SAYED, E.M.; AHMED, H.H.; HASHISH, A.F.; EZZAT, A. Homocysteine and oxidative stress in Egyptian children with Down syndrome. *Clinical Biochemistry*, v. 43, n. 12, p. 963-967, 2010.

MENENDEZ, M. Down Syndrome, Alzheimer's disease and seizures. *Brain Development*, v. 27, p. 246-252, 2005.

MISRA, H.P.; FRIDOVICH. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 247, n. 10, p. 188-192, 1972.

MUCHOVÁ, J.; ŽITŇANOVÁ, I.; ĎURAČKOVÁ, Z. Oxidative stress and Down syndrome. Do antioxidants play a role in therapy? *Physiological Research*, v. 63, n. 5, p. 535-42, 2014.

MUKAIDA, N.; HISHINUMA, A.; ZACHARIAE, C.O.; OPPENHEIM, J.J.; MATSUSHIMA, K. Regulation of human interleukin 8 gene expression and binding of several other members of the intercrine family to receptors for interleukin-8. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 305, p. 31-38, 1991.

NACHVAK, M.; NEYESTANI, T. R.; MAHBOOB, S.A.; SABOUR, S. A.; KESHAWARZ, S.A.; SPEAKMAN, J.R.  $\alpha$ -Tocopherol supplementation reduces biomarkers of oxidative stress in children with Down syndrome: a randomized controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 68, n. 10, p. 1119-1123, 2014.

NATHENS, A.B.; NEFF, M.J.; JURKOVICH, G.J.; KLOTZ, P.; FARVER, K.; RUZINSKI, J.T.; RADELLA, F.; GARCIA, I.; MAIER, R.V. Randomized, prospective trial of antioxidant supplementation in critically ill surgical patients. *Annals of Surgery*, v. 236, n. 6, p. 814-822, 2002.

NESS, S.; RAFII, M.; AISEN, P.; KRAMS, M.; SILVERMAN, W.; MANJI, H. Down's syndrome and Alzheimer's disease: towards secondary prevention. *Nature reviews. Drug Discovery*, v. 11, n. 9, p. 655-656, 2012.

NETO, J.A.S.; CASTRO, B.F. Melatonina, ritmos biológicos e sono – uma revisão da literatura. *Revista Brasileira de Neurologia*, v. 44, n. 1, p. 5-11, 2008.

NICOLETTI, G.; CRESCIBENE, L.; SCORNAIENCHI, M.; BASTONE, L.; BAGALÀ, A.; NAPOLI, I.D.; CARACCILO, M.; QUATTRONE, A. Plasma levels of vitamin E in Parkinson's disease. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, v. 33, n. 1, p. 7-12, 2001.

NIETO, F. J.; IRIBARREN, C.; GROSS, M. D.; COMSTOCK, G. W.; CUTLER, R. G.; *Atherosclerosis*, v. 148, n. 1, p. 131-139, 2000.



NIKI, E.; TRABER, M.G. A history of vitamin E. *Annals of Nutrition and Metabolism*, v. 61, n. 3, p. 207-212, 2012.

ONUR, S., NIKLOWITZ, P., JACOBS, G., NÖTHLINGS, U., LIEB, W., MENKE, T., DÖRING, F. Ubiquinol reduces gamma glutamyltransferase as a marker of oxidative stress in humans. *BMC Research Notes*, v. 7, n. 427, 1-9, 2014.

ORDONEZ, F.J.; ROSETY, I.; ROSETY, M.A.; CAMACHO-MOLINA, A.; FORNIELES, G.; ROSETY, M.; ROSETY-RODRIGUEZ, M. Aerobic training at moderate intensity reduced protein oxidation in adolescents with Down syndrome. *Scandinavian Journal of Medicine and Science Sports*, v. 22, p. 91-94, 2012.

OZTURK, G.; COSKIN, S.; ERBAS, D.; HASANOGLU, E. The effect of melatonin on liver superoxide dismutase activity, serum nitrate and thyroid hormone levels. *The Japanese Journal of Physiology*, v. 50, p. 149–153 2000.

PALLARDÓ, F.V.; DEGAN, P.; D'ISCHIA, M.; KELLY, F.J.; ZATTERALE, A.; CALZONE, R.; CASTELLO, G.; FERNANDEZ-DELGADO, R.; DUNSTER, C.; LLORET, A.; MANINI, P.; PISANTI, M.A.; VUTTARIELLO, E.; PAGANO, G. Multiple evidence for an early age pro-oxidant state in Down syndrome patients. *Biogerontology*, v. 7, n. 4, p. 211-220, 2006.

PAPAYANNOPOULOS, V.; ZYCHLINSKY, A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends in Immunology*, v. 30, n. 11, p. 513-21, 2009.

PASTOR, M.C.; SIERRA, C.; DOLADÉ, M.; NAVARRO, E.; BRANDI, N.; CABRÉ, E.; MIRA, A.; SERÉS, A. Antioxidant enzyme and fatty acid status in erythrocytes of Down syndrome patients. *Clinical Chemistry*, v. 44, n. 5, p. 924-929, 1998.

PAUL, M.V. ABHILASH, M.; VARGHESE, M.V.; ALEX, M.; NAIR, R.H. Protective effects of  $\alpha$ -tocopherol against oxidative stress related to nephrotoxicity by monosodium glutamate in rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*, v. 22, n. 8, p. 625-630, 2012.

PAVARIN-BERTELLI, E.C.; BISELLI, J.M.; RUIZ, M.T.; GOLONI-BERTOLLO, E.M. Recentes avanços moleculares e aspectos genético-clínicos em síndrome de Down. *Revista Brasileira de Medicina*, v. 62, n. 9, p. 401-408, 2005.

PIERI, C.; MARRA, M.; MORONI, F.; RECCHIONI, R.; MARCHESELLI, F. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sciences*, v. 55, p. 271–276, 1994.

PIPES, P. L.; HOLM, V.A. Feeding Children with Down's syndrome. *Journal of the American Dietary Association*, v. 77, p. 277-282, 1980.

POSSAMAI, F.P.; JÚNIOR, S.Á.; PARISOTTO, E.B.; MORATELLI, A.M.; INÁCIO, D.B.; GARLET, T.R.; DAL-PIZZOL, F.; WILHELM-FILHO, D. Antioxidant intervention compensates oxidative stress in blood of subjects exposed to emissions from a coal electric-power plant in South Brazil. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 20, n. 2, p. 175-180, 2010.

PUESCHEL, S.M. A historical view point. In: Pueschel SM, ed. Down syndrome growing and learning. (Human potentials for children series). Kansas City: Canning, Murphy, Zaumer, Andrews and McMeel, Inc. 1981. p. 37-9.

RAMÍREZ-RODRÍGUEZ, G.; VEGA-RIVERA, N.M.; BENÍTEZ-KING, G.; CASTRO-GARCÍA, M.; ORTÍZ-LÓPEZ, L. Melatonin supplementation delays the decline of adult hippocampal neurogenesis during normal aging of mice. *Neuroscience Letters*, 14; v. 530, n. 1, 53-8, 2012.

RAO, T.S.; CURRIE, J.L.; SHAFFER, A.F.; ISAKSON, P.C. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA) - and tetradecanoylphorbol acetate (TPA) - induced dermal inflammation. *Inflammation*, v. 17, n. 6, p. 723-741, 1993.

REAVEN, P.D.; KHOUW, A.; BELTZ, W.F.; PARTHASARATHY, S.; WITZTUM, J.L. Effect of dietary antioxidant combinations in humans. Protection of LDL by vitamin E but not by beta-carotene. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, v. 13, n. 4, p. 590-600, 1993.

REGÉZI, SCIUBBA, editors. Philadelphia: W.B. Saunders Co: 1989. p. 450-451.

RENNIE, K.; DE BUTTE, M.; PAPPAS, B.A. Melatonin promotes neurogenesis in dentate gyrus in the pinealectomized rat. *Journal of Pineal Research*, v. 47, n. 4, 313-317, 2009.

RIBEIRO, C.M.; BUDNI, P.; PEDROSA, R.C.; FARIAS, M.S.; PARISOTTO, E.B.; DALMARCO E.M.; FRÖDE, T.S.; OLIVEIRA-SILVA, D., COLEPICOLO, P., WILHELM FILHO, D. Antioxidant therapy attenuates oxidative insult caused by benzonidazole in chronic Chagas' heart disease. *International Journal of Cardiology*, v. 145. p. 27-33, 2010.

RICCIARELLI, R.; ARGELLATI, F.; PRONZATO M.A.; DOMENICOTTI, C. Vitamin E and neurodegenerative diseases. *Molecular Aspects Medicine*, v. 28, n. 5-6, p. 591-606, 2007.

RICCIARELLI, R.; ZINGG, J.M.; AZZI, A. Vitamin E: protective role of a Janus molecule. *FASEB Journal*, v. 15, n. 13, p. 2314-2325, 2001.

RODRIGUES, C.; MAYO, J.C.; SAINZ, R.M.; ANTOLÍN, I.; HERRERA, F.; MARTÍN, V.; REITER, R.J. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal of Pineal Research*, v. 36, n. 1, p. 1-9, 2004.

RODRIGUEZ, C.; MAYO, J.C.; SAINZ, R.M.; ANTOLÍN, I.; HERRERA, F.; MARTÍN, V.; REITER, R.J. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal of Pineal Research*, v. 36, n. 1, p. 1-9, 2004.

ROEBUCK, K.A. Regulation of interleukin-8 gene expression. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, v. 19, n. 5, p. 429-438, 1999.

ROSEN, J.; THAN, N.N.; KOCH, D.; POEGGELER, B.; LAATSCH, H.; HARDELAND, R. Interactions of melatonin and its metabolites with the ABTS cation radical: extension of the radical scavenger cascade and formation of a novel class of oxidation products, C2-

substituted 3-indolinones. *Journal of Pineal Research*, v. 41, p. 374–381, 2006.

RUBIN, Emanuel et al. Rubin patologia: bases clinicopatológicas da Medicina. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

RUEDA, N.; FLÓREZ, J.; MARTÍNEZ-CUÉ, C. Mouse models of Down syndrome as a tool to unravel the causes of mental disabilities. *NeuralPlasticity*, p. 1-26, 2012.

RUMSEY, S.C.; LEVINE, M. Absorption, transport, and distribution of ascorbic acid in humans. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 9, n. 3, p. 116-130, 1998.

SÁNCHEZ, G.M. Ambiente anti-oxidante/pro-oxidante – Su impacto medico, Ed.Aracne, Roma, 2012.

SANTOS, H. S.; CRUZ, W.M.S. A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 47. n. 3. p. 303-308, 2001.

SASTRE, J.; PALLARDÓ, F.V.; VIÑA J. Glutathione, oxidative stress and aging. *Age*, v. 19, p. 129–39, 1996.

SELLÉS, A.J.N. Antioxidant therapy, oxidative stress and antioxidant products: challenges and opportunities. *Revista Cubana de Salud Pública*, v. 37, p. 644-660, 2011.

SEN, C.K. Nutritional biochemistry of cellular glutathione. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.8, p. 660-672, 1997.

SHERMAN, S.L.; PETERSEN, M.B.; FREEMAN, S.B.; HERSEY, J.; PETTAY, D. TAFT, L.; FRANTZEN, M.; MIKKELSEN, M.; HASSOLD, T.J. Non-disjunction of chromosome 21 in maternal meiosis I: evidence for a maternal age dependent mechanism involving reduced recombination. *Human Molecular Genetics*, v. 2, p. 1529-1535, 1994.

SHERMAN, S.L.; TAKAESU, N.; FREEMAN, S.B.; GRANTHAM, M.; PHILLIPS, C.; BLACKSTON, R.D.; JACOBS, P.A.; COCKWELL,

A.E.; FREEMAN, V.; UCHIDA, MIKKELSEN, I.M.; KURNIT, D. M.; BURACZYNSKA, M.; KEATS, B. J. B.; HASSOLD, T. J. Trisomy 21: association between reduced recombination and nondisjunction. *The American Journal of Human Genetics*, v. 49, p. 608-620, 1991.

SHICHIRI, M.; YOSHIDA, Y.; ISHIDA, N.; HAGIHARA, Y.; IWAHASHI, H.; Tamai, H.; NIKI, E.  $\alpha$ -Tocopherol suppresses lipid peroxidation and behavioral and cognitive impairments in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 50, n. 12, p. 1801-1811, 2011.

SHORS, T.J.; MIESEGAES, G.; BEYLIN, A.; ZHAO, M.; RYDEL, T.; GOULD, E. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*, v. 410, 372-376, 2001.

SHORS, T.J.; TOWNSEND, D.A.; ZHAO, M.; KOZOROVITSKIY, Y.; GOULD, E. Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus*, v. 12, p. 578-84, 2002.

SIMÃO, A. N. C.; DICHI, J.B.; BARBOSA, D.S.; CECCHINI, R.; DICHI, M.D. Influence of uric acid and gamma-glutamyltransferase on total antioxidant capacity and oxidative stress in patients with metabolic syndrome. *Nutrition*, v. 24, n. 7-8, p. 675-681, 2008.

SMITH, W.B. Recognizable Pattern of Human Malformations. Fourth ed. Jones LK, ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 1988. p. 10-12.

SNUSTAD, D. Peter / Simmons, Michael J., 2001, Fundamentos da Genética.

SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nature Reviews. Immunology*, v. 10(6), p. 427-439, 2010.

SOUSA, M.C.; VIEIRA, R.B.; DOS SANTOS, D.S.; CARVALHO, C.A.; CAMARGO, S.E.; MANCINI, M.N.; DE OLIVEIRA, L.D. 2015. Antioxidants and biomarkers of oxidative damage in the saliva of patients with Down's syndrome. *Archives of Oral Biology*, v. 60, n. 4, p. 600-605, 2015.

SQUIRE, L.R.; STARK, C.E.; CLARK, R.E. The medial temporal lobe. *Annual Review of Neuroscience*, v. 27, p. 279-306, 2004.

STARK, A.A.; ZEIGER, E.; PAGANO, D. A. Glutathione metabolism by  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase leads to lipid peroxidation: characterization of the system and relevance to hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, v. 14, p. 183- 189, 1993.

STEGMAIER, J.C.; KIRCHHOFF, C.; BOGNER, V.; MATZ, M.; KANZ, K.G.; MUTSCHLER, W.; BIBERTHALER, P. Dynamics of neutrophilic NF-kB translocation in relation to IL-8 mRNA expression after major trauma. *Inflammation Research*, v. 57, n. 11, 547-554, 2008.

STUFFINS, C.B.; WEATHERALL, H. Determination of the peroxide value of oils and fats. *The Analyst*, v. 70, p. 403-9, 1945.

STURGEON, X.; GARDINER, K.J. Transcript catalogs of human chromosome 21 and orthologous chimpanzee and mouse regions. *Mammalian Genome*, v. 22, p. 261-71, 2011.

TAN, D.X; CHEN, L.D.; POEGGELER, B.; MANCHESTER, L.C.; REITER, R.J. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine Journal*, v. 1, 57-60, 1993.

TERESA GALVÁN, C.; BARRILAO, R.G.; GARCÍA, M.C.; OCHOA, J.; WILHELMI, J.O. Antioxidantes y ejercicio físico: funciones de la melatonina. La Revista Andaluza de Medicina del Deporte, v. 1, n. 2, p. 61-72, 2008.

THEN, S.M.; SANFELIU, C.; TOP, G.M.; WAN NGAH, W.Z.; MAZLAN, M.  $\gamma$ -Tocotrienol does not substantially protect DS neurons from hydrogen peroxide-induced oxidative injury. *Nutrition and Metabolism*, v. 9, n. 1 (online), 2012.

THOMPSON; THOMPSON. Genetics in Medicine, 6a ed. Philadelphia, WB Saunders Company, 2001.

TIANO, L.; PADELLA, L.; CARNEVALI, P.; GABRIELLI, O.; BRUGE, F.; PRINCIPI, F.; LITTARRU, G.P. 2008. Coenzyme Q10 and

oxidative imbalance in Down syndrome: biochemical and clinical aspects. *Biofactors*, v. 32, n. 1-4, p. 161-167, 2008.

TRABER, M.G.; ATKINSON, J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 43, n. 1, p. 4-15, 2007.

TRABER, M.G.; STEVENS, J.F. Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. *Radical Biology and Medicine*, v. 51, n. 5, p. 1000-13, 2011.

VAN HAAFTEN, RI.; HAENEN, G.R.; EVELO, C.T.; BAST, A. Effect of vitamin E on glutathione-dependent enzymes. *Drug Metabolism Reviews*, v. 35, n. 2, p. 215-53, 2003.

VAN HEMELRIJCK, M.; JASSEM, W.; WALLDIUS, G.; FENTIMAN, I.S.; HAMMAR, N.; LAMBE, M.; GARMO, H.; JUNGNER, I.; HOLMBERG, L. Gamma-glutamyltransferase and risk of cancer in a cohort of 545,460 persons – the Swedish AMORIS study. *European Journal of Cancer*, v. 47, p. 2033-2041, 2011.

VERMA, L.; MACDONALD, F.; LEEDHAM, P.; MCCONACHIE, M.; DHANJAL, S.; HULTÉN, M. Rapid and simple prenatal DNA diagnosis of Down's syndrome. *Lancet*, v. 4, n. 352, 9-12, 1998.

VERMA, I.C.; LALL, M.; PURI, R.D. Down Syndrome in India Diagnosis, Screening, and Prenatal Diagnosis. *Clinics in Laboratory Medicine*, v. 32, n. 2, 231-248, 2012.

VITALE, G.; SALVIOLI, S.; FRANCESCHI, C. Oxidative stress and the ageing endocrine system. *Nature reviews*, v. 9, p. 228-240, 2013

WANG, X.; QUINN, P.J. Vitamin E and its function in membranes. *Progress in the Lipid Research*, v. 38, n. 4, p. 309-336, 1999.

WANG, Y.; JIANG, Q.  $\gamma$ -Tocotrienol inhibits lipopolysaccharide-induced interleukin-6 and granulocyte colony-stimulating factor by suppressing C/EBP $\beta$  and NF- $\kappa$ B in macrophages. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 24, n. 6, p 1146-1152, 2012.

WENK, G.L.; MCGANN, K.; MENCARELLI, A.; HAUSS-WEGRZYNIAK, B.; DEL DOLDATO, P.; FIORUCCI, S. Mechanisms

to prevent the toxicity of chronic neuroinflammation on forebrain cholinergic neurons. *European Journal of Pharmacology*, v. 402, p. 77-85, 2000.

WHO, World Health Organization. Down syndrome. World Health Organization. Genes and human diseases: <http://www.who.int/genomics/public/geneticdiseases/en/print.html>. Acesso em: 07/07/12. Geneva, 2007.

WILCOCK, D.M.; GRIFFIN, W.S. Down's syndrome, neuroinflammation, and Alzheimer neuropathogenesis. *Journal of Neuroinflammation*, v. 10, n. 84, p. 1-10, 2013.

WILHELM FILHO, D.; AVILA JR, S.; POSSAMAI, F.P.; PARISOTTO, E.B.; MORATELLI, A.M.; GARLET, T.; INÁCIO, D.B.; TORRES, M.A.; COLEPICCOLO, P.; DAL-PIZZOL, F. Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in the blood of subjects exposed to occupational airborne contamination from coal mining extraction and incineration of hospital residues. *Ecotoxicology*, v. 19, n. 7, p. 1193-1200, 2010.

WILHELM FILHO, D.; MARCON, J.L.; FRAGA, C.G.; BOVERIS, A. Antioxidant defenses in vertebrates: emphasis on fish and mammals. *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 7, p. 33-45, 2000.

WILSON, M.D. Special considerations ... for the dental professional for patients with Down's syndrome. *Journal – Oklahoma Dental Association*. v. 84, n. 3, 24-26, 1994.

WINKLHOFER-ROOB, B.M.; ZIOUZENKOVA, O.; PUHL, H.; ELLEMUNTER, H.; GREINER, P.; MÜLLER, G.; VAN'THOFF, M.A.; ESTERBAUER, H.; SHMERLING, D.H. Impaired resistance to oxidation of low density lipoprotein in cystic fibrosis: improvement during vitamin E supplementation. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 19, n. 6, p. 725-733, 1995.

WU, G.; FANG, Y.Z.; YANG, S.; LUPTON, J.R.; TURNER, N.D. Glutathione metabolism and its implications for health. *The Journal of Nutrition*, v. 134, n. 3, 489-492, 2004.



XAVIER, A.C.; TAUB, J.W. Acute leukemia in children with Down syndrome. *Haematologica*, v 95, n. 7, p. 1043-1045, 2010.

ZITNANOVÁ, I.; KORYTÁR, P.; SOBOTOVÁ, H.; HORÁKOVÁ, L.; SUSTROVÁ, M.; PUESCHEL, S.; DURACKOVÁ, Z. Markers of oxidative stress in children with Down syndrome. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v. 44, n. 3, p. 306-10, 2006.



**ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO APROVADO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS (CEPSH-UFSC)**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

***PROJETO: AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO ANTES E APÓS SUPLEMENTAÇÃO ANTIOXIDANTE EM CRIANÇAS COM SÍNDROME DE DOWN.***

Responsáveis: Danilo Wilhelm Filho, residente na Rodovia SC 405, 435A, Fazenda Rio Tavares, Florianópolis. Telefone: 048-32374145.

Eduardo Benedetti Parisotto, residente no município de São José – SC, Rua José Victor da Rosa, 94, Condomínio San Rafael, Bloco D, Apto 204. Telefone 048 88027013

Estas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que tem como objetivo **avaliar o estresse oxidativo e monitoramento do *status* antioxidante antes e após suplementação com vitaminas C, E e NAQ em crianças com Síndrome de Down (SD).**

Esta pesquisa tem como principal benefício monitorar os níveis de marcadores de estresse oxidativo o que irá ajudar a esclarecer os danos causados pela elevada produção de espécies reativas de oxigênio em pacientes com SD. Assim, com estes resultados podemos avaliar os benefícios da suplementação antioxidante frente ao desenvolvimento cognitivo e outros prejuízos relacionados aos danos oxidativos.

Os pesquisadores, Danilo Wilhelm Filho e Eduardo Benedetti Parisotto farão avaliação cognitiva e inquérito alimentar dos paciente do presente estudo. Para avaliação do estresse oxidativo, será realizada uma coleta de sangue de 5 ml.

Você tem a liberdade de querer que a criança/adolescente que se encontre sob sua responsabilidade participe desta pesquisa ou não, no caso de aceitação, poderá retirar seu consentimento a qualquer momento, sem nenhum prejuízo à continuidade de seu tratamento.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer etapa do estudo, não existindo também, compensação financeira relacionada à sua participação. Também não haverá dano de qualquer natureza causado diretamente pela pesquisa. Todos os dados coletados assim como os resultados desta pesquisa serão publicados e divulgados no meio científico sem qualquer identificação pessoal, mantendo sigilo e preservando a sua privacidade.

Esse documento será assinado em 2 (duas) vias por ambas as partes, uma pelo pesquisador responsável e outra por você.

*Eu, \_\_\_\_\_,  
acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações  
sobre o estudo citado, que li ou que foram lidas para mim.*

*Eu discuti com a pesquisador Eduardo Benedetti Parisotto sobre a  
minha decisão de autorizar a criança/adolescente do qual sou  
responsável em participar deste estudo. Ficaram claros os propósitos do  
estudo, os procedimentos realizados, seus desconfortos e riscos, as  
garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.  
Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que  
tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário.  
Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar  
meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo,  
sem penalidades ou prejuízos ou perda de qualquer benefício que eu  
possa ter adquirido.*

---

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

Assinatura do Paciente

---

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

Assinatura dos Pesquisadores

## ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH-UFSC) para o projeto.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
Pro-Reitoria de Pesquisa e Extensão  
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

**CERTIFICADO** Nº 2112

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º 0584 GR 99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o contido no Regimento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

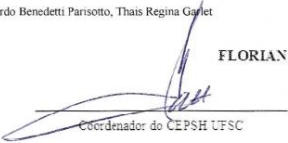
**APROVADO**

PROCESSO: 2112 FR: 470877

TÍTULO: Avaliação do estresse oxidativo antes e após suplementação antioxidante em crianças com Síndrome de down

AUTOR: Danilo Wilhelm Filho, Eduardo Benedetti Parisotto, Thais Regina Garlet

FLORIANÓPOLIS, 28 de Novembro de 2011.

  
Coordenador do CEPSH UFSC

Prof. Washington Portela de Souza  
Coordenador do CEPSH UFSC



ANEXO C - PRODUÇÃO DO ALUNO E COLABORAÇÕES  
CORRELATAS A SUA LINHA DE PESQUISA

ARTIGOS PUBLICADOS:

PARISOTTO, E.B.; GIARETTA, A.G.; ZAMONER, A.; MOREIRA, E.A.M.; FRÖDE, T.S.; PEDROSA, R.C.; WILHELM FILHO, D. Systemic oxidative stress in victims of *Bothrops* snakebites. *Journal of Applied Biomedicine*, v. 13, p. 161-167, 2015.

STRAPAZZON, J.O.; PARISOTTO, E.B.; MORATELLI, A.M.; GARLET, T.R.; BASTOS, J.; ZIMERMANN, I.V.; ZANIN, M.; FAGUNDEZ, R.; LINO, M.R.O.; FRÖDE, T.S.; WILHELM FILHO, D. Systemic oxidative stress in victims of *Bothrops* snakebites. *Journal of Applied Biomedicine*, v. 13, p. 161-167, 2015.

PARISOTTO, E.B.; GARLET, T.R.; CAVALLI, V.L.L.O.; ZAMONER, A.; ROSA, J.S.; BASTOS, J.; MICKE, G.A.; FRODE, T.S.; PEDROSA, R.C.; WILHELM FILHO, D. Antioxidant intervention attenuates oxidative stress in children and teenagers with Down syndrome. *Research in Developmental Disabilities*, v. 35, p. 1228-1236, 2014.

CAVALLI, V.L.L.O.; CATTANI, D.; RIEG, C.E.H.; ZANATTA, L.; PIEROZAN, P.; PARISOTTO, E. B.; WILHELM FILHO, D.; SILVA, F.R.M.B.; PESSOA-PUREUR, R.; ZAMONER, A. Roundup disrupted male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 65, p. 335-346, 2013.

GARLET, T.R.; PARISOTTO, E.B.; MEDEIROS, G.S.; PEREIRA, L.C.R.; MOREIRA, E.A.M.; DALMARCO, E.M.; DALMARCO, J.B.; WILHELM FILHO, D. Systemic oxidative stress in children and teenagers with Down syndrome. *Life Sciences*, v. 93, n. 16, p 558-563, 2013.

BISCARO, F.; PARISOTTO, E.B.; ZANETTE, V.C.; GÜNTHER, T.M.F.; FERREIRA, E.A.; GRIS, E.F.; CORREIA, J.F.G.; PICH, C.T.; MATTIVI, F.; WILHELM FILHO, D; PEDROSA, R.C. Anticancer

activity of flavonol and flavan-3-ol rich extracts from *Croton celtidifolius* latex. *Pharmaceutical Biology*, v. early, p. 1-7, 2013.

FARIAS, M. S.; BUDNI, P.; RIBEIRO, C. M.; PARISOTTO, E.B.; SANTOS, C.E.I.; DIAS, J.F.; DALMARCO, E.M.; FRÖDE, T.S.; PEDROSA, R.C.; WILHELM FILHO, D. Antioxidant supplementation attenuates oxidative stress in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterología y Hepatología*, v. 35, p. 386-394, 2012.

### RESUMOS PUBLICADOS EM EVENTOS

CASTRO, L. S. W. P.; OURIQUE, F.; PARISOTTO, E. B.; GRINEVICIUS, V. M. A.S.; MOTA, N.S.R.S.; PEDROSA, R. C. Stress oxidative induction and anti-antitumor effect of Albendazole. In: XLIII Annual Meeting of SBBq, 2014, Foz do Iguaçu. Anais do XLIII Annual Meeting of SBBq, 2014.

ALMEIDA, B.A.N.; DOMINGUES, J. T.; CATTANI, D.; PARISOTTO, E. B.; WILHELM FILHO, D.; SILVA, F. R. M. B.; ZAMONER, A. Effects of reverse T3 on huphotyroid-induced oxidative stress in immature rat hipponcapus. In: XXXVIII Reuniao Anual da SBNeC, 2014, Búzios. XXXVIII Reunião Anual da SBNeC, 2014.

PARISOTTO, E.B.; GARLET, T.R.; MDEDEIROS, G.S.; ZAMONER, A.; MOREIRA, E.A.M.; DALMARCO, E.M.; FRÖDE, T.S.; PEDROSA, R.C.; WILHELM FILHO, D. Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in children and teenagers with Down syndrome. In: VIII International Congress - Society for Free Radical Biology and Medicine, 2013, Buenos Aires. VIII International Congress - Society for Free Radical Biology and Medicine, 2013. v. único. p. 83-83.

ZAMONER, A.; CAVALLI, V.L.L.O.; CATTANI, D.; RIEG, C.E.H.; ZANATTA, L.; PIEROZAN, P.; PARISOTTO, E. B.; WILHELM FILHO, D.; SILVA, F.R.M.B.; PESSOA-PUREUR, R. Roundup-induced toxicity to male reproductive cells involves calcium overload, kinase pathways and oxidative stress. In: VIII International Congress - Society for Free Radical Biology and Medicine, 2013, Buenos Aires.



VIII International Congress - Society for Free Radical Biology and Medicine, 2013. v. único. p. 37-37.

DOMINGUES, J. T.; ALMEIDA, B.A.N.; CATTANI, D.; PARISOTTO, E.B.; WILHELM FILHO, D.; SILVA, F.R.M.B.; ZAMONER, A. Reverse t3 might reverts the oxidative stress generated by congenital hypothyroidism in hippocampus of immature rats. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2013, Foz do Iguaçu. SBBq, 2013.

MALUF, S.W.; WILHELM FILHO, D.; SOUZA, I.R.; PARISOTTO, E.B.; MEDEIROS, G.S.; MARTINS, B.B.P.; ROSA, J.S.; FRODE, T.S. Avaliação de marcadores inflamatórios, estresse oxidativo e índices de dano de DNA em pacientes com Doença Celíaca. In: XXV Congresso Brasileiro de Genética Médica, 2013, Florianópolis. XXV Congresso Brasileiro de Genética Médica, 2013.

PARISOTTO, E.B.; GARLET, T.R.; MEDEIROS, G.S.; CAVALLI, V. L.L.O.; ZAMONER, A.; MOREIRA, E.A.M.; DALMARCO, E.M.; DALMARCO, J. B.; PEDROSA R.C.; WILHELM FILHO, D. Terapia antioxidante atenua estresse oxidativo em crianças e adolescentes com Síndrome de Down. In: XXV Congresso Brasileiro de Genética Médica, 2013, Florianópolis. XXV Congresso Brasileiro de Genética Médica, 2013.

ALMEIDA, B.A.N.; CAVALLI, V.L.L.O.; RIEG, C.C.E.; PARISOTTO, E.B.; WILHELM FILHO, D.; SILVA, F.R.M.B.; ZAMONER, A. Maternal exposure to glyphosate-roundup leads to oxidative stress in testicular cells from male offspring. In: XLII Reunião Anual da SBBq, 2013, Foz do Iguaçu. XLII Reunião Anual da SBBq, 2013.

CAVALLI, V.L.L.O.; CATTANI, D.; RIEG, C.E.H.; PARISOTTO, E. B.; WILHELM FILHO, D.; SILVA, F.R.M.B.; ZAMONER, A. Effect of in vitro exposure to the pesticide roundup on calcium influx and cell viability in prepurbertal rat testis. In: XLII Reunião Anual da SBBq, 2013, Foz do Iguaçu. XLII Reunião Anual da SBBq, 2013.

RIEG, C.E.H.; CAVALLI, V.L.L.O.; CATTANI, D.; PARISOTTO, E. B.; WILHELM FILHO, D.; ZAMONER, A. Exposição crônica ao herbicida Roundup altera perfil oxidativo em fígado de ratos. In: 40°

Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, 2013, Florianópolis. Exposição crônica ao herbicida Roundup altera perfil oxidativo em fígado de ratos, 2013.

GARLET, T. R.; PARISOTTO, E. B.; AMORIM, J.; MEDEIROS, G.S.; MOREIRA, E.A.M. Oxidative stress and nutritional status in children and adolescents with Down Syndrome. In: V Congresso Brasileiro de nutrição e Cancer - Ganepao, 2012, Sao Paulo. V Congresso Brasileiro de nutrição e Cancer - Ganepao, 2012.

CAVALLI, V.L.L.O.; CATTANI, D.; RIEG, C C.E.; MAGNABOSCO, I.M.; PARISOTTO, E.B.; MEDEIROS, G.S.; SILVA, F.R.M.B.; WILHELM FILHO, D.; ZAMONER, A. Glifosato-roundup induz estresse oxidativo e ativa vias de sinalização dependentes de fosfolipase c e pkc em testículos de ratos pré-púberes. In: XXVII Reunião Anual da FESBE, 2012, Aguas de Lindóia. XXVII Reunião Anual da FESBE, 2012.

**ANEXO D**– primeira página do artigo publicado no periódico *Research in Developmental Disabilities*, volume 35, páginas 1228-1236 (2014), sob o título *Antioxidant intervention attenuates oxidative stress in children and teenagers with Down syndrome*. DOI: 10.1016/j.ridd.2014.03.013.

Research in Developmental Disabilities 35 (2014) 1228–1236



Contents lists available at ScienceDirect

Research in Developmental Disabilities



## Antioxidant intervention attenuates oxidative stress in children and teenagers with Down syndrome



Eduardo Benedetti Parisotto<sup>a</sup>, Thais Regina Garlet<sup>a</sup>,  
Vera Lúcia de Liz Oliveira Cavalli<sup>b</sup>, Ariane Zamoner<sup>b</sup>,  
Julia Salvan da Rosa<sup>c</sup>, Juliana Bastos<sup>d</sup>, Gustavo Amadeu Micke<sup>d</sup>,  
Tania Sílvia Fröde<sup>c</sup>, Rozangela Curi Pedrosa<sup>b</sup>, Danilo Wilhelm Filho<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Ecology and Zoology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

<sup>b</sup> Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

<sup>c</sup> Department of Clinical Analysis, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

<sup>d</sup> Department of Chemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 January 2014

Received in revised form 7 March 2014

Accepted 7 March 2014

Available online 28 March 2014

#### Keywords:

Down syndrome

Reactive oxygen species

Oxidative stress

Antioxidant therapy

### ABSTRACT

We previously demonstrated that systemic oxidative stress is present in Down syndrome (DS) patients. In the present study we investigated the antioxidant status in the peripheral blood of DS children and teenagers comparing such status before and after an antioxidant supplementation. Oxidative stress biomarkers were evaluated in the blood of DS patients ( $n = 21$ ) before and after a daily antioxidant intervention (vitamin E 400 mg, C 500 mg) during 6 months. Healthy children ( $n = 18$ ) without DS were recruited as control group. The activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST), gamma-glutamyltransferase (GGT), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and myeloperoxidase (MPO), as well as the contents of reduced glutathione (GSH), uric acid, vitamin E, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), and protein carbonyls (PC) were measured. Before the antioxidant therapy, DS patients presented decreased GST activity and GSH depletion; elevated SOD, CAT, GR, GGT and MPO activities; increased uric acid levels; while GPx and G6PD activities as well as vitamin E and TBARS levels were unaltered. After the antioxidant supplementation, SOD, CAT, GPx, GR, GGT and MPO activities were downregulated, while TBARS contents were strongly decreased in DS. Also, the antioxidant therapy did not change G6PD and GST activities as well as uric acid and PC levels, while it significantly increased GSH and vitamin E levels in DS patients. Our results clearly demonstrate that the antioxidant intervention with vitamins E and C attenuated the systemic oxidative damage present in DS patients.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Down syndrome (DS), the most frequent genetic disorder occurring in 1 out of every 700 to 1000 live births, is caused by trisomy of all or part of human chromosome 21 (HSA21). The syndrome is characterized by chronicity and severity of abnormalities including intellectual disability, dysmorphic features, as well as immunological, hematological and endocrine

\* Corresponding author. Tel.: +55 4837216917; fax: +55 483315156.  
E-mail address: dawilfi@ccb.ufsc.br (D. Wilhelm Filho).



**ANEXO E**– primeira página do artigo publicado no periódico *Research in Developmental Disabilities*, volume 45-46, páginas 14-20 (2015), sob o título *Persistence of the benefit of an antioxidant therapy in children and teenagers with Down syndrome*. DOI: 10.1016/j.ridd.2015.07.010.

Research in Developmental Disabilities 45–46 (2015) 14–20



Contents lists available at ScienceDirect

Research in Developmental Disabilities



## Persistence of the benefit of an antioxidant therapy in children and teenagers with Down syndrome



Eduardo Benedetti Parisotto<sup>a</sup>, Andréia Gonçalves Giaretta<sup>b</sup>, Ariane Zamoner<sup>c</sup>,  
Emília Addison Machado Moreira<sup>d</sup>, Tânia Silvia Fröde<sup>e</sup>,  
Rozangela Curi Pedrosa<sup>c</sup>, Danilo Wilhelm Filho<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Ecology and Zoology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

<sup>b</sup> Department of Nutrition, Federal Institute of Education of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

<sup>c</sup> Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

<sup>d</sup> Department of Nutrition, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

<sup>e</sup> Department of Clinical Analysis, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 20 March 2015  
Received in revised form 8 July 2015  
Accepted 14 July 2015  
Available online

#### Keywords:

Down syndrome  
Reactive oxygen species  
Oxidative stress  
Antioxidant therapy  
Persistence effect

### ABSTRACT

This study examined the effect of an antioxidant intervention in biomarkers of inflammation and oxidative stress (OS) in the blood of Down syndrome (DS) children and teenagers during four different stages. A control group was composed by healthy children ( $n = 18$ ), assessed once, and a Down group composed by DS patients ( $n = 21$ ) assessed at the basal period ( $t_0$ ), as well as after 6 months of antioxidant supplementation ( $t_1$ ), after 12 months (after interruption of the antioxidant intervention for 6 months) ( $t_2$ ), and again after further 6 months of antioxidant supplementation ( $t_3$ ). Biomarkers of inflammation (myeloperoxidase activity – MPO and levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ) and OS (thiobarbituric acid reactive substances – TBARS, protein carbonyls – PC), reduced glutathione (GSH), uric acid (UA) and vitamin E levels, as well as antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione reductase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferase (GST) and gamma-glutamyltransferase (GGT) activities, were measured after each period. After the antioxidant supplementation, the activities of SOD, CAT, GPx, GR, GGT and MPO were downregulated, while TBARS contents were strongly decreased, the contents of GSH and vitamin E were significantly increased, and no changes in G6PD and GST activity as well as in UA and PC levels were detected. After the interruption of the antioxidant therapy for 6 months, DS patients showed elevated GPx and GGT activities and also elevated UA and TBARS levels. No changes in SOD, CAT, GR, GST, G6PD and MPO activities as well as in GSH, vitamin E, PC, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels were detected. The results showed that the antioxidant intervention persistently attenuated the systemic oxidative damage in DS patients even after a relatively long period of cessation of the antioxidant intervention.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Down syndrome (DS) or Trisomy 21 is the most common chromosome abnormality in humans and oxidative stress (OS) is part of the fundamental biology of DS (Pagano & Castello, 2012; Parisotto et al., 2014; Pueschel, 1990). This increased OS

\* Corresponding author at: Departamento de Ecologia e Zoologia, CCB, UFSC, Trindade, Florianópolis 88040-900, Brazil.  
E-mail address: dawifi@ccb.ufsc.br (D.W. Filho).