

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

VITOR HUGO COMIN

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E
NEUROTROFINAS NA DEFICIÊNCIA INTELECTUAL LEVE EM
CRIANÇAS E ADOLESCENTES**

CRICIÚMA, AGOSTO DE 2019

VITOR HUGO COMIN

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E
NEUROTROFINAS NA DEFICIÊNCIA INTELECTUAL LEVE EM
CRIANÇAS E ADOLESCENTES**

Dissertação de Mestrado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre P. Muller.

CRICIÚMA, AGOSTO DE 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

C733a Comin, Vitor Hugo.

Avaliação de marcadores de estresse oxidativo e neurotrofinas na deficiência intelectual leve em crianças e adolescentes / Vitor Hugo Comin. - 2019.

66 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2019.

Orientação: Alexandre Pastoris Muller.

1. Incapacidade intelectual. 2. Crianças com deficiência. 3. Estresse oxidativo. 4. Fatores neurotróficos. 5. Vitaminas. I. Título.

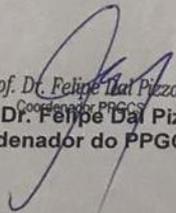
CDD 23. ed. 616.858

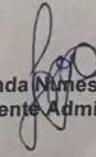


UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 329

Com início às 15h (quinze horas) do dia dez do mês de setembro de 2019 (dois mil e dezenove), realizou-se, na sala 304 do Bloco R2 do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **Vitor Hugo Comin** sob a orientação do Prof. Dr. Alexandre Pastoris Müller, intitulada "**AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E NEUROTROFINA NA DEFICIÊNCIA INTECTUAL LEVE EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES**". A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Àvila (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado, Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado e Prof. Dr. Luis Valmor Portela (Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS) – Conceito final: Aprovado. Com o resultado final: **APROVADO**, o aluno finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 16 (dezesesseis horas), dos quais eu, Fernanda Nunes Peruchi, Assistente Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol, Coordenador do Programa. Criciúma, 10 (dez) de setembro de 2019 (dois mil e dezenove).


Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol
Coordenador do PPGCS


Fernanda Nunes Peruchi
Assistente Administrativo

FOLHA INFORMATIVA

Esta dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Biomedicina Translacional do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Ao meu filho Davi, que além de me inspirar e motivar todos os dias para ser uma pessoa mais forte, me mostrou que as dificuldades da vida foram feitas para serem superadas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, pelas oportunidades, e por ter me guiado até aqui. Sem Ele eu não seria nada.

A toda minha família que sempre esteve ao meu lado independente do momento, em especial aos meus pais Artur e Ivana, e minha irmã Gabriela, que sempre lutaram por mim, pela educação que me deram, pelas palavras de incentivo, por todo amor e carinho ofertado, e pelos bons exemplos. Amo todos vocês.

Aos meus sogros Ismar e Terezinha, pelo acolhimento nesses últimos anos de novos aprendizados, e por me tratarem como um filho. Muito obrigado.

Um agradecimento especial para o meu orientador, professor doutor Alexandre Pastoris Muller, pelos ensinamentos dos últimos anos, pela atenção, puxões de orelha, e principalmente pela parceria que vai além da universidade. Sou muito grato.

Ao meu grupo de pesquisa, que contribuiu fortemente para realização desse trabalho sem medir esforços. Obrigado pelos momentos de estudo, de risadas e de troca de conhecimentos.

A minha namorada Bruna, que é uma pessoa fantástica e que me encanta todos os dias. É minha companheira de todas as horas e confidente nos momentos de desabafo. Ela me proporcionou o melhor presente de todos. Te amo.

Agradeço novamente a Deus por ter colocado um anjo incrível na minha vida, a pessoa mais guerreira que já conheci. Obrigado por me fazer enxergar a vida com outros olhos. Te amo incondicionalmente, Davi.

RESUMO

Crianças com o diagnóstico de deficiência intelectual (DI) são caracterizadas por possuírem atrasos no desenvolvimento global, envolvendo áreas comportamentais, linguísticas, adaptativas e motoras. Diversos estudos relacionam doenças neurodegenerativas com o agravamento do quadro oxidativo em células do sistema nervoso central além de sugerir alterações nos níveis de fatores neurotróficos desses indivíduos. O objetivo do estudo foi avaliar biomarcadores séricos de estresse oxidativo, neurotrofinas e vitaminas em crianças e adolescentes com DI leve e correlacionar com testes de aprendizagem para auxiliar no diagnóstico e tratamento. Foi realizado um estudo do tipo caso-controle onde foram avaliados biomarcadores séricos no soro de crianças com DI (n=16) frequentadoras do Centro Especializado em Reabilitação II, localizado na Universidade do Extremo Sul Catarinense na cidade de Criciúma/SC comparadas a um grupo controle (n=18). A avaliação neurocognitiva foi realizada através da escala de inteligência Wechsler (WISC-IV) para o diagnóstico da DI a fim da compreensão dos aspectos afetados. Para a análise bioquímica foram avaliados os níveis cerebrais de fator de crescimento nervoso (NGF- β) e níveis de enolase neurônio específica (NSE), marcadores de estresse oxidativo como glutatona reduzida (GSH), nitrito (NO_2^-), oxidação de diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH), carbonilação de proteínas e atividade da superóxido dismutase (SOD) e vitaminas B12 e D. As análises estatísticas foram realizadas através do software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 24.0, onde o nível de significância adotado foi $p \leq 0,05$. Os resultados mostraram uma diminuição dos níveis de NGF- β , um aumento da atividade de DCFH e carbonil e diminuição dos níveis de vitamina B12 nas crianças com DI comparadas ao controle. Em adição, houve uma correlação positiva entre vitamina B12 e um parâmetro do teste WISC-IV no grupo DI. Tais alterações desses biomarcadores podem ser utilizadas como um complemento e auxílio ao diagnóstico de DI a fim de garantir um tratamento efetivo, melhorando a qualidade de vida dessas crianças.

Palavras-chave: Deficiência intelectual, crianças, estresse oxidativo, fator neurotrófico, vitaminas.

ABSTRACT

Children diagnosed with intellectual disability (ID) are characterized by having delays in global development, involving behavioral, language, adaptive and motor areas. Several studies relate neurodegenerative diseases with the deterioration of the oxidative picture in cells of the central nervous system and suggest changes in the levels of neurotrophic factors of these individuals. The aim of the study was to evaluate serum biomarkers of oxidative stress, neurotrophins and vitamins in children and adolescents with mild ID and correlate with learning tests to aid diagnosis and treatment. A case-control study was performed in which serum biomarkers were evaluated in the serum of children with ID (n = 16) attending the Specialized Rehabilitation Center II, located at the University of Santa Catarina in the city of Criciúma. / SC compared to a control group (n = 18). Neurocognitive evaluation was performed using the Wechsler Intelligence Scale (WISC-IV) for the diagnosis of DI in order to understand the affected aspects. For biochemical analysis we evaluated brain levels of nerve growth factor (NGF- β) and levels of specific neuron enolase (NSE), stress markers such as oxidative reduced glutathione (GSH), nitrite (NO₂⁻), 2',7- dichlorofluorescein diacetate (DCFH), protein carbonylation and superoxide dismutase (SOD) activity and vitamins B12 and D. Statistical analyzes were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 24.0, where the level significance level adopted was $p \leq 0.05$. The results of the present study showed a decrease in NGF- β levels, an increase in DCFH activity and carbonyl and a decrease in vitamin B12 levels in children with ID compared to control. In addition, there was a positive correlation between vitamin B12 and a WISC-IV test parameter in the DI group. Such alterations of these biomarkers can be used as a complement and aid to the diagnosis of ID in order to guarantee an effective treatment, improving the quality of life of these children.

Keywords: Intellectual disability, children, oxidative stress, neurotrophic factor, vitamins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Impactos da geração de radicais livres no desenvolvimento neural..	22
Figura 2. Mecanismo proposto através do qual a vitamina B12 afeta o funcionamento do cérebro.....	26
Figura 3. Avaliação dos níveis de biomarcadores cerebrais NGF- β (A) e NSE (B) no soro de crianças nos grupos controle e DI	37
Figura 4. Avaliação dos níveis de biomarcadores de estresse oxidativo (A) DCFH (B) Carbonil (C) Nitrito (D) GSH e (E) SOD no soro de crianças nos grupos controle e DI	38
Figura 5. Avaliação dos níveis de vitamina (A) B12 e (B) vitamina D no soro de crianças nos grupos controle e DI	39
Figura 6. Correlação entre NGF- β com IMO (A) e QIT (B) e correlação entre Vitamina B12 e ICV (C) nos grupos Controle e DI	40
Figura 7. Correlação entre Vitamina B12 e ICV no grupo DI.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação da deficiência intelectual de acordo com o quociente de inteligência	18
Tabela 2. WISC-IV: Principais Subtestes para determinar o Quociente de Inteligência Total	30
Tabela 3. Caracterização da amostra de crianças e adolescentes pertencentes ao Grupo Controle e DI.	36
Tabela 4. Correlação entre biomarcadores cerebrais, estresse oxidativo e vitaminas com parâmetros cognitivos através do teste WISC-IV nos grupos Controle e DI	40
Tabela 5. Correlação entre biomarcadores cerebrais, estresse oxidativo e vitaminas com parâmetros cognitivos através do teste WISC-IV no grupo DI .	41
Tabela 6. Correlação entre biomarcadores cerebrais, estresse oxidativo e vitaminas com parâmetros cognitivos através do teste WISC-IV no grupo Controle.....	42
Tabela 7. Avaliação do teste WISC-IV em crianças do grupos Controle e DI.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AAIDD - Associação Americana de Deficiências Intelectuais e do Desenvolvimento (do inglês, *Association on Intellectual and Developmental Disabilities*)
- AAMR - Associação Americana de Deficiência Mental (do inglês, *Association on Mental Retardation*)
- APA – Associação Americana de Psiquiatria (do inglês, *American Psychiatric Association*)
- ATP - Adenosina Trifosfato
- BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (do inglês, *Brain Derived Neurotrophic Factor*)
- CAT – Catalase
- CER - Centro Especializado em Reabilitação
- CCL - Comprometimento Cognitivo Leve
- DA – Doença de Alzheimer
- DCF-DA – 2',7'-diclorofluoresceína (do inglês, *2',7'-dichlorofluorescin*)
- DCFH-DA - Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (do inglês, *2',7'-dichlorofluorescin diacetate*)
- DI - Deficiência Intelectual
- DNPT - 2,4-dinitrofenilhidrazina (do inglês, *2,4-dinitrophenylhydrazine*)
- DTNB- Ácido 2,2'-dinitro-5,5'-ditio-dibenzóico (do inglês, *2,2'-dinitro-5,5'-dithiodibenzoic acid*)
- EROs - Espécies Reativas de Oxigênio
- ERNs – Espécies Reativas de Nitrogênio
- GPx – Glutathione Peroxidase
- GSH - Glutathione Reduzida
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IMO - Índice de Memória Operacional
- IVP - Índice de Velocidade de Processamento
- IOP - Índice de Organização Perceptual
- ICV - Índice de Compreensão Verbal
- MDA - Malondialdeído

NGF - Fator de Crescimento Nervoso (do inglês, *Nerve Growth Factor*)

NO – Óxido Nítrico

NSE - Enolase Neurônio Específica (do inglês, *Neuron Specific Enolase*)

NT - Neurotrofinas

$O_2^{\bullet-}$ - Radical superóxido

OH^{\bullet} - Radical hidroxila

OMS - Organização Mundial da Saúde

QI - Quociente de Inteligência

SD – Síndrome de Down

SNC - Sistema Nervoso Central

SNP - Sistema Nervoso Periférico

SOD - Superóxido Dismutase

SPSS - Programa estatístico aplicado as ciências sociais (do inglês, *Statistical Package for the Social Sciencies*)

TCE - Traumatismo Craniano Encefálico

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TDAH – Transtorno de Déficit de Atenção

UNESC - Universidade do Extremo Sul Catarinense

UNICEF - Fundo das Nações Unidas para a Infância

WISC-IV- Escala de Inteligência Wechsler (do inglês, *Wechsler Intelligence Scale for Children*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 DEFICIÊNCIA	15
1.2 DEFICIÊNCIA INTELECTUAL	16
1.3 ETIOLOGIA.....	18
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO	20
1.5 NEUROTROFINAS	23
1.6 VITAMINAS.....	25
2 OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 POPULAÇÃO EM ESTUDO	29
3.2 AVALIAÇÃO NEUROCOGNITIVA	29
3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	30
3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	30
3.4 GRUPOS	31
3.5 COLETA DE AMOSTRA BIOLÓGICA	31
3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	32
3.6.1. Glutathiona reduzida (GSH)	32
3.6.2 Óxido nítrico (NO)	32
3.6.3 Oxidação de DCFH	32
3.6.4 Carbonilação de proteínas	33
3.6.5 Superóxido dismutase (SOD)	33
3.6.6 Fator de crescimento do nervo (NGF-β)	34
3.6.7 Enolase neurônio específica (NSE)	34
3.6.8 Vitamina B12	34
3.6.9 Vitamina D	35
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
4 RESULTADOS	36
5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	54
ANEXO	66
ANEXO 1 – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA EM SERES HUMANOS DA UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE.....	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 DEFICIÊNCIA

Nas últimas décadas, a maneira como a sociedade se inter-relaciona com as pessoas que possuem algum tipo de deficiência, vem sofrendo constantes avanços e modificações. Hoje, existe o reconhecimento de que um indivíduo com necessidades especiais, seja ela qual for o seu grau de comprometimento, possui os mesmos direitos que um cidadão considerado sem deficiência pela medicina, podendo usufruir das mesmas oportunidades. Cabe à sociedade como um todo, organizar-se de forma acessível, e disponibilizar recursos para atender com igualdade essa parcela da população (Parmenter, 2008; Bezerra e Vieira, 2012).

O conceito de deficiência é originado da palavra *deficientia*, do latim, no qual sugere algo imperfeito ou incompleto, que possua alguma falha no funcionamento. O termo é amplamente utilizado na literatura para definir a carência ou disfunção de uma condição anatômica, fisiológica ou psíquica (Teddé, 2012). De acordo com Mishra e Gupta (2006), todas as pessoas desenvolverão algum tipo de deficiência, seja temporária ou permanente em algum período de suas vidas, principalmente os indivíduos que tiverem maior longevidade e enfrentarem o envelhecimento. Considerando que a deficiência está inserida nas condições humanas, estudos que englobam ciências da saúde e social, avançam cada vez mais em busca de maiores esclarecimentos, rompendo barreiras e quebrando paradigmas sobre o tema, visto que essa parcela da população vem crescendo, ganhando espaço na sociedade, disputando gradativamente mais vagas de emprego, e, portanto, tendo maiores participações no cenário econômico e mercado de trabalho (Barnes, 1991; Charlton, 1998; McConachie et al., 2006).

Existem vários tipos e classificações de deficiências, estas são distribuídas em três grandes grupos envolvendo: saúde física, sensorial e intelectual (Dias e Oliveira, 2013). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que no mundo, atualmente, existem mais de um bilhão de pessoas convivendo com alguma deficiência, sendo que 200 milhões são portadoras de dificuldades funcionais (Hosseinpoor et al., 2013). Somente no Brasil, dados do

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) no ano de 2000, em torno de 14,5% da população possuía algum tipo de deficiência (Honora e Frizanco, 2008). No entanto, dez anos após, uma nova pesquisa realizada pelo IBGE, apontou uma crescente no número de brasileiros portadores de algum tipo de deficiência (visual, auditiva, motora ou intelectual), com 23,9% da população total, sendo mais predominante nas mulheres, com 26,5% dos casos registrados. Nas duas pesquisas realizadas, a região nordeste foi responsável pela maior prevalência de pessoas com pelo menos uma deficiência, enquanto que a região sul apresentou as menores taxas (IBGE, 2010). Entre os tipos citados anteriormente, estudos sobre a deficiência intelectual (DI), estão cada vez mais sendo exigidos na comunidade científica, com intuito de elucidar essa condição, desenvolver novos testes e metodologias para acelerar o diagnóstico físico e clínico, propor alternativas de tratamentos e minimizar possíveis danos irreversíveis.

1.2 DEFICIÊNCIA INTELECTUAL

A DI é caracterizada principalmente por limitações do desenvolvimento global, comportamental e adaptativo (Vissers et al., 2016). Essas alterações neurológicas podem contribuir para um desempenho anormal em determinada idade cronológica, dificultando a realização de tarefas básicas da rotina diária, habilidades sociais e funcionais, comprometimento da linguagem, entre outros distúrbios neuropsicomotores que, posteriormente, dificultarão o desenvolvimento independente na vida adulta (Moeschler e Shevell, 2014). Segundo Grossman (1983), o modo comportamental e adaptativo pode ser dividido em diferentes áreas: comunicação, cuidados, pessoais, utilização de recursos comunitários, autonomia, habilidades sociais, saúde, segurança, trabalho, lazer e habilidades acadêmicas. Para ser considerado DI, o indivíduo deve possuir um déficit em pelo menos duas áreas citadas anteriormente.

A DI afeta aproximadamente 1% da população mundial jovem, sendo considerada uma das deficiências mais encontradas em crianças e adolescentes (Vasconcelos, 2004; Amor, 2018). De acordo com a OMS, durante muitos anos, indivíduos considerados deficientes intelectuais eram

conhecidos popularmente como retardados mentais, excepcionais, inválidos ou simplesmente deficientes (World Health Organization, 2010). O termo “retardo mental”, ainda é encontrado em certas literaturas, porém, após algumas publicações internacionais realizada pela Associação Americana de Deficiência Mental (do inglês, *American Association on Mental Retardation* - AAMR), atualmente conhecida como Associação Americana de Deficiências Intelectuais e do Desenvolvimento (do inglês, *American Association on Intellectual and Developmental Disabilities* - AAIDD) propôs uma nova abordagem do assunto, difundindo mundialmente o conceito de DI (Salvador-Carulla e Bertelli, 2008; AAIDD, 2010).

A grande maioria dos casos com DI são identificados precocemente na infância, mais precisamente nos primeiros anos de vida, onde alguns distúrbios do desenvolvimento já começam a ser observados pelos pais ou responsáveis (Luckasson et al., 2002). Mesmo com toda a manifestação clínica da criança, pediatras e neurologistas costumam concluir o diagnóstico de DI por volta dos 6 anos de idade, onde é possível aplicar testes neuropsicológicos, fonoaudiológicos e psicométricos, os quais revelam informações importantes sobre questões neurológicas da criança, além de definir o quociente de inteligência (QI) em diferentes áreas. De acordo com a publicação apresentada na versão atualizada do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V), alguns critérios são necessários para confirmar a hipótese de DI, entre eles: a) Manifestações clínicas antes dos 18 anos de idade (período de desenvolvimento), b) Déficits em pelo menos duas áreas intelectual/adaptativa (comunicação, habilidades sociais, independência, trabalho, lazer, habilidades acadêmicas, cuidados pessoais, vida doméstica, uso de recursos comunitários), c) Funcionamento intelectual inferior à média da população (QI aproximadamente 70 ou inferior (American Psychiatric Association, 2014). O diagnóstico então será realizado através da associação dos testes cognitivos aplicados, com o QI da criança.

Quando realizado testes de inteligência de maneira verbal e não verbal, o QI médio das pessoas é de 100 pontos. Por definição literal, um QI é considerado baixo quando seus valores giram em torno dos 70 pontos, quadro característico da DI (Bartholomew, 2004). Com essas informações mais claras e precisas, o laudo médico será concluído com maior exatidão (Vissers et al.,

2016; Amor, 2018). O grau de DI, no meio científico é descrito de diferentes formas, sendo classificado como: leve, moderado, grave e profundo, geralmente através da escala de pontuação do QI, demonstrado na Tabela 1.

Nível da DI	CID-10	AAMR	APA	
Leve	QI: 50-69 IM: 9-11 anos	QI: 50-55 a 70-75	QI: 55-70	+ pelo menos dois déficits adaptativos
Médio ou Moderado	QI: 35-49 IM: 6-8 anos	QI: 35-40 a 50-55	QI: 35-54	
Grave ou Severo	QI: 20-34 IM: 3-5 anos	QI: 20-25 a 35-40	QI: 20-34	+ déficits em todas as oito categorias
Profundo	QI: <20 IM: <3 anos	QI: < 20-25	QI: <20	

Tabela 1. Classificação da deficiência intelectual de acordo com o quociente de inteligência. Abreviaturas: DI: Deficiência Intelectual. QI: Quociente de Inteligência. IM: Idade Mental de um adulto. CID-10: Classificação Internacional de Doenças para a DI de acordo com a Organização Mundial da Saúde. AAMR: *American Association on Mental Retardation/Deficiency*. APA: *American Psychiatric Association*. Fonte: APA, 2014.

Dentre os casos registrados de DI, nos considerados de grau leve, o indivíduo muitas vezes é diagnosticado tardiamente, até mesmo na idade adulta, visto que geralmente é caracterizado por dificuldades mais simples no aprendizado, não necessariamente comprometendo sua autonomia e independência social. Sua manifestação ocorre de forma não sindrômica. Já os casos de DI moderada, as dificuldades de aprendizagem são mais críticas e significativas, como por exemplo, habilidades de leitura e escrita. Os indivíduos podem adquirir noções básicas de comunicação social e adquirir certo nível de suficiência. Os casos de DI grave e profunda estão diretamente relacionados com a incapacidade total de tarefas do cotidiano, acarretando uma grave redução do potencial de mobilização e linguagem (Luckasson et al., 2002; Schalock et al., 2010).

1.3 ETIOLOGIA

Os fatores etiológicos da DI podem ser de origem genética, ambiental, multifatorial ou idiopática. Registros na literatura estimam que até o

ano de 2005, em torno de 25% dos casos eram decorrentes de alterações gênicas, 25% de origem ambiental ou adquirida, e 50% de causas desconhecidas (Rauch et al., 2006). Apesar das condições serem muito variáveis, podem ser ainda subdivididos em fatores pré-natais, perinatais e pós-natais. Dados fornecidos pelo Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) indicam que no Brasil, as principais causas de DI estão relacionadas com a nutrição inadequada das mães e crianças, doenças infecciosas e problemas gerados nas fases pré e pós-natais (Honora e Frizanco, 2008).

Entre as causas não genéticas envolvidas no processo de DI, estudos apontam que as mais comuns e encontradas são: prematuridade, privação de oxigênio, infecções, uso de substâncias teratogênicas (álcool, drogas e/ou medicações), traumatismo craniano, desnutrição calórico-proteica da mãe e/ou da criança e intoxicação por chumbo (Kaufmann e Moser, 2000; Toscano e Guilarte, 2005; Van Karnebeeck et al., 2005). A questão social também está inserida no contexto, visto que, situações de violência doméstica, falta de conhecimento dos responsáveis, baixo nível socioeconômico, abandono e exclusão, estão fortemente associados ao desenvolvimento anormal da atividade cerebral (Honora e Frizanco, 2008). Ao tratar-se de síndromes genéticas, a mais citada é a síndrome de Down, responsável por 15% dos casos, seguidas das síndromes de Rett e do X-frágil (Michelson et al., 2011). Apesar do grau de DI variar entre indivíduos, hoje em dia, sabe-se que em muitos casos, o diagnóstico é com base no histórico do indivíduo, e informações desde o período pré-natal são coletadas para fornecimento de maiores detalhes (Honora e Frizanco, 2008).

Como descrito anteriormente, são muitas as situações onde existe a possibilidade de ocasionar alguma sequela neurológica, e essas podem postergar o desenvolvimento cognitivo/intelectual saudável. Uma alternativa utilizada por neurocientistas para mensurar o nível de lesão, e a partir desta propor alternativas terapêuticas, é a avaliação de biomarcadores de dano cerebral (Zoethout et al., 2011). Existem diversos tipos de biomarcadores descritos na literatura, entre eles: creatina quinase, adenilato quinase, lactato, S100B, enolase neurônio específica (do inglês, *neuron specific enolase* – NSE), além de marcadores de estresse oxidativo e fatores neurotróficos (Kessler et al., 2007; Hu, 2008; Abdel Ghany et al., 2016).

A NSE é uma proteína encontrada principalmente no citoplasma dos neurônios e como não é secretada fisiologicamente, seus níveis aumentados no soro ou líquido indicam danos em células neurais (Kessler et al., 2007). Tem como função sinalizar diretamente danos nas estruturas e membranas dos neurônios, o que a torna uma das principais enzimas de marcação de lesão cerebral. Casos como traumatismo craniano encefálico (TCE), hemorragia intracerebral, choque séptico, infecções, ressuscitação cardiorrespiratória e neuroblastomas, são amplamente descritos por elevarem os níveis de NSE, sugerindo possíveis alterações e morte de neurônios (Rech et al., 2006; Böhmer et al., 2011).

1.4 ESTRESSE OXIDATIVO

Nas últimas décadas, o número de publicações relacionando o estresse oxidativo com o sistema funcional do cérebro vem crescendo no mundo todo. Apesar disso, os mecanismos ainda não são totalmente compreendidos, o que se torna um desafio diário para os cientistas. Cada vez mais, estudos clínicos e pré-clínicos sugerem o envolvimento do estresse oxidativo com a patogênese de diversas doenças, entre elas, as que envolvem o sistema nervoso e comprometem a qualidade de vida das pessoas (Crouch et al., 2008; Berk et al., 2011; Manzanero et al., 2013).

O processo de respiração celular, também conhecido como fosforilação oxidativa, é fundamental para a manutenção e sobrevivência do sistema energético do organismo humano, principalmente através da produção de adenosina trifosfato (ATP) (Green et al., 2007). Embora esse mecanismo fisiológico seja necessário, a fosforilação oxidativa produz moléculas altamente reagentes, conhecidas como espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs são moléculas que, em concentrações elevadas, podem causar o estresse oxidativo, e posteriores danos irreversíveis em estruturas importantes como lipídios, proteínas e DNA. Além disso, sabe-se que o estresse oxidativo é um fator que contribui para o surgimento de doenças cardiovasculares, câncer, diabetes, envelhecimento precoce e alterações neurológicas (Adler et al., 1999; Rahal et al., 2014).

Entre as principais EROs encontradas estão os radicais de superóxido ($O_2^{\bullet-}$), de hidroxila (OH^{\bullet}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As duas primeiras são classificadas como radicais livres, pelo fato de possuírem um elétron desemparelhado na sua última camada de valência, tornando-as altamente reativas. Em contrapartida, o H_2O_2 não possui elétron livre na sua estrutura atômica, sendo considerado uma espécie reativa com alto poder oxidativo (Yu, 1994; Mandal et al., 2010).

A fim de combater a superprodução de moléculas reativas e um posterior quadro de estresse oxidativo, o organismo possui mecanismos de defesa antioxidante. O objetivo é evitar que as células fiquem susceptíveis a danos e mantenham sua homeostase, garantindo uma integridade tecidual (Imai e Nakagawa, 2003). O sistema antioxidante pode ser de origem enzimática ou não enzimática, porém, ambos trabalham em conjunto para reduzir os efeitos de EROs em biomoléculas endógenas. (Rahal et al., 2014)

O sistema de defesa enzimático é formado pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx). A SOD é encarregada de dismutar $O_2^{\bullet-}$ formando H_2O_2 , enquanto que a CAT e a GPx são responsáveis por converter o H_2O_2 em água e oxigênio molecular (Chen et al., 2010). Já o sistema não enzimático é constituído por substâncias fisiológicas como ácido úrico, hormônios sexuais, bilirrubina, coenzima Q, entre outros (Schneider e Oliveira, 2004). Existem também antioxidantes que podem ser adquiridos através da suplementação, entre eles destacam-se o ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), minerais e derivados fenólicos, como os flavonóides (Bianchi e Antunes, 1999).

O estudo de Mangialasche et al. (2009) destacou que o estresse oxidativo crônico está diretamente relacionado com o desenvolvimento de um déficit cognitivo e possíveis conversões para o quadro de demência. Outro fator bastante atribuído aos danos cerebrais é o envelhecimento, fenômeno onde ocorre uma redução fisiológica da defesa oxidante e uma deficiência na produção de energia pelos neurônios, provocando maiores concentrações de radicais livres e contribuindo para apoptose neural. Essas alterações envolvem o sistema sensorial, motor, aprendizado e memória (Zhu et al., 2004; Ansari e Scheff, 2010).

De acordo com Steckert et al. (2010), o cérebro metaboliza em torno de 20% do oxigênio corporal, o que o torna uma estrutura altamente propensa a danos oxidativos. Um estudo realizado por Manzanero et al. (2013) indica que a geração de radicais livres e consequente estresse oxidativo esta relacionado com o surgimento de lesão neuronal, causando neurodegeneração e disfunção cognitiva (Figura 1).

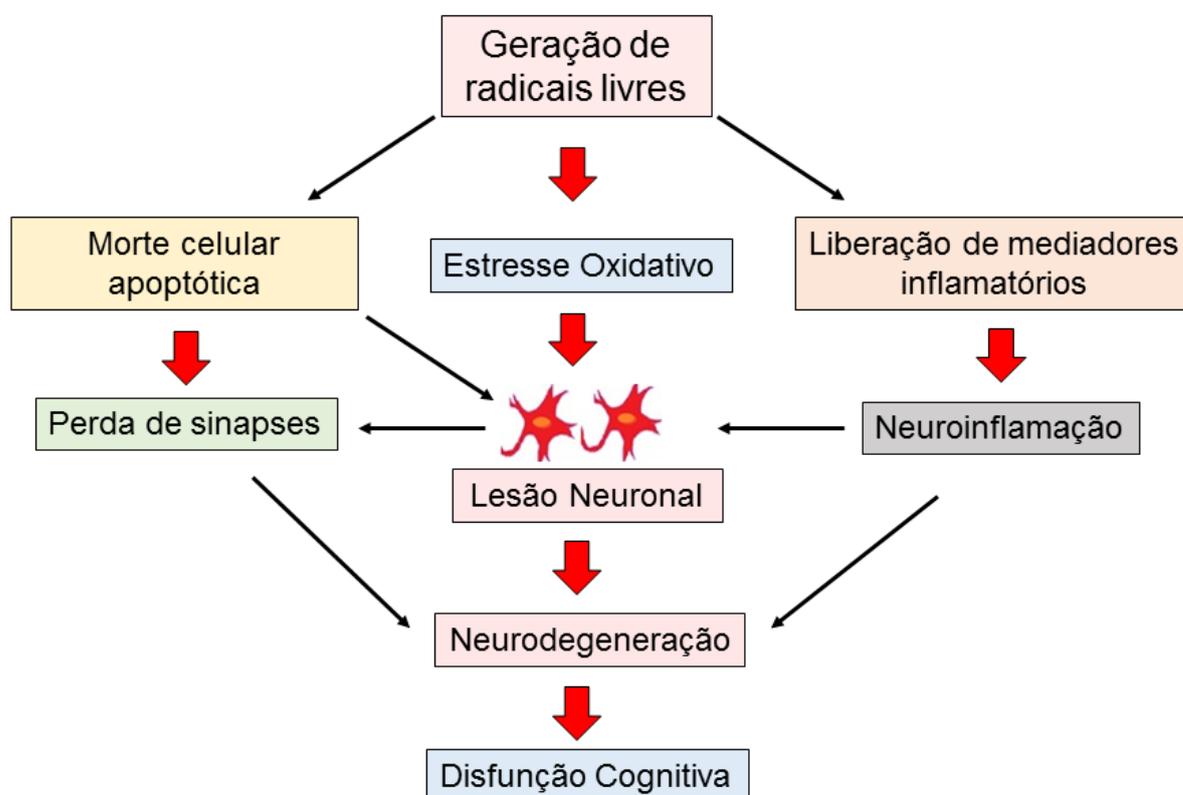


Figura 1. Impactos da geração de radicais livres no desenvolvimento neural. A geração de radicais livres causa morte celular apoptótica, estresse oxidativo e liberação de mediadores inflamatórios. Como consequência, surge uma lesão neuronal causando a neurodegeneração e disfunção cognitiva. Fonte: Adaptado de Manzanero et al. (2013).

Uma situação onde ocorre elevados índices de danos cerebrais, associados a um prolongado período de internação hospitalar, é a prematuridade em bebês (Bell et al., 2019). Dados da literatura indicam que uma gestação prematura, entre 24 e 34 semanas, combinado com baixo peso do neonato e intercorrências durante o parto (reanimação cardíaca, oxigêniooterapia) estão ligadas a maiores níveis de estresse oxidativo em

órgãos como cérebro e pulmão (Kapadia et al., 2013; Panfoli et al., 2018). Além disso, Giuffrè et al. (2015) relataram que o estresse oxidativo é um fator contribuinte para diversas complicações causadas pela prematuridade como: displasia bronco pulmonar, enterocolite necrosante, hemorragia intraventricular e encéfalomalácia periventricular. Outro fator importante que impacta no desenvolvimento neurocognitivo desses bebês é a formação incompleta e/ou pouco desenvolvida do sistema antioxidante em seus organismos, uma vez que a maior parte da concentração das moléculas antioxidantes são geradas ao final da gestação (Robles et al., 2001; Ozsurekci e Aykac, 2016).

Evidências sugerem que o estresse oxidativo além de promover danos associados ao cérebro, possui relações com fatores neurotróficos. Chauhan et al. (2009), demonstraram que crianças diagnosticadas com a síndrome do espectro autista, possuem alterações nos níveis de neurotrofinas em regiões específicas do cérebro, ao mesmo tempo que possuem um aumento do quadro oxidativo. Existem outras patologias neurológicas que possuem elos entre o estresse oxidativo e fatores neurotróficos, como por exemplo a doença de Alzheimer (Narisawa-Saito et al., 1996). De modo geral, estudos correlacionam o aumento do estresse oxidativo com a fisiopatologia de doenças que comprometem o funcionamento do cérebro (Hu e Russek, 2008; Kapczinski et al., 2008). Sugere-se que tais alterações possuem ligações diretas com fatores neurotróficos, e essas, podem ser em regiões específicas do tecido cerebral.

1.5 NEUROTROFINAS

As neurotrofinas (NT) são proteínas consideradas essenciais no âmbito do sistema nervoso dos mamíferos, atuando em uma série de processos e reações com alto grau de complexidade, dentre eles: a consolidação do estado comportamental, formação de memórias (curtas ou duradouras) e o desenvolvimento do aprendizado geral (Yamada et al., 2002; Lu et al., 2014). Antigamente, neurocientistas consideravam seu foco de atuação apenas voltado para o crescimento de neurônios. No entanto, nas últimas décadas, estudos vêm demonstrando que suas atividades biológicas

vão além, mediando diversas reações metabólicas, eventos de sinalização celular, processo de axogênese, regulação da atividade sináptica, mielinização, diferenciação neural, além de garantir a sobrevivência, manutenção e morte neuronal (Arévalo e Wu, 2006; Lu et al., 2014).

Os neurônios envolvidos são os dopaminérgicos, colinérgicos, noradrenérgicos, e também neurônios simpáticos e sensoriais do sistema nervoso periférico (SNP), ambos atuando através de receptores específicos (Barde, 1989; Mattson, et al., 2004). De acordo com Allen e Dawbarn (2006), os quatro principais representantes da família das NT descritos até o momento são as proteínas: fator de crescimento do nervo (do inglês, *Nerve Growth Factor* - NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês, *Brain Derived Neurotrophic Factor* - BDNF) e as neurotrofinas 3 e 4 (NT-3 e NT-4). O primeiro fator revelado pela literatura foi o NGF por volta do ano de 1950, onde posteriormente seus descobridores foram laureados com o Nobel (Levi-Montalcini e Hamburger, 1951).

Tratando-se de fatores neurotróficos, diversos estudos correlacionam patologias neurodegenerativas com níveis alterados de NT, ou alguma disfunção na sua expressão gênica, que comprometem suas vias de sinalização. Dentre as mais estabelecidas no segmento da neurociência, estão a doença de Parkinson, Alzheimer, quadros de depressão, epilepsia e Huntington. Todas têm em comum uma destruição gradativa e irreversível das células nervosas, acometendo diretamente a capacidade neurológica, habilidades motoras e funções fisiológicas do indivíduo. Muitas dessas alterações clínicas se assemelham ao quadro de déficit cognitivo dos portadores de DI (Roux e Barker, 2002; Hu e Russek, 2008)

O estudo de Drzyzga et al. (2009) evidenciou uma relação entre níveis de NT e sintomas depressivos, onde o estresse crônico foi associado com uma redução na expressão gênica de fatores neurotróficos, inibindo cascatas sinalizadoras e, conseqüentemente, um aumento da gravidade do quadro depressivo.

Quando avaliado a exposição de etanol em modelos pré-clínicos, agudo e crônico, também se observou alterações nas concentrações de NT em células do hipocampo, o que pode ter contribuído para disfunções comportamentais no grupo em experimento (Miller e Mooney 2004; Kerns,

2005; Hauser et al., 2011). Outro distúrbio de células nervosas que envolvem o grupo das NT é a epilepsia. Alguns trabalhos indicam que fatores neurotróficos são amplamente expressos no cérebro de roedores, principalmente em estruturas associadas com a plasticidade sináptica e epileptogênese no hipocampo, por exemplo. Esses níveis aumentados podem exercer um papel protetor, neutralizando a morte neuronal, porém, caso muito estimulado, pode causar efeitos secundários e potencializar a atividade epilética (Reibel et al., 2000; Binder et al., 2001; Koyama e Ikegaya, 2005).

1.6 VITAMINAS

Uma alternativa que vem ganhando espaço no meio científico é a associação entre vitaminas e o desenvolvimento cognitivo. Esse conceito tem como objetivo auxiliar o neurodesenvolvimento através da suplementação com micronutrientes (Benton, 2012; Bastons-Compta, 2018). De acordo com Filgueiras et al. (2018), a modalidade de pesquisa é de grande relevância, visto que a carência nutricional de vitaminas essenciais, por exemplo, é um problema de saúde global que merece ser pautado entre as autoridades.

As vitaminas são compostos químicos orgânicos que desempenham uma série de atividades essenciais para a sobrevivência dos mamíferos. Presente em diversos tipos de alimentos, seu papel endógeno é responsável por atuar em diversas reações metabólicas que envolvem crescimento, manutenção e defesa celular (Scarmeas et al., 2018).

Evidências recentes têm demonstrando na literatura, que padrões de alimentação inadequados, possuem efeitos diretos no desenvolvimento neurológico, tendo como fundamento a redução do volume e integridade cerebral (Hooshmand et al., 2016; Luciano et al., 2017). Além disso, a nutrição tem sido relacionada com patologias que podem articular com a demência, como diabetes e doenças cardiovasculares (Riederer et al., 2017; Santos et al., 2017). De acordo com Rathod et al. (2016), a carência nutricional de vitamina B12, afeta a função cerebral através dos níveis aumentados de homocisteína que comprometem a função neurovascular diretamente ou através do aumento

do estresse oxidativo, aumentando o risco de comprometimento cognitivo (Figura 2).

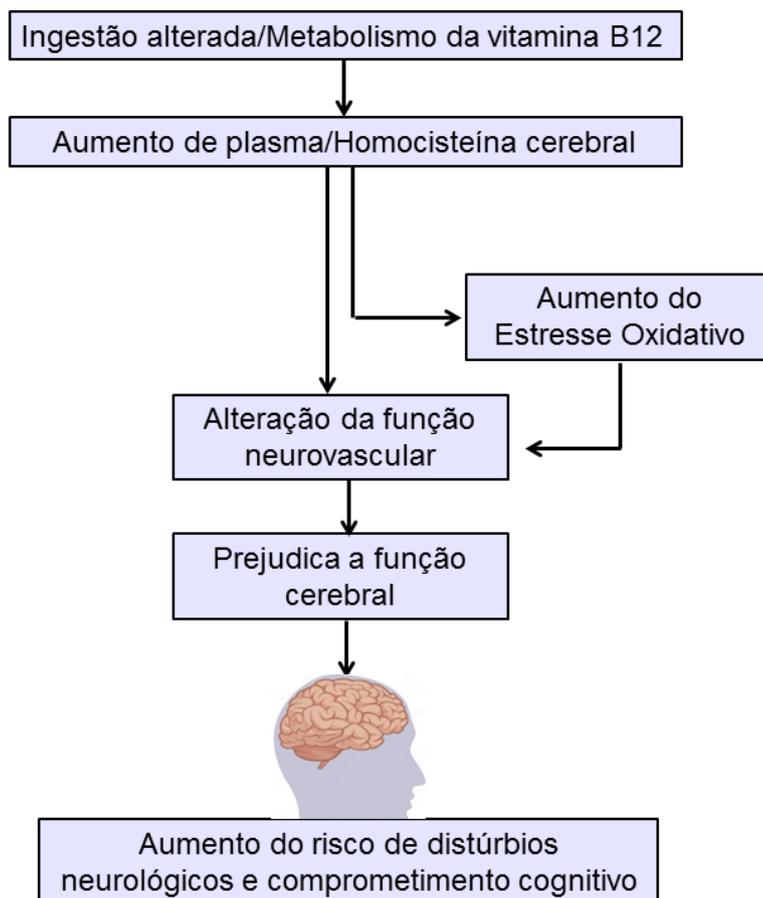


Figura 2. Mecanismo proposto através do qual a vitamina B12 afeta o funcionamento do cérebro. A ingestão/metabolismo de vitamina B12 afeta a função cerebral através de duas vias. Níveis aumentados de homocisteína influenciam as neurotrofinas cerebrais e a função neurovascular diretamente ou através do aumento do estresse oxidativo que pode aumentar o risco de distúrbios neurológicos e comprometimento cognitivo. Fonte: Adaptado de Rathod et al. (2016).

Outros estudos indicam que crianças prematuras apresentam níveis reduzidos de substâncias que combatem a ação oxidante, como a vitamina E, vitamina A e melatonina, além de menores concentrações das enzimas funcionais SOD e CAT (Abdel Ghany et al., 2016; Ozsurekci e Aykac, 2016). Outros nutrientes como as vitaminas D e C são citadas na literatura, uma vez que apresentam efeitos positivos sob domínios cognitivos (memória, aprendizado, processamento e funcionalidade), além de elevar o padrão antioxidante e promoverem efeitos de neuroproteção (Parisotto et al., 2015; Nerhus et al., 2017; AlJohri et al., 2018).

Todos os dias, novos casos de pessoas com alterações no funcionamento cerebral são registrados no mundo, e de maneira geral, estudos vêm utilizando biomarcadores como possíveis alvos terapêuticos, visto que é uma área da neurociência com certa carência de informações. Ao mesmo tempo, cresce a demanda de pesquisas que relacionam vitaminas com o estresse oxidativo. Em virtude disso, é indiscutível a importância de investimentos e colaborações da comunidade científica nesse segmento.

Uma vez que crianças com DI leve tem um difícil diagnóstico e tratamento, a busca de biomarcadores e suas alterações torna-se útil, pois podem ocasionar um déficit de aprendizagem dificultando a inserção na vida social e mercado de trabalho. Por esse motivo, busca-se investigar biomarcadores relacionados a neurotrofinas, estresse oxidativo e vitaminas e suas relações com a DI.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar biomarcadores séricos em crianças e adolescentes com deficiência intelectual leve e correlacionar com testes de aprendizagem para auxiliar no diagnóstico e tratamento.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar níveis de NGF- β no soro de crianças com DI;
- 2) Avaliar a correlação entre níveis de NGF- β com parâmetros cognitivos através do teste WISC
- 3) Avaliar a produção de espécies reativa de oxigênio, através do Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) e nitrogênio no soro de crianças com DI;
- 4) Avaliar a correlação entre a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio com parâmetros cognitivos através do teste WISC
- 5) Avaliar níveis de carbonilação de proteínas no soro de crianças com DI;
- 6) Avaliar a correlação entre a carbonilação de proteínas com parâmetros cognitivos através do teste WISC
- 7) Avaliar a atividade da SOD no soro de crianças com DI;
- 8) Avaliar a correlação entre a atividade da SOD e parâmetros cognitivos através do teste WISC
- 9) Avaliar níveis de glutathiona reduzida (GSH) no soro de crianças com DI;
- 10) Avaliar a correlação entre níveis de GSH e parâmetros cognitivos através do teste WISC;
- 11) Avaliar níveis de vitamina B12 no soro de crianças com DI;
- 12) Avaliar a correlação entre níveis de vitamina B12 e parâmetros cognitivos através do teste WISC;
- 13) Avaliar níveis de enolase neurônio específica no soro de crianças com DI;
- 14) Avaliar a correlação entre níveis de enolase e parâmetros cognitivos através do teste WISC.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 POPULAÇÃO EM ESTUDO

Para o desenvolvimento do presente estudo foram avaliadas 16 crianças e adolescentes de ambos os sexos, com idade entre 6 e 16 anos, diagnosticadas com DI pela equipe multidisciplinar do Centro Especializado em Reabilitação (CER). Para o grupo controle, foram recrutados 18 indivíduos pareados em idade e sexo com o grupo com DI. O único critério para tal faixa etária da amostragem era idade inferior a 18 anos. A equipe do CER é formada por profissionais médicos, enfermeiros, psicólogos, fisioterapeutas e acadêmicos da área da saúde, que prestam serviço gratuito para população local. O CER localiza-se na Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), sendo este, referência para em torno de 27 municípios da região sul de Santa Catarina.

A pesquisa foi iniciada após aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da Universidade do Extremo Sul Catarinense, tendo como base a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (ANEXO 1). Os sujeitos foram inicialmente convidados a participar da pesquisa, autorizando sua realização por meio de assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

O estudo é do tipo caso-controle, onde dois grupos foram analisados (grupo controle e grupo DI), e teve como variável analisada a Escala de Inteligência Wechsler (do inglês, *Wechsler Intelligence Scale for Children - WISC-IV*) para crianças e adolescentes com diagnóstico da deficiência, e compreensão dos aspectos mais ou menos afetados. O método utilizado, de acordo com dados literais, é considerado padrão ouro quando avaliado parâmetros neurocognitivos (Malloy-Diniz et al., 2010)

3.2 AVALIAÇÃO NEUROCOGNITIVA

O WISC constitui uma série de testes psicométricos que tem como objetivo avaliar diferentes aspectos neurológicos dos indivíduos. Possui em sua composição 10 subtestes centrais, que são distribuídos 4 em domínios

específicos: Índice de memória operacional (IMO), Índice de velocidade de processamento (IVP), Índice de organização perceptual (IOP) e Índice de compreensão verbal (ICV) (Tabela 2). Através de um cálculo realizado a partir dos testes citados, é obtido o valor do Quociente de Inteligência Total (QIT) do paciente (Styck e Walkins, 2017).

Os Indivíduos com DI manifestam escores em torno de dois desvios-padrão ou mais inferior a média populacional, com uma margem de erro (em geral, +5 pontos). Os testes com desvio-padrão de 15 e média de 100, representa um escore de 65-75 (70 ± 5), caracterizando a DI (APA, 2014).

Quoeficiente de Inteligência Total (QIT)				
Domínios Específicos	Índice de Compreensão Verbal (ICV)	Índice de Organização Percentual (IOP)	Índice de Memória Operacional (IMO)	Índice de Velocidade de Processamento (IVP)
Principais Subtestes	Similaridade Vocabulário Compreensão	Desenho do bloco Raciocínio matricial Conceitos de imagem	Dígitos periódicos Sequenciamento de letras e números	Codificação Sessões de pesquisa de símbolos

Tabela 2. WISC-IV: Principais Subtestes para determinar o Quoeficiente de Inteligência Total. O WISC-IV é dividido em 4 em domínios específicos: Índice de memória operacional (IMO), Índice de velocidade de processamento (IVP), Índice de organização perceptual (IOP) e Índice de compreensão verbal (ICV). A partir da média dos testes é realizado o valor do QIT. Fonte: Adaptado da APA, 2014.

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Crianças e jovens do sexo masculino e feminino, com idade inferior a 18 anos, que tiveram capacidade de responder os testes disponibilizados na pesquisa. Um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi disponibilizado aos pais e/ou responsáveis, autorizando a participação do menor no estudo.

3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos da pesquisa crianças e adolescentes com qualquer tipo de diagnóstico neurológico (doença neurológica física), entre elas: autismo, síndrome Down, síndrome de Rett, síndrome do X-Frágil e paralisia cerebral. Indivíduos que não possuíam a faixa etária proposta para o estudo foram excluídos. O não preenchimento do TCLE dos pais e/ou responsáveis também teve o cancelamento da participação no estudo.

Após a triagem, os pesquisadores orientaram os pais e/ou responsáveis, esclarecendo os procedimentos e objetivos do estudo, além da probabilidade de benefícios da participação na pesquisa. Após os devidos esclarecimentos, os pais e/ou responsáveis que aceitaram os critérios propostos, assinaram o TCLE autorizando a participação na pesquisa.

3.4 GRUPOS

Grupo controle (GC): O grupo é composto por crianças e adolescentes submetidos aos testes oferecidos, que não foram diagnosticadas com DI pela equipe multidisciplinar, ou que não possuem qualquer outra patologia clínica para posteriores comparações com o grupo experimental, pareado em idade, sexo e nível socioeconômico.

Grupo Experimental (GE): O grupo é formado por crianças e adolescentes que se encaixaram no perfil de DI após aplicação dos testes pela equipe multidisciplinar.

Todos os participantes do grupo controle (GC) e do grupo experimental (GC) foram inicialmente submetidos a uma avaliação individual. Em seguida, foi realizada uma pesquisa socioeconômica com os participantes envolvidos, para coleta de dados gerais. Posteriormente, houve a aplicação do teste de cognição para o diagnóstico da deficiência intelectual, para compreensão dos aspectos mais ou menos afetados.

3.5 COLETA DE AMOSTRA BIOLÓGICA

Foram coletados 20 ml de sangue de todos os participantes. Os participantes foram recebidos um de cada vez em uma sala equipada nas dependências do CER, onde foram realizadas as coletas sanguíneas.

Após o procedimento de coleta, uma parte do material biológico (soro) foi enviada ao Laboratório de Biomedicina Translacional da UNESC para realização das análises bioquímicas das amostras. A outra parte do material foi

enviada para o Laboratório Diagnósticos do Brasil, referência no País inteiro como laboratório de apoio para realização de análises séricas.

3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.6.1. Glutathiona reduzida (GSH)

Os níveis de glutathiona foram determinados como descrito por Hissin e Hilf (1976) com algumas adaptações. A GSH foi mensurada após a precipitação da proteína com 1mL proteína de ácido tricloroacético 10%. Na amostra contendo 30µL de soro foi adicionado um tampão de fosfato 800 mM, pH 7,4 e 500µm de Ácido 2,2'-dinitro-5-5'-ditio-dibenzóico (DTNB). A absorbância foi lida a 412nm. Uma curva padrão de glutathiona reduzida foi usada para calcular os níveis de GSH nas amostras.

3.6.2 Óxido nítrico (NO)

A produção de NO é estimada espectrofotometricamente a partir da formação de nitrito (NO_2^-). Para mensurar o teor de nitrito das amostras, as alíquotas contendo 50µL de soro foram incubadas com o reagente de Griess (1 % de sulfanilamida em 0,1 mol/L de HCl e 0,1% de N- (1-naftil) etilenodiamina di-hidrocloro) à temperatura ambiente durante 10 min. Em seguida, a absorbância foi lida a 540 nm utilizando um leitor de microplacas. O teor de nitrito foi calculado com base numa curva padrão construída com NaNO_2 (Chae et al., 2004).

3.6.3 Oxidação de DCFH

A produção de EROs foi avaliada utilizando o DCFH-DA (LeBel et al., 1990) com algumas modificações. Após a preparação de homogenatos, as alíquotas das amostras contendo 10µL de soro foram incubadas com DCFH-DA 10 uM a 37°C durante 30 minutos e a formação foi cessada a 4°C. O DCFH-DA foi desesterificado no interior das células por esterases endógenas

para o ácido livre ionizado. O DCFH é então oxidado por hidroperóxidos formando 2',7'-diclorofluoresceína (DCF-DA) e foi monitorado com excitação e emissão de comprimentos de onda de 488 e 525 nm, respectivamente utilizando um espectrofotômetro de fluorescência SpectraMax (Califórnia, EUA).

3.6.4 Carbonilação de proteínas

A concentração de proteína das frações de proteína solúvel é determinada de acordo com Levine et al. (1990). Nas amostras contendo 100µL de soro o teor de proteínas carboniladas foi medido pela formação inicial de derivados de hidrazona de proteína marcada usando 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPT). Estes derivados foram extraídos sequencialmente com ácido tricloroacético a 10% seguido de tratamento com etanol / acetato de etilo, 1: 1 (vol / vol) e reextração com ácido tricloroacético a 10%. O precipitado resultante foi dissolvido em hidróxido de sódio 3%. Cada amostra possui sua própria leitura de branco, passando pelo mesmo tratamento sem a adição do reagente de cor DNPT. Os resultados foram mostrados para cada amostra lida a 370 nm em um espectrofotômetro.

3.6.5 Superóxido dismutase (SOD)

A SOD foi mensurada pela inibição da oxidação da adrenalina adaptado de Bannister e Calabrese (1987). As amostras contendo 30µL de soro foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio 20 mM + KCl 140 mM pH 7,4. Os volumes de 5, 10 e 15 µL foram retiradas das mesmas, nas quais foram adicionados 5 µL de catalase (0,0024 mg/mL de água destilada), tampão de glicina 175185 µL (0,75g em 200 ml de água destilada a 32°C, pH 10,2) e 5 µL adrenalina (60 mM em água destilada +15 mL/mL de HCl fumegante). As leituras foram realizadas por 180s em intervalos de 10s e medido em leitor de ELISA a 480nm. Os valores foram expressos em unidade de SOD por miligrama de proteína (U/mg de proteína).

3.6.6 Fator de crescimento do nervo (NGF- β)

Os níveis de NGF foram determinados no soro das crianças de ambos os grupos. O material foi homogeneizado em solução de fosfato com um inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) centrifugadas a 3.000 xg por 5 min e o sobrenadante foi utilizado para as determinações. Os níveis neurotróficos, foram determinados utilizando kits ELISA comerciais de NGF (R & DS, Inc., DY556) seguindo as recomendações do fabricante. Os níveis de proteína foram determinados utilizando o método de Lowry (1951) com albumina de soro bovino como padrão.

3.6.7 Enolase neurônio específica (NSE)

Amostras de soro das crianças de ambos os grupos foram utilizadas para determinar níveis de NSE. A dosagem de NSE foi avaliada através da técnica de imunoenensaio enzimático, utilizando kits ELISA comercial específico para NSE (Wallac OY, Turku, Finlândia) de acordo com recomendações do fabricante. O limite de detecção considerado é de 1,0 $\mu\text{g/L}$.

3.6.8 Vitamina B12

Para determinar os níveis de vitamina B12, houve uma colaboração do Laboratório Diagnósticos do Brasil (referência no país todo como laboratório de apoio). As amostras de soro das crianças de ambos os grupos foram enviadas para o laboratório citado. Os resultados foram expressos em pg/mL . Valores são considerados baixos quando sua concentração é inferior a 200 pg/mL (Morreti et al., 2004). O método utilizado para a dosagem da vitamina B12 é a quimioluminescência (Diagnósticos do Brasil, 2019).

3.6.9 Vitamina D

As amostras de soro das crianças de ambos os grupos foram enviadas para o Laboratório Diagnósticos do Brasil, o qual realizou a análise dos níveis da vitamina D. Os resultados foram expressos em ng/mL. Os valores são considerados baixos quando sua concentração é inferior a 20 ng/mL (Maeda, 2014). O método utilizado para a dosagem é a quimioluminescência (Diagnósticos do Brasil, 2019).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi elaborado, primeiramente, um banco de dados em planilhas do *software* Microsoft Excel versão 2010 para organização e apresentação das análises descritivas de cada variável. Os dados foram exportados para o *software* Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 24.0, a fim de analisar a correlação entre as variáveis. O nível de significância adotado foi $p \leq 0,05$ com intervalo de confiança de 95%.

Para averiguar a distribuição dos dados quanto à normalidade foi utilizado o teste de *Shapiro-Wilk*, o qual é indicado para amostras pequenas Wagner (2004). As variáveis quantitativas foram apresentadas como média e desvio padrão e as variáveis qualitativas foram expressas por meio de frequência e porcentagem.

Para comparação das médias das variáveis quantitativas entre os grupos Controle e DI foi realizada por meio dos testes t de Student para amostras independentes. A investigação da existência de associação entre as variáveis qualitativas e os grupos Controle e DI foi investigada por meio dos testes Qui-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher.

A correlação entre os indicadores quantitativos do teste de WISC IV com os biomarcadores inflamatórios e os biomarcadores de estresse oxidativo foi investigada com o cálculo do coeficiente de correlação de Spearman.

As representações gráficas foram produzidas utilizando o *software* GraphPad\Prism5

4 RESULTADOS

Os dados da caracterização da amostra estudada estão dispostos na **Tabela 3**. Neste estudo foram avaliadas 34 crianças e adolescentes de ambos os sexos, alocados em dois grupos, Grupo DI (n=16) compostos por indivíduos com a característica em estudo e o Grupo Controle (n=18), o qual foi pareado de acordo com sexo e idade. No grupo controle, 58,8% (n=10) eram do sexo masculino, 41,2% (n=7) sexo feminino e apenas um participante não informou o sexo. A média de idade dos controles foi de 10,71 ($\pm 3,3$) anos. Já no Grupo DI, 56,3% (n=9) eram do sexo masculino e 43,8% (n=7) do sexo feminino, com média de idade de 10,81 ($\pm 2,7$) anos.

Características da população	Controle (n = 18)		DI (n = 16)		Valor-p
	N	(%), Média ($\pm dp$)	n	(%), Média ($\pm dp$)	
Sexo					
Masculino	10	(58,8)	9	(56,3)	0,881 ^{††}
Feminino	7	(41,2)	7	(43,8)	
Não Informado	1	-	0	-	
Tipo de parto					
Normal	7	(50,0)	9	(60,0)	0,588 ^{††}
Cesária	7	(50,0)	6	(40,0)	
Não Informado	4	-	1	-	
Idade (anos)	17	10,71 ($\pm 3,3$)	16	10,81 ($\pm 2,7$)	0,926 [†]
Peso ao Nascer (kg)	10	2,95 ($\pm 0,6$)	13	2,82 ($\pm 0,5$)	0,601 [†]
Est. ao Nascer (cm)	10	48,35 ($\pm 3,1$)	10	47,70 ($\pm 2,9$)	0,632 [†]

Tabela 3. Caracterização da amostra de crianças e adolescentes pertencentes ao Grupo Controle e DI.

[†]Valores obtidos por meio da aplicação do teste t de Student para amostras independentes.

^{††}Valores obtidos por meio da aplicação do teste Qui-quadrado de Pearson.

Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Inicialmente, foram avaliados os níveis dos biomarcadores cerebrais, fator de crescimento nervoso (NGF- β) e enolase neurônio específica (NSE), no soro das crianças pertencentes ao grupo controle comparado com o grupo de crianças com DI. Observa-se que em relação aos níveis de NGF- β , houve uma diminuição ($p < 0,001$) no grupo DI em relação ao grupo controle. Quanto a NSE, não houve diminuição estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 4).

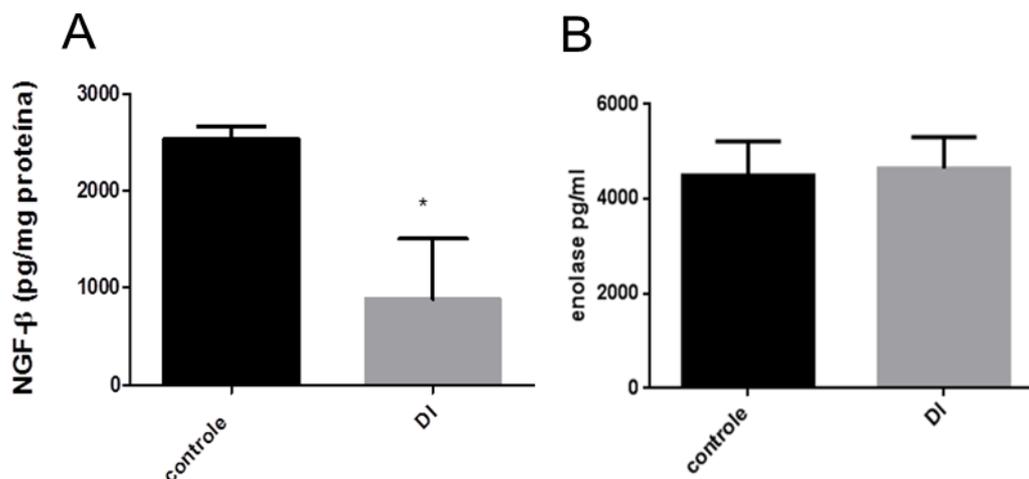


Figura 3. Avaliação dos níveis de biomarcadores cerebrais NGF- β (A) e NSE (B) no soro de crianças nos grupos controle e DI. Os resultados representam média \pm desvio padrão. Os valores do NGF- β estão expressos em pg /mg de proteína e os valores de NSE estão expostos em pg /ml . * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle.

As análises bioquímicas dos biomarcadores de estresse oxidativo, incluindo DCFH, carbonil, nitrito, GSH e SOD estão descritas na Figura 5. Os resultados demonstram que apenas DCFH e carbonil obtiveram uma alteração estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,046$ e $p < 0,009$ respectivamente). O grupo com DI apresentou média ($\pm dp$) superior para os níveis de DCF e carbonil em comparação ao grupo controle.

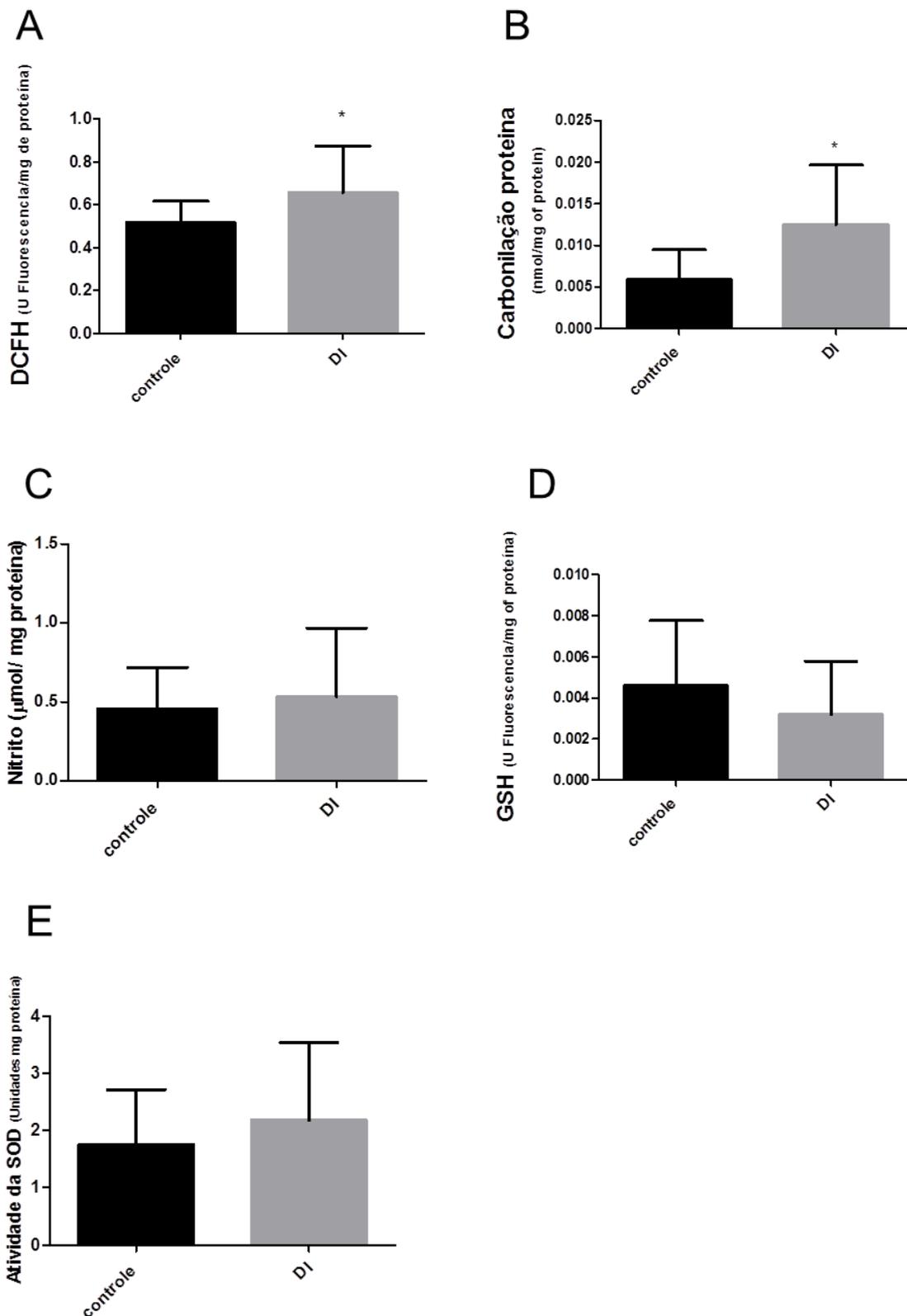


Figura 4. Avaliação dos níveis de biomarcadores de estresse oxidativo (A) DCFH (B) Carbonil (C) Nitrito (D) GSH e (E) SOD no soro de crianças nos grupos controle e DI. Os resultados representam média \pm desvio padrão. Os valores de DCFH e GSH estão expressos em U fluorescência/mg de proteína, Carbonil em nmol/mg de proteína, Nitrito em $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína e SOD em unidade/mg de proteína. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle.

Os níveis de vitaminas B12 e D estão dispostos na Figura 6. Apenas o nível de vitamina B12 apresentou diferença estatisticamente significativa ($p=0,038$) entre o grupo DI quando comparado ao grupo controle. O grupo DI apresentou média ($\pm dp$) inferior de vitamina B12 comparado ao grupo controle.

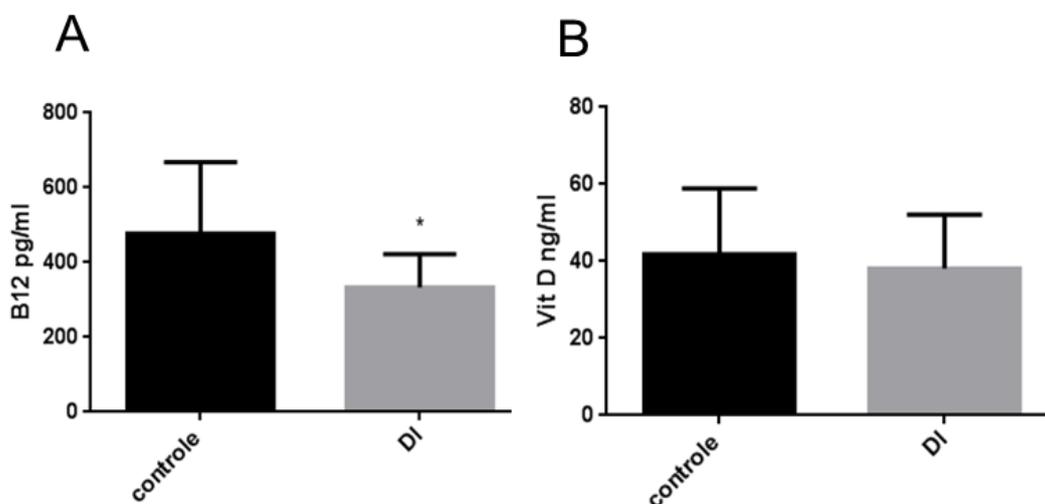


Figura 5. Avaliação dos níveis de vitamina (A) B12 e (B) vitamina D no soro de crianças nos grupos controle e DI. Os resultados representam média \pm desvio padrão. Os valores de B12 estão expressos em pg/ml e a vitamina D em ng/ml. * $p<0,05$ em comparação ao grupo controle.

Ao correlacionar os indicadores quantitativos do teste WISC-IV com biomarcadores cerebrais, estresse oxidativo e vitaminas em todos os indivíduos do estudo através do coeficiente de correlação de Spearman, observa-se que houve uma correlação positiva moderada com alguns indicadores do teste: NGF com QIT e IMO ($r_s = 0,624$ e $p < 0,01$) e Vit B12 com ICV ($r_s = 0,533$ e $p < 0,05$). Outras correlações não obtiveram significância estatística (Tabela 4 e Figura 6).

r_s	Geral (n = 34)				
	QIT	ICV	IOP	IMO	IVP
NGF	0,624**	0,264	0,416	0,624**	0,425
DCFH	-0,239	-0,117	-0,333	-0,228	-0,257
Carb	-0,339	-4,68	-0,281	-0,314	-0,303
Enol	0,206	-0,087	0,348	0,007	-0,037
Nitr	0,102	-0,204	-0,036	-0,017	0,058
GSH	0,175	-0,001	0,169	0,256	-0,046
Vit B12	0,131	0,533*	0,370	0,154	0,042
Vit D	-0,364	0,151	-0,398	-0,276	-0,379
SOD	-0,157	0,115	-0,27	0,186	0,038

Tabela 4. Correlação entre biomarcadores cerebrais, estresse oxidativo e vitaminas com parâmetros cognitivos através do teste WISC-IV nos grupos Controle e DI.

Legenda: r_s - Coeficiente de correlação de Spearman

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

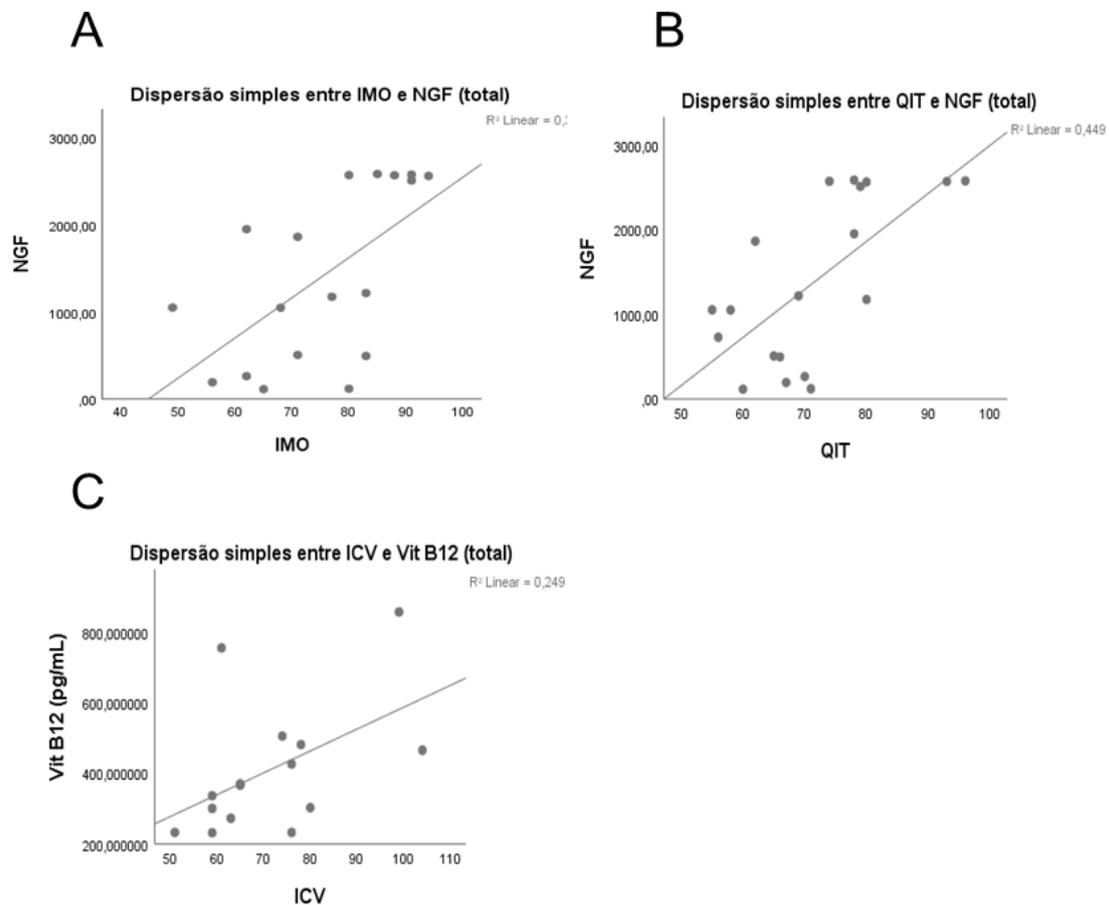


Figura 6. Correlação entre NGF- β com IMO (A) e QIT (B) e correlação entre Vitamina B12 e ICV (C) nos grupos Controle e DI. Os resultados estão apresentados através do r_s ($r_s = 0,624$ e ** $p < 0,01$ para correlação entre NGF- β com IMO e QIT e $r_s = 0,533$, * $p < 0,05$ para Vitamina B12 e ICV). IMO – Índice de Memória Operacional; QIT – Quociente de Inteligência Total; ICV – Índice de Compreensão Verbal.

Ao realizar a correlação entre os indicadores quantitativos do teste WISC-IV com biomarcadores cerebrais, estresse oxidativo e vitaminas apenas no grupo DI, através do coeficiente de correlação de Spearman, percebe-se que a vitamina B12 foi a única variável que obteve uma correlação positiva moderada com parâmetro cognitivo ICV ($r_s = 0,669$ e $p < 0,05$) (Tabela 5 e Figura 7)

r_s	DI				
	QIT	ICV	IOP	IMO	IVP
NGF	0,008	-0,254	-0,060	0,077	0,014
DCF2	-0,286	-0,067	-0,305	-0,098	-0,172
Carb	-0,643	-0,500	-0,504	-0,545	-0,429
Enol	0,236	-0,061	0,419	-0,354	-0,436
Nitr	0,017	-0,262	0,216	-0,299	-0,060
GSH	-0,009	-0,074	-0,019	0,012	-0,430
Vit B12	-0,291	0,669*	-0,024	-0,591	0,524
Vit D	-0,592	0,374	-0,571	-0,549	-0,640
SOD	-0,559	-0,128	-0,460	-0,292	-0,312

Tabela 5. Correlação entre biomarcadores cerebrais, estresse oxidativo e vitaminas com parâmetros cognitivos através do teste WISC-IV no grupo DI.

Legenda: r_s - Coeficiente de correlação de Spearman

* $p < 0,05$

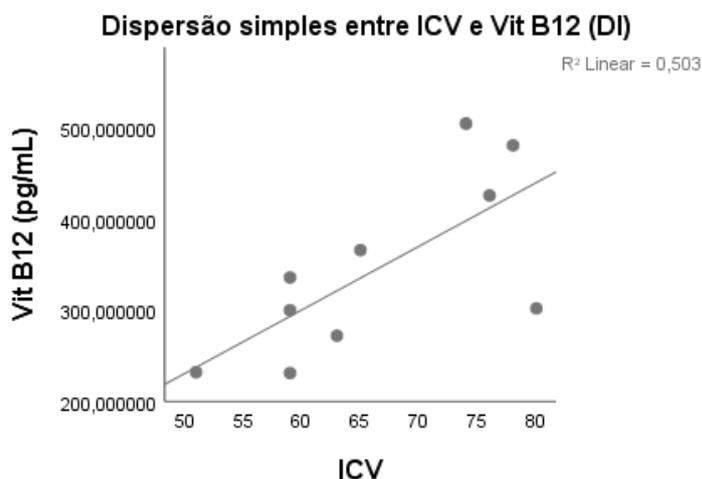


Figura 7. Correlação entre Vitamina B12 e ICV no grupo DI. Os resultados estão apresentados através do r_s ($r_s = 0,669$ e $*p < 0,05$). DI – Deficiência Intelectual; ICV – Índice de Compreensão Verbal.

Na Tabela 6, realizou-se as mesmas correlações, mas dessa vez apenas no grupo controle, onde nenhuma variável apresentou correlação com parâmetros cognitivos

r_s	CONTROLE				
	QIT	ICV	IOP	IMO	IVP
NGF	-0,086	0,657	-0,261	-0,551	-0,837
DCF2	-0,060	-0,300	0,300	-0,051	0,049
Carb	0,005	-0,314	0,029	0,145	0,359
Enol	-0,351	-0,342	-0,348	0,406	0,239
Nitr	0,204	-0,200	0,-300	0,359	0,158
GSH	-0,148	-0,147	0,75	0,403	0,062
Vit B12	0,613	0,100	0,821	0,359	0,316
Vit D	-0,721	-0,700	-0,410	0,051	0,053
SOD	-0,216	0,800	0,400	-0,316	-0,211

Tabela 6. Correlação entre biomarcadores cerebrais, estresse oxidativo e vitaminas com parâmetros cognitivos através do teste WISC-IV no grupo Controle.

Legenda: r_s - Coeficiente de correlação de Spearman

Quando aplicado o Teste WISC-IV, observa-se que as crianças do grupo Controle apresentam uma média de QIT maior comparada às crianças com DI ($p < 0,001$). Três dos quatro domínios (IOP, IMO e IVP) obtiveram diferença estatisticamente significativa entre os grupos, onde o grupo DI obteve uma pontuação inferior ao controle (Tabela 7).

Teste WISC IV	Controle (n = 18)		DI (n = 16)		Valor-p
	N	Média ($\pm dp$)	n	Média ($\pm dp$)	
QIT	9	82,33 ($\pm 7,76$)	13	65,92 ($\pm 7,79$)	$< 0,001^\dagger$
ICV	6	82,67 ($\pm 17,98$)	12	69,17 ($\pm 12,99$)	0,086 [†]
IOP	6	89,67 ($\pm 9,81$)	12	75,33 ($\pm 11,09$)	0,017 [†]
IMO	6	88,17 ($\pm 5,04$)	12	68,92 ($\pm 10,74$)	0,001 [†]
IVP	6	88,00 ($\pm 6,75$)	12	72,00 ($\pm 14,85$)	0,024 [†]

Tabela 7. Avaliação do Teste WISC-IV em crianças do grupo controle e com DI.

Legenda: [†]Valores obtidos por meio da aplicação do teste t de Student para amostras independentes.

5 DISCUSSÃO

Crianças com DI encontram vários desafios, como o preconceito, dificuldade de inclusão em grupos e de aprendizado. Uma vez que o diagnóstico da DI é difícil, baseado apenas nos testes de QI, algumas crianças ficam sem diagnóstico e tratamento acarretando diversas consequências na vida infantil e adulta. Esse estudo teve como objetivo avaliar biomarcadores séricos em crianças e adolescentes com DI leve e correlacionar com testes de aprendizagem para auxiliar no diagnóstico e tratamento. O NGF- β parece ser um marcador mais específico para DI devido a sua função de desenvolvimento cerebral e sua correlação com a cognição observada no trabalho; ainda marcadores de estresse oxidativo foram aumentados no grupo DI apontando esse como um fator importante na etiologia da doença.

As NT são essenciais no processo de aprendizagem e memória, por atuar como fator de plasticidade neuronal, modulando o trofismo nas sinapses, formação de espinhas dendríticas e estimulando sinais de neurotransmissores (Benussi et al., 2017). Dentre elas o NGF- β desempenha um papel crítico significativo no desenvolvimento e manutenção de neurônios colinérgicos, os quais têm sido implicados nos processos de memória e aprendizagem (Guneyet et al., 2014; Yang et al., 2014). Estudos sugerem que este fator neurotrófico apresenta-se diminuído à medida que o organismo atinge o envelhecimento, dificultando a conservação dos neurônios colinérgicos e desempenhando um papel no declínio da função cognitiva (Perovic et al., 2014; Budni et al., 2016; Campos et al., 2016). Gu et al. (2009), sugere através de resultados imunohistoquímicos que implantes cerebrais com elevados níveis de NGF humano melhoram significativamente a capacidade de aprendizado e memória espacial de roedores submetidos a doença de Alzheimer, além de promover maior sobrevivência aos neurônios.

Embora os efeitos benéficos do NGF- β em déficits de memória relacionados à idade estejam bem relatados, o papel terapêutico dessa NT nos déficits de memória que ocorrem em indivíduos jovens ainda não está claro. Jakubowska-Doğru e Gümüşbaş (2005) investigaram o efeito da administração crônica de NGF- β na memória de trabalho espacial em ratos Wistar adultos jovens com deficiência de memória. O estudo demonstrou que a

administração intracerebroventricular de NGF- β melhorou significativamente a memória de trabalho espacial neste grupo de ratos, a qual é equivalente à memória declarativa ou de curto prazo em humanos.

Na literatura, não há estudos que avaliaram a relação entre os níveis séricos de NGF- β em crianças e adolescentes com DI. No entanto, a produção alterada desta neurotrofina durante fases críticas do desenvolvimento tem sido associada à fisiopatologia de alguns distúrbios psiquiátricos, bem como de síndromes associadas à deficiência de aprendizado (Campos et al., 2016). Em crianças e adolescentes com síndrome de Williams (SW), doença rara que causa grande prejuízo cognitivo, foram encontrados níveis aumentados de NGF- β comparados com crianças do grupo controle e com Síndrome de Down (SD) (Calamandrei et al., 2000). Em contrapartida, nossos resultados apontam uma diminuição desta neurotrofina, sugerindo que essas diferenças em relação a doenças com fisiopatologia mais definidas que a diminuição do NGF- β possa ser um efeito mais característico para a DI.

Em relação à cognição, Kuban et al. (2018) afirma em seu estudo que em crianças que nasceram extremamente prematuras, um nível mais alto de neurotrofinas no geral está associado a um menor risco de comprometimento cognitivo na idade escolar. Ao avaliar 812 crianças de 10 anos com amostras de sangue coletadas no período neonatal, foi observado que elevações de proteínas neurotróficas circulantes durante as primeiras duas semanas de vida estão associadas a um menor risco de cognição prejudicada aos 10 anos de idade. Sabe-se que as neurotrofinas são importantes reguladores da função neuronal nos cérebros em desenvolvimento e adultos. A sua desregulação, nas fases iniciais do desenvolvimento cerebral, pode afetar a função das células cerebrais e pode resultar em vulnerabilidade às doenças neuropsiquiátricas e declínio cognitivo (Guneyet et al., 2014; Campos et al., 2016; Triaca et al., 2016). Os níveis de NGF- β não foram alterados em crianças com autismo ou retardo mental no estudo de Nelson et al. (2001). Nossos resultados apontam a diminuição desse biomarcador cerebral, o qual pode ser considerado uma ferramenta mais específica para a DI e poderia ser usado como um possível biomarcador no diagnóstico e tratamento de crianças com essa deficiência que somente possuem diagnóstico clínico.

A NSE é uma proteína que quando é secretada em altos níveis apontam para danos em estruturas e células neurais, tornando-a uma enzima de marcação de lesão cerebral (Kessler et al., 2007). A literatura também não aborda sobre a relação entre crianças com DI e níveis de NSE. Massaro et al (2014) realizou um estudo com a hipótese de que o aumento dos níveis séricos de NSE medidos durante o tratamento de hipotermia no período neonatal estaria associado a um resultado prejudicial no desenvolvimento neurológico aos 15 meses em crianças com encefalopatia neonatal. Foram avaliados 49 recém-nascidos com encefalopatia neonatal e o desfecho do desenvolvimento neurológico foi classificado por escores que refletiam os resultados cognitivos e motores. Níveis elevados de NSE durante a hipotermia foram associados com o aumento da gravidade do desfecho, onde se obteve uma associação entre NSE e o resultado cognitivo e motor com um Odds ratio (OR) de 2,1 (95% CI, 1,2-3,6).

Tem sido relatado que os níveis séricos de NSE estão elevados em pacientes pediátricos com danos neuronais, como lesão cerebral traumática e distúrbios neurológicos agudos (Žurek e Fedora, 2012 e Shiihara et al., 2014). Takano et al. (2017) em um relato de caso avaliaram um menino de quatro anos apresentando um profundo atraso no desenvolvimento, encefalopatia epiléptica e atrofia cerebral precoce e encontrou elevados níveis séricos de NSE. Em 2016, o mesmo autor relatou altos níveis de NSE em uma menina de 3 anos com atraso grave de desenvolvimento (Takano et al., 2016). O dano nas células neuronais causa o vazamento da NSE no compartimento extracelular e na corrente sanguínea, podendo ser detectada no soro após uma lesão traumática ou acidente vascular cerebral (Zurek e Fedora, 2012). Portanto as alterações observadas na NSE em pacientes foram durante insultos severos ao SNC. Sugere-se em nosso estudo que os níveis dessa proteína não tenham sido alterados devido ao fato das crianças incluídas não possuírem nenhuma patologia ou trauma. Os resultados foram em resposta a alguma alteração nos processos cognitivos e não em efeitos de traumas, mostrando que crianças com DI possuem um funcionamento muito parecido com crianças sem o diagnóstico, e as alterações nesses pacientes devem ser bastante sutis, necessitando buscar biomarcadores específicos.

Sabe-se que o estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de EROs e/ou ERNs e as defesas antioxidantes (Betteridge 2000). Tanto as EROs quanto as ERNs são radicais livres propriamente ditos ou compostos que produzem radicais livres por interação com diversos componentes incluindo lipídeos, proteínas e DNA podendo causar danos celulares e levando ao prejuízo cognitivo e dano de memória (Lichtenberg e Pinchuk, 2015). É notável que o estresse oxidativo está envolvido nos mecanismos patogênicos de vários distúrbios neurodesenvolvimentais e neurodegenerativos, embora em muitos casos não esteja claro se o estresse oxidativo é uma causa ou consequência da patologia (Filosa et al., 2015). Thanan et al. (2014) afirmam que este é pelo menos fundamental para um grande número de doenças cerebrais, incluindo Parkinson, Alzheimer, síndrome de Down, esquizofrenia, depressão e disfunções cognitivas. O estresse oxidativo, em especial durante as fases mais sensíveis e iniciais do desenvolvimento cerebral, pode ter um impacto adverso nos circuitos cerebrais importantes para o neurodesenvolvimento adequado (Cruz, 2017). O estresse oxidativo está sendo proposto como um fator comum de doenças que ainda não tem marcadores bioquímicos conhecidos como a esquizofrenia e autismo, afetando o balanço excitatório e inibitório neuronal (Steullet et al., 2017). Visto que são doenças que também afetam a cognição, assim como a DI, a busca e identificação de biomarcadores torna-se necessária para a detecção, prevenção e tratamento aprimorados.

Alterações metabólicas crônicas podem representar um fator de risco para o desenvolvimento de comprometimento cognitivo, demência ou doenças neurodegenerativas. Hiperglicemia crônica em ratos foi associada ao diabetes e obesidade, alterando vias de sinalização redox intracelular e afetando a cognição (Remor et al., 2018). Em contrapartida, nosso estudo mostrou alterações somente de DCFH e carbonilação de proteínas e as crianças não tinham nenhum diagnóstico de patologias metabólicas. A obesidade é descrita como um fator indutor de estresse oxidativo e, além disso, está associada com déficit cognitivos em modelos animais e como fator de risco para demências (Manna e Jain, 2015; Morris et al., 2015; Dye et al., 2017). As crianças em nosso trabalho não apresentavam alterações no peso e

índice de massa corporal (dados não mostrados), portanto esses fatores corporais não foram preponderantes para as alterações nos teste cognitivos.

Em relação aos biomarcadores de estresse oxidativo avaliados, apenas os níveis de DCFH e os grupamentos carbonil de proteínas obtiveram diferença estaticamente significativa, possuindo um aumento no grupo DI em comparação as crianças controles. As médias de nitrito, GSH e a atividade da SOD não tiveram significância estatística comparada ao grupo controle. Uma limitação de nosso estudo foi que avaliamos somente uma parte do sistema antioxidante, e também somente alguns biomarcadores de estresse oxidativo; portanto não podemos excluir que outros fatores relacionados ao sistema redox não foram afetados e devem ser avaliados em futuros trabalhos. Considerando que os níveis de DCFH encontram-se elevados e não houve alteração nas defesas antioxidantes avaliadas, sugerimos que esse excesso de EROs pode induzir ao dano as células no grupo DI, contribuindo para o prejuízo intelectual.

Crianças que sofreram trauma de abuso ou negligencia têm maior probabilidade de sofrer desordens psiquiátricas e alterações na cognição e isso foi relacionado à redução do volume do hipocampo associados a uma menor capacidade antioxidante do sistema glutathiona (Alameda et al., 2018). Em nosso trabalho não ocorreram alterações nos níveis de glutathiona sérico, entretanto as crianças avaliadas não possuíam relatos de trauma, considerando a DI como uma forma diferente de alterações daquelas observadas em patogenias mais bem descritas. Uma alteração no sistema glutathiona também ocorre em um modelo de epilepsia em ratos com diminuição da performance cognitiva, e a modulação desse sistema restaura a função de memória, apontando a importância do sistema redox para o aprendizado (Abdel-Wahab et al., 2015).

Em um estudo utilizando ratos Wistar com disfunção cognitiva mostrou uma diminuição nas atividades de GSH, CAT e SOD. Além disso, as análises de correlação demonstraram que os déficits cognitivos estavam estreitamente relacionados com a produção de EROs e ERNs (Wang et al., 2014). Row et al. (2002) relataram que a hipóxia intermitente causou um aumento do estresse oxidativo e déficits na aprendizagem espacial em ratos jovens. Solanki et al (2017) sugerem umnexo causal entre déficits

comportamentais e cognitivos e elevado estresse oxidativo, resultado da diminuição das enzimas antioxidantes SOD e GSH em ratos.

Hajjar et al. (2018) realizou uma coorte com 511 participantes saudáveis, de idade média de 49 anos, os quais foram acompanhados por quatro anos, com uma avaliação cognitiva anual. Houve um aumento do estresse oxidativo refletido pela diminuição de GSH no início do estudo e isso foi associado a um declínio cognitivo nos quatro anos, sugerindo que o estresse oxidativo pode ser um biomarcador que precede o declínio cognitivo. Em estudos avaliando crianças com SD é observado um aumento das enzimas SOD e CAT e uma diminuição nos níveis de GSH e carbonil (Garlet et al., 2013; Parisotto et al., 2015). Já em crianças com TDAH, os níveis de GSH também estavam diminuídos, e em relação às enzimas SOD e CAT não houveram diferenças comparadas ao controle. As diferenças observadas entre o estudo em crianças SD e TDAH, e as crianças com DI neste trabalho, apontam que a fisiopatologia da doença e seus efeitos na cognição são diferentes, e, portanto os biomarcadores também devem ser diferentes. Em um modelo de uma doença de malformação congênita o uso de antioxidante melhorou a função mitocondrial e diminuiu o estresse oxidativo com auxílio na performance cognitiva de roedores, sendo indicado o tratamento com antioxidantes para esta doença, a qual tem efeitos muito severos incluindo a baixa expectativa de vida (Fernandez et al., 2019).

Mecanismos de defesa antioxidante são incompletamente desenvolvidos ou deficientes em recém-nascidos prematuros (Panfoli et al., 2018). Em neonatos há uma diminuição das enzimas antioxidantes SOD, catalase e glutathione peroxidase (Ozsurekcki et al., 2016). Altos níveis de malondialdeído (MDA), um marcador de dano oxidativo, normalmente induzido por radicais livres e H_2O_2 , foi encontrado em bebês que tinham menor escore em escala de função cerebral associado ao nascimento prematuro. A prematuridade é um fator que já foi descrito como fator de risco para doenças psiquiátricas e função cognitiva (Panfoli et al., 2018). As crianças do presente estudo apresentavam estatura e peso iguais ao grupo controle, excluindo a prematuridade e fatores associados ao parto com causa da DI.

Para simular o estresse oxidativo *in vivo* Zhang et al. (2015) realizaram uma cultura de células, as quais foram estimuladas com peróxido de

hidrogênio para induzir o estresse oxidativo. Os níveis de EROs intracelular foram analisados através do DCFH-DA, que é permeável às células e sensível à oxidação. Os resultados indicaram um aumento do DCFH relacionado ao aumento estresse oxidativo nessa cultura de células. Em camundongos com déficits cognitivos induzidos por ácido domoico foi observado um aumento nos níveis de EROs refletido pelo aumento do DCFH e dano proteico pelo aumento dos níveis de carbonil (Wu et al., 2013).

Os danos causados pelas EROs são capazes promoverem uma série de reações de oxidação proteica, prejudicando o metabolismo e função celular, causando a destruição da célula (Grimm et al., 2011). No cérebro, a geração excessiva de ROS pode causar morte celular e apoptose de neurônios e astrócitos, levando a danos neuronais permanentes (Zhang et al., 2015). Para avaliar o dano às proteínas, o teor de carbonil é o indicador mais comumente utilizado na oxidação proteica. A carbonilação de uma proteína é considerada uma das modificações mais irreversíveis e danosas, sendo considerado um dos principais marcadores de estresse oxidativo (Fedorova et al., 2014). O aumento de carbonil tem sido observado em várias doenças humanas, incluindo doença de Alzheimer (DA), diabetes e SD (Dalle-Donne et al., 2003). Nossos resultados demonstraram um aumento dos níveis de carbonil indicando que as crianças com DI possuem maior dano proteico.

Corroborando com nossos achados, indivíduos com SD possuem maiores níveis de carbonilação de proteína (Zitnanová et al., 2006; Ordonez et al., 2010). Em adolescentes com SD foram encontrados níveis mais altos de carbonil em crianças quando comparados aos controles, e estes níveis foram revertidos pelo treinamento aeróbico em intensidade moderada (Ordonez et al., 2010). Isto sugere que a proteína carbonil pode ser utilizada como biomarcador de estresse oxidativo tanto na SD quanto na DI. Estes resultados nos levam a postular que estratégias as quais diminuíssem o estresse oxidativo seriam interessantes para o tratamento de crianças com DI.

Um estudo em adultos revelou que os danos no DNA e os níveis de proteína carbonil são preditores de alterações cognitivas em indivíduos saudáveis (Abdul Sani et al., 2018). A hipóxia induziu estresse oxidativo e consequente comprometimento cognitivo em ratos e foi observado um aumento de carbonil e nitrito, os quais foram revertidos pelo tratamento com flavanoide

(Kandikattu et al., 2017). O óxido nítrico (NO) é um radical livre formado pela conversão de arginina em citrulina e sua liberação é observada no estresse oxidativo. O NO é produzido durante a hipóxia e induz ao comprometimento da memória pela inibição da atividade da acetilcolinesterase (Udayabanu et al., 2008). Carmeli et al. (2012) analisaram os níveis de metabólitos de NO em 15 idosos diagnosticados com DI e observaram um aumento desse radical livre quando comparados aos indivíduos controles. Em contrapartida, nosso estudo não observou diferença significativa nos níveis de NO nas crianças com DI.

Em relação às vitaminas, em nosso estudo observou-se uma diminuição dos níveis séricos de vitamina B12 em crianças com DI em relação ao controle, enquanto a vitamina D não houve diferença estaticamente significativa. Um trabalho recente publicado por Bousselamti et al. (2018) sugere que a deficiência de vitaminas na alimentação infantil está diretamente ligada com atrasos no neurodesenvolvimento, principalmente no período de amamentação por mães vegetarianas, onde o leite é carente de vitamina B12. A prevalência de deficiência de vitamina B12 em adultos com deficiência intelectual foi de 25,5% em um centro de assistência residencial em Israel (Morad et al., 2005).

A vitamina B12 é essencial para o desenvolvimento do cérebro, a mielinização neural e a função cognitiva. Níveis inadequados de vitamina B12 durante a gravidez e a infância têm sido associados ao comprometimento do desenvolvimento cognitivo (Rush et al., 2014; Venkatramanan et al., 2016). Corroborando com nossos resultados, Siuda et al. (2009) compararam 55 casos de adultos com comprometimento cognitivo leve (CCL) com 44 controles saudáveis pareados por idade e sexo; onde descobriram que os pacientes com CCL possuíam baixos níveis séricos de vitamina B12. A melhora nos escores dos testes cognitivos foi observada em pacientes com deficiência de vitamina B12 que estavam com CCL (Kalita e Misra, 2008) ou que apresentavam maior comprometimento cognitivo (Aaron et al., 2005). A terapia com vitamina B12 foi benéfica em ambos os grupos, produzindo melhorias moderadas na cognição.

Ao realizar a correlação entre o teste WISC-IV com biomarcadores cerebrais, estresse oxidativo e vitaminas no grupo de crianças com DI, percebe-se que a vitamina B12 foi a única variável que obteve uma correlação positiva com o teste, no parâmetro cognitivo ICV. Sabe-se que o diagnóstico da

DI é realizado através da associação de testes cognitivos e o QI. O WISC-IV é o padrão-ouro para avaliar a capacidade cognitiva global e foi aplicado nas crianças com DI e controles. De acordo com a pontuação obtida, observou-se que as crianças com DI apresentaram uma menor média em três dos domínios do teste (IOP, IMO e IVP). A média final do QIT foi de 65,92 pontos caracterizando a DI de grau leve. Segundo Bartholomew (2004) um QI é considerado baixo quando seus valores são em torno dos 70 pontos, quadro representativo da DI.

Corroborando com nossos dados, uma metanálise compreendendo 7.688 participantes relevou uma associação entre comprometimento cognitivo e deficiência de vitamina D (Etgen et al., 2012). Outra metanálise sugeriu que concentrações mais baixas de vitamina D estão associadas com a piora da função cognitiva e maior risco de DA (Balion et al., 2012).

A vitamina D está envolvida no metabolismo do cálcio e dos ossos, além de ser reconhecida como um neuroesteroide que modula múltiplas funções cerebrais. Em uma revisão sistemática baixos níveis de vitamina D foram associados com pior desempenho cognitivo (OR = 1,24, IC = 1,14-1,35) e declínio cognitivo (OR = 1,26, IC = 1,09-1,23) (Goodwill e Szoeki, 2017). A população idosa apresenta alta prevalência de hipovitaminose D, devido à má alimentação e fatores fisiológicos. Soni e Kos et al. (2012) demonstraram que a vitamina D está associada a um melhor desempenho cognitivo, onde indivíduos com deficiência de vitamina D têm um risco de comprometimento cognitivo de até quatro vezes maior do que indivíduos com níveis normais.

A suplementação de ácido fólico, vitaminas B6 e D em pacientes com DA diminuiu marcador de danos, mas não afetou a cognição, o que mostra que somente uma suplementação vitamínica não é o suficiente para reverter danos na cognição na DA (Zhang et al., 2016). No estudo de Zandi et al. (2004) que suplementou adultos com vitaminas E e C, houve uma redução nos casos de Alzheimer, sugerindo que tal mecanismo seja em virtude das propriedades antioxidantes apresentada pelos compostos ofertados aos participantes. A vitamina D tem sido mais associada com diminuição da performance cognitiva e também com casos de demência (Byrn e Sheean, 2019). Em nosso trabalho não observamos alterações na concentração dessa vitamina, talvez porque essas alterações na vitamina estejam associadas a fatores ambientais, como

baixa exposição ao sol e envelhecimento, portanto não seria uma associação adequada a população do estudo.

As vitaminas têm um efeito muito importante na regulação de diversas etapas do metabolismo, portanto acredita-se que a normalização dos níveis de vitaminas, principalmente vitamina B12 no caso de crianças com DI, possa ser uma forma acessória no tratamento, em conjunto com outras formas de tratar e modificar os biomarcadores mais específicos como NGF- β e diminuição do estresse oxidativo para auxiliar de uma maneira efetiva essas crianças.

6 CONCLUSÃO

Os biomarcadores relacionados à neurotrofinas, estresse oxidativo e vitaminas surgem como possíveis alvos para auxiliar no diagnóstico e propor uma possível alternativa terapêutica na DI. Os resultados do presente estudo demonstram que crianças com DI possuem menores níveis de NGF, maiores níveis de DCF e carbonil, refletindo o estresse oxidativo e diminuição dos níveis de vitamina B12. Ao correlacionar as variáveis com o teste WISC-IV observou-se que o grupo DI obteve uma correlação positiva com a vitamina B12 no indicador ICV.

As alterações desses biomarcadores tornam-se úteis para auxiliar no diagnóstico e tratamento dessas crianças, as quais enfrentam vários desafios no seu cotidiano, a fim de realizar uma intervenção precoce e melhorar o quadro cognitivo e sua qualidade de vida. Devido ao limitado diagnóstico, algumas crianças vivem sem saber que possuem DI, comprometendo sua vida adulta em atividades sociais e no mercado de trabalho. Portanto tais alterações podem ser vistas como um complemento ao diagnóstico, utilizado em associação com os testes cognitivos e o QI da criança para melhor efetividade no tratamento.

REFERÊNCIAS

- Aaron S, Kumar S, Vijayan J, Jacob J, Alexander M, Gnanamuthu C. Clinical and laboratory features and response to treatment in patients presenting with vitamin B12 deficiency-related neurological syndromes. *Neurol India*. 2005; 53(1):55-8.
- Abdel Ghany EA, Alsharany W, Ali AA, Youness ER, Hussein JS. Anti-oxidant profiles and markers of oxidative stress in preterm neonates. *PaediatrIntChild Health*. 2016; 36(2):134-40.
- Abdel-Wahab BA, Shaikh IA, Khateeb MM, Habeeb SM. Omega 3 polyunsaturated fatty acids enhance the protective effect of levetiracetam against seizures, cognitive impairment and hippocampal oxidative DNA damage in young kindled rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2015; 135:105-13.
- Abdul Sani NF, Ahmad Damanhuri MH, Amir Hamzah AIZ, Abu Bakar ZH, Tan JK, Nor Aripin KN, Mohd Rani MD et al. DNA damage and protein oxidation associated with ageing correlate with cognitive dysfunction in a Malaysian population. *Free Radic Res*. 2018; 52(9):1000-9.
- Adler V, Yin Z, Tew KD, Ronai Z. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene*. 1999;18(45): 6104-11.
- Alameda L, Fournier M, Khadimallah I, Griffa A, Cleusic M, Jenni R et al. Redox dysregulation as a link between childhood trauma and psychopathological and neurocognitive profile in patients with early psychosis. *PNAS*. 2018; 115(49): 12495-500.
- AlJohri R, AIOkail M, Haq SH. Neuroprotective role of vitamin D in primary neuronal cortical culture. *eNeurologicalSci*. 2018; 14:43-8.
- Allen SJ, Dawbarn D. Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. *ClinSci (Lond)*. 2006; 110(2):175-91.
- American Association on Intellectual and Developmental Disabilities (AAIDD). *IntellectualDisability*. 2010.
- American Psychiatric Association (APA). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. Washington, DC: APA, 2000.
- American Psychiatric Association (APA). *Manual diagnostico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5*. Porto Alegre, RS: Artmed, 2014
- Amor DJ. Investigating the child with intellectual disability. *J Paediatr Child Health*. 2018; 54(10): 1154-58
- Ansari MA, Scheff SW. Oxidative stress in the progression of Alzheimer disease in the frontal cortex. *J NeuropatholExp Neurol*. 2010; 69(2):155-67.

Arévalo JC, Wu SH. Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell Mol Life Sci.* 2006; 63(13):1523-37.

Balion C, Griffith LE, Strifler L, Henderson M, Patterson C, Heckman G, Llewellyn DJ, Raina P. Vitamin D, cognition, and dementia: a systematic review and meta-analysis. *Neurology.* 2012; 79(13):1397-405.

Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal.* 1987;32:279-312

Barde YA. Trophic factors and neuronal survival. *Neuron.* 1989; 2(6):1525-34. Review

Barnes C. Disabled people in Britain and discrimination. 3ed. London: Hurst & Company, 1991. 264p.

Bartholomew DJ. *Measuring Intelligence, Facts and Fallacies.* Cambridge: Cambridge Univ. Press. 2004. 186p.

Bastons-Compta A, Astals M, Andreu-Fernandez V, Navarro-Tapia E, Garcia-Algar O. Post natal nutritional treatment of neurocognitive deficits in fetal alcohol spectrum disorder. *Biochem Cell Biol.* 2018; 96(2):213-21.

Bell JL, Saenz L, Domnina Y, Baust T, Panigrahy A, Bell MJ et al. Acute Neurologic Injury in Children Admitted to the Cardiac Intensive Care Unit. *Ann Thorac Surg.* 2019.pii: S0003-4975(19)30092-X.

Benussi L, Binetti G, Ghidoni R. Loss of Neuroprotective Factors in Neurodegenerative Dementias: The End or the Starting Point? *Front Neurosci.* 2017;11:672

Benton D. Vitamins and neural and cognitive developmental outcomes in children. *Proc Nutr Soc.* 2012; 71(1):14-26.

Berk M, Kapczinski F, Andreazza AC, Dean OM, Giorlando F, Maes M et al. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. *Neurosci Biobehav Rev.* 2011; 35(3):804-17.

Betteridge DJ What is oxidative stress" *Metabolism.* 2000; 49(2 Suppl 1): 3-8. Bezerra SS, Vieira MMF. People with intellectual handicaps: the new working-class brats of labor organizations. *Rev AdmEmpres.* 2012; 52(2): 232-44.

Bianchi MLP, Antunes LMG. Free radicals and the main dietary antioxidants. *Rev Nutr.* 1999; 12(2):123-30.

Binder DK, Croll SD, Gall CM, Scharfman HE. BDNF and epilepsy: too much of a good thing? *Trends Neurosci.* 2001; 24(1): 47-53.

Böhmer AE, Osés JP, Schmidt AP, Perón CS, Krebs CL, Oppitz PP, D'Avila TT, Souza DO, Portela LV, Stefani MA. Neuron-specific enolase, S100B, and glial

- fibrillary acidic protein levels as outcome predictors in patients with severe traumatic brain injury. *Neurosurgery*. 2011; 68(6):1624-30.
- Bousselamti A, El Hasbaoui B, Echahdi H, Krouile Y. Psychomotor regression due to vitamin B12 deficiency. *Pan Afr Med J*. 2018;3 0:152.
- Budni J, Bellettini-Santos T, Mina F, Garcez ML, Zugno AI. The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease. *Aging Dis*. 2015; 6(5): 331-41.
- Byrn MA, Sheean PM. Serum 25(OH)D and Cognition: A Narrative Review of Current Evidence. *Nutrients*. 2019; 11(4). pii: E729.
- Calamandrei G, Alleva E, Cirulli F, Queyras A, Volterra V, Capirci O et al. Serum NGF levels in children and adolescents with either Williams syndrome or Down syndrome. *Dev Med Child Neurol*. 2000; 42(11):746-50.
- Campos C, Rocha NB, Lattari E, Paes F, Nardi AE, Machado S. Exercise-induced neuroprotective effects on neurodegenerative diseases: the key role of trophic factors. *Expert Rev Neurother*. 2016; 16(6):723-34.
- Carmeli E, Imam B, Bachar A, Merrick J. Inflammation and oxidative stress as biomarkers of premature aging in persons with intellectual disability. *Res Dev Disabil*. 2012; 33(2):369-75.
- Chae SY, Lee M, Kim SW, Bae YH. Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by crosslinked hemoglobin. *Biomaterials*. 2004; 25(5):843-50
- Charlton J. Nothing about us without us: disability, oppression and empowerment. Berkeley. London: University of California Press, 1998. 213 p.
- Chauhan A, Muthaiyah B, Essa MM, Brown TW, Wegiel J, Chauhan V. Increased lipid peroxidation in cerebellum and temporal cortex in autism. In: *International Meeting for Autism Research (IMFAR)*. Illinois: Chicago, 2009.
- Chen H, Zhou L, Yin Lin C, Beattie MC, Liu J, Zirkkin BR. Effects of glutathione: redox state on Leydig cell susceptibility to acute oxidative stress. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2010; 323(2): 147-54.
- Crouch PJ, Harding SM, White AR, Camakaris J, Bush AI, Masters CL. Mechanisms of A beta mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008; 40(2):181-98.
- Cruz BF. Associações entre neurocognição, cognição social e estresse oxidativo na esquizofrenia. 2017. 96f. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, 2017.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*. 2003; 329(1-2):23-38.

Dias SS, Oliveira MCSL. Intellectual disability according to the cultural-historical approach: a path to adult development. *Rev Bras Educ Espec.* 2013; 19(2): 169-82.

Drzyzga LR, Marcinowska A, Obuchowicz E. Antiapoptotic and neurotrophic effects of antidepressants: a review of clinical and experimental studies. *Brain Res Bull.* 2009; 79(5):248-57.

Dye L, Boyle NB, Champ C, Lawton C. The relationship between obesity and cognitive health and decline. *Proc Nutr Soc.* 2017; 76(4):443-54.

Etgen T, Sander D, Bickel H, Sander K, Förstl H. Vitamin D deficiency, cognitive impairment and dementia: a systematic review and meta-analysis. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2012; 33(5):297-305.

Fedorova M, Bollineni RC, Hoffmann R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. *Mass Spectrom Rev.* 2014; 33(2):79-97.

Fernandez A, Meechan DW, Karpinski BA, Paronett EM, Bryan CA, Rutz H et al. Mitochondrial Dysfunction Leads to Cortical Under-Connectivity and Cognitive Impairment. *Neuron.* 2019; 102(6):1127-42.e3.

Filgueiras MS, Rocha NP, Novaes JF, Bressan J. Vitamin D status, oxidative stress, and inflammation in children and adolescents: A systematic review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018:1-10.

Filosa S, Pecorelli A, D'Esposito M, Valacchi G, Hajek J. Exploring the possible link between MeCP2 and oxidative stress in Rett syndrome. *Free Radic Biol Med.* 2015; 88(Pt A):81-90.

Garlet TR, Parisotto EB, de Medeiros Gda S, Pereira LC, Moreira EA, Dalmarco EM et al. Systemic oxidative stress in children and teenagers with Down syndrome. *Life Sci.* 2013; 93(16):558-63

Giuffrè M, Rizzo M, Scaturro G, Pitruzzella A, Marino Gammazza A, Cappello F et al. Oxidative stress markers at birth: Analyses of a neonatal population. *Acta Histochem.* 2015; 117(4-5):486-91

Goodwill AM, Szoeki C. A Systematic Review and Meta-Analysis of The Effect of Low Vitamin D on Cognition. *J Am Geriatr Soc.* 2017; 65(10):2161-8.

Green MJ, Cahill CM, Malhi GS. The cognitive and neurophysiological basis of emotion dysregulation in bipolar disorder. *J Affect Disord.* 2007; 103(3): 29-42.

Grimm S, Hoehn A, Davies KJ, Grune T. Protein oxidative modifications in the ageing brain: consequence for the onset of neurodegenerative disease. *Free Radic Res.* 2011; 45(1):73-88.

Grossman HJ. Classification in mental retardation. Washington, DC: American Association on Mental Retardation. 1983.

Gu H, Long D, Song C, Li X. Recombinant human NGF-loaded microspheres promote survival of basal forebrain cholinergic neurons and improve memory impairments of spatial learning in the rat model of Alzheimer's disease with fimbria-fornix lesion. *Neurosci Lett*. 2009;453(3):204-9.

Guney E, Ceylan MF, Kara M, Tekin N, Goker Z, Senses Dinc G et al. Serum nerve growth factor (NGF) levels in children with attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Neurosci Lett*. 2014; 560:107-11.

Hajjar I, Hayek SS, Goldstein FC, Martin G, Jones DP, Quyyumi A. Oxidative stress predicts cognitive decline with aging in healthy adults: an observational study. *J Neuroinflammation*. 2018; 15(1):17

Hauser SR, Getachew B, Taylor RE, Tizabi Y. Alcohol induced depressive- like behavior is associated with a reduction in hippocampal BDNF. *PharmacolBiochemBehav*. 2011; 100(2):253-8.

Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*. 1976; 74(1):214-26.

Honora M, Frizanco ML. Esclarecendo as deficiências: Aspectos teóricos e práticos para contribuir com uma sociedade inclusiva. 1ed. São Paulo: Ciranda Cultural, 2008. 200p.

Hooshmand B, Mangialasche F, Kalpouzos G, Solomon A, Kåreholt I, Smith AD et al. Association of Vitamin B12, Folate, and Sulfur Amino Acids With Brain Magnetic Resonance Imaging Measures in Older Adults: A Longitudinal Population-Based Study. *JAMA Psychiatry*. 2016; 73(6):606-13.

Hosseinpoor AR, Stewart Williams JA, Gautam J, Posarac A, Officer A, Verdes E et al. Socioeconomic inequality in disability among adults: a multicountry study using the World Health Survey. *Am J Public Health*. 2013; 103(7):1278-86.

Hu Y, Russek SJ. BDNF and the diseased nervous system: a delicate balance between adaptive and pathological processes of gene regulation. *J Neurochem*. 2008; 105(1):1-17.

Imai H, Nakagawa Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic Biol Med*. 2003; 34(2):145-69.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE); Secretaria de Direitos Humanos da Presidência Da República; Secretaria Nacional de Promoção dos Direitos da Pessoa com Deficiência. Cartilha do Censo 2010: pessoas com deficiência [Internet]. Brasília, DF; 2012

Jakubowska-Doğru E, Gümüşbaş U. Chronic intracerebroventricular NGF administration improves working memory in young adult memory deficient rats. *Neurosci Lett*. 2005; 382(1-2):45-50

Kalita J, Misra UK. Vitamin B12 deficiency neurological syndromes: correlation of clinical, MRI and cognitive evoked potential. *Journal of Neurology*. 2008; 255: 353–9.

Kandikattu HK, Deep SN, Razack S, Amruta N, Prasad D, Khanum F. Hypoxia induced cognitive impairment modulating activity of *Cyperus rotundus*. *Physiol Behav*. 2017; 175:56-65.

Kapadia VS, Chalak LF, Sparks JE, Allen JR, Savani RC, Wyckoff MH. Resuscitation of preterm neonates with limited versus high oxygen strategy. *Pediatrics*. 2013; 132(6):e1488-96.

Kapczinski F, Vieta E, Andreazza AC, Frey BN, Gomes FA, Tramontina J et al. Allostatic load in bipolar disorder: implications for pathophysiology and treatment. *NeurosciBiobehav Rev*. 2008; 32(4):675-92.

Kawanishi S, Murata M. Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. *Int J Mol Sci*. 2014; 16(1):193-217.

Kaufmann WE, Moser HW. Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cereb Cortex*. 2000; 10(10):981-91.

Kerns RT, Ravindranathan A, Hassan S, Cage MP, York T, Sikela JM, Williams RW, Miles MF. Ethanol-responsive brain region expression networks: implications for behavioral responses to acute ethanol in DBA/2J versus C57BL/6J mice. *J Neurosci*. 2005; 25(9):2255-66.

Kessler FH, Woody G, Portela LV, Tort AB, De Boni R, Peuker AC, Genro V, von Diemen L, de Souza DO, Pechansky F. Brain injury markers (S100B and NSE) in chronic cocaine dependents. *Braz J Psychiatry*. 2007; 29(2):134-9.

Koyama R, Ikegaya Y. To BDNF or not to BDNF: that is the epileptic hippocampus. *Neuroscientist*. 2005; 11(4):282-287.

Kuban KCK, Heeren T, O'Shea TM, Joseph RM, Fichorova RN, Douglass L et al. Among Children Born Extremely Preterm a Higher Level of Circulating Neurotrophins Is Associated with Lower Risk of Cognitive Impairment at School Age. *J Pediatr*. 2018; 201:40-48.e4.

LeBel CP, Ali SF, McKee M, Bondy SC. Organometal-induced increases in oxygen reactive species: the potential of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage. *ToxicolApplPharmacol*. 1990; 104(1):17-24.

Levi-Montalcini R, Hamburger V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool*. 1951; 116(2):321-61.

- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990; 186:464-78
- Lichtenberg D, Pinchuk I. Oxidative stress, the term and the concept. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015; 461(3): 441-4.
- Loncarevic-Vasiljkovic N, Ruzdijic S, Kanazir S. BDNF transcripts, proBDNF and proNGF, in the cortex and hippocampus throughout the life span of the rat. *Age(Dordr).* 2013; 35(6):2057-70.
- Lowry OH, Rosebrought NJ, Farr AL, Randall RJ, Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry.* 1951; 193:265-267.
- Lu B, Nagappan G, Lu Y. BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. *HandbExpPharmacol.* 2014; 220:223-50.
- Luciano M, Corley J, Cox SR, Valdés Hernández MC, Craig LC, Dickie DA, Karama S, McNeill GM, Bastin ME, Wardlaw JM, Deary IJ. Mediterranean type diet and brain structural change from 73 to 76 years in a Scottish cohort. *Neurology.* 2017; 88(5):449-455.
- Luckasson R, Borthwick-Duffy S, Buntinx WGE, Coulter DL, Craig EM, Reeve A, Schalock RL et al. *Mental retardation, definition, classification and systems of supports.* 10ed. Washington, DC: American Association on Mental Retardation. 2002.
- Maeda SS, Borba VZ, Camargo MB, Silva DM, Borges JL, Bandeira F, Lazaretti-Castro M; Brazilian Society of Endocrinology and Metabology (SBEM). Recommendations of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabology (SBEM) for the diagnosis and treatment of hypovitaminosis D. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2014; 58(5):411-33.
- Maloy-Diniz LF, Fuentes D, Mattos P, Abreu N (orgs). *Avaliação Neuropsicológica.* Porto Alegre, RS: Artmed, 2010.
- Mandal D, Fu P, Levine AD. REDOX regulation of IL-13 signaling in intestinal epithelial cells: usage of alternate pathways mediates distinct gene expression patterns. *Cell Signal.* 2010; 22(10):1485-94
- Mangialasche F, Polidori MC, Monastero R, Ercolani S, Camarda C, Cecchetti R, Mecocci P. Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Ageing Res Rev.* 2009; 8(4):285-305.
- Manna P, Jain SK. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. *Metab Syndr Relat Disord.* 2015; 13(10):423-44.
- Manzanero S, Santro T, Arumugam TV. Neuronal oxidative stress in acute ischemic stroke: sources and contribution to cell injury. *Neurochem Int.* 2013; 62(5):712-8.

- Massaro AN, Chang T, Baumgart S, McCarter R, Nelson KB, Glass P. Biomarkers S100B and neuron-specific enolase predict outcome in hypothermia-treated encephalopathic newborns. *Pediatr Crit Care Med*. 2014; 15(7):615-22.
- Mattson MP, Maudsley S, Martin B. BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci*. 2004; 27(10):589-94.
- McConachie H, Colver AF, Forsyth RJ, Jarvis SN, Parkinson KN. Participation of disabled children: how should it be characterised and measured? *DisabilRehabil*. 2006; 28(18):1157-64.
- Michelson DJ, Shevell MI, Sherr EH, Moeschler JB, Gropman AL, Ashwal S. Evidence report: Genetic and metabolic testing on children with global developmental delay: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology*. 2011; 77(17):1629-35
- Miller WM, Mooney SM. Chronic Exposure to Ethanol Alters Neurotrophin Content in the Basal Forebrain–Cortex System in the Mature Rat: Effects on Autocrine–Paracrine Mechanisms. *J Neurobiol*. 2004; 60(4):490-8.
- Mishra AK, Gupta R. Disability index: a measure of deprivation among the disabled. *Economic and Political Weekly*. 2006; 41(38): 4026-29.
- Moeschler JB, Shevell M. Comprehensive evaluation of the child with intellectual disability or global developmental delays. *Pediatrics* 2014; 134(3):903-18.
- Morad M, Gringols M, Kandel I, Merrick J. Vitamin B12 deficiency in persons with intellectual disability in a vegetarian residential care community. *Scientific World Journal*. 2005; 5:58-61
- Moretti R, Torre P, Antonello RM, Cattaruzza T, Cazzato G, Bava A. Vitamin B12 and folate depletion in cognition: a review. *Neurol India*. 2004; 52(3):310-8.
- Morris MJ, Beilharz JE, Maniam J, Reichelt AC, Westbrook RF. Why is obesity such a problem in the 21st century? The intersection of palatable food, cues and reward pathways, stress, and cognition. *Neurosci Biobehav Rev*. 2015; 58:36-45.
- Narisawa-Saito M, Wakabayashi K, Tsuji S, Takahashi H, Nawa H. Regional specificity of alterations in NGF, BDNF and NT-3 levels in Alzheimer's disease. *Neuroreport*. 1996; 7(18):2925-8.
- Nelson KB, Grether JK, Croen LA, Dambrosia JM, Dickens BF, Jelliffe LL et al. Neuropeptides and neurotrophins in neonatal blood of children with autism or mental retardation. *Ann Neurol*. 2001; 49(5):597-606.
- Nerhus M, Berg AO, Simonsen C, Haram M, Haatveit B, Dahl SR et al. Vitamin

D Deficiency Associated With Cognitive Functioning in Psychotic Disorders. *J Clin Psychiatry*. 2017; 78(7):750-57.

Ordóñez FJ, Rosety I, Rosety MA, Camacho-Molina A, Fornieles G, Rosety M, et al. Aerobic training at moderate intensity reduced protein oxidation in adolescents with Down syndrome. *Scand J Med Sci Sports*. 2012; 22(1):91-4.

Ozsurekci Y, Aykac K. Oxidative stress related diseases in newborns. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016: 2768365.

Panfili I, Candiano G, Malova M, De Angelis L, Cardiello V, Buonocore G, Ramenghi LA. Oxidative Stress as a Primary Risk Factor for Brain Damage in Preterm Newborns. *Front Pediatr*. 2018; 6:369.

Parisotto EB, Giaretta AG, Zamoner A, Moreira EA, Fröde TS, Pedrosa RC, Filho DW. Persistence of the benefit of an antioxidant therapy in children and teenagers with Down syndrome. *Res Dev Disabil*. 2015; 45-46:14-20.

Parmenter TR. The present, past and future of the study of intellectual disability: challenges in developing countries. *Salud Pública de México*. 2008; 50:Suppl 2s124-s131.

Perovic M, Tesic V, Mladenovic Djordjevic A, Smiljanic K, Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int*. 2014: 1-19.

Rathod R, Kale A, Joshi S. Novel insights into the effect of vitamin B₁₂ and omega-3 fatty acids on brain function. *J Biomed Sci*. 2016; 23:17.

Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C et al. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet A*. 2006; 140(19):2063-74.

Rech TH, Vieira SRR, Brauner JS. Valor da enolase específica do neurônio como indicador de prognóstico pós-parada cardiorrespiratória. *Rev Bras de Ter Intensiva*. 2006; 18 (4): 396-401.

Reibel S, Larmet Y, Lê BT, Carnahan J, Marescaux C, Depaulis A. Brain-derived neurotrophic factor delays hippocampal kindling in the rat. *Neuroscience*. 2000; 100(4):777-88.

Remor AP, da Silva RA, de Matos FJ, Glaser V, de Paula Martins R, Ghisoni K et al. Chronic Metabolic Derangement-Induced Cognitive Deficits and Neurotoxicity Are Associated with REST Inactivation. *Mol Neurobiol*. 2019; 56(3):1539-57.

Riederer P, Korczyn AD, Ali SS, Bajenaru O, Choi MS, Chopp M et al. The diabetic brain and cognition. *J Neural Transm (Vienna)*. 2017;124(11):1431-1454.

- Robles R, Palomino N, Robles A. Oxidative stress in the neonate. *Early Hum Dev.* 2001; 65 Suppl:S75-81.
- Roux PP, Barker PA. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol.* 2002; 67(3):203-33.
- Row BW, Kheirandish L, Neville JJ, Gozal D. Impaired spatial learning and hyperactivity in developing rats exposed to intermittent hypoxia. *Pediatr Res.* 2002; 52(3):449-53.
- Rush EC, Katre P, Yajnik CS. Vitamin B12: one carbon metabolism, fetal growth and programming for chronic disease. *Eur J Clin Nutr* 2014; 68:2–7.
- Salvador-Carulla L, Bertelli M. 'Mental retardation' or 'intellectual disability': time for a conceptual change. *Psychopathology.* 2008; 41(1):10-6.
- Santos CY, Snyder PJ, Wu WC, Zhang M, Echeverria A, Alber J. Pathophysiologic relationship between Alzheimer's disease, cerebrovascular disease, and cardiovascular risk: A review and synthesis. *Alzheimers Dement (Amst).* 2017; 7:69-87.
- Scarmeas N, Anastasiou CA, Yannakoulia M. Nutrition and prevention of cognitive impairment. *Lancet Neurol.* 2018; 17(11):1006-1015.
- Schalock RL, Borthwick-Duffy SA, Bradley VJ, Buntinx WHE, Coulter DL, Craig EM, Gomez SC et al. *Intellectual Disability: Definition, Classification, and Systems of Supports.* 11ed. Washington, DC: American Association on Intellectual and Developmental Disabilities. 2010.
- Schneider CD, Oliveira AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev Bras Med Esporte.* 2004; 10(4): 308-11.
- Shiihara T, Miyake T, Izumi S, Sugihara S, Watanabe M, Takanashi J, Kubota M, Kato M. Serum and CSF biomarkers in acute pediatric neurological disorders. *Brain Dev.* 2014; 36(6):489-95.
- Siuda J, Gorzkowska A, Patalong-Ogiewa M, Krzystanek E, Czech E, Wiechuła B, Garczorz W, Danch A, Jasińska-Myga B, Opala G. From mild cognitive impairment to Alzheimer's disease - influence of homocysteine, vitamin B12 and folate on cognition over time: results from one-year follow-up. *Neurol Neurochir Pol.* 2009; 43(4):321-9.
- Soni M, Kos K, Lang IA, Jones K, Melzer D, Llewellyn DJ. Vitamin D and cognitive function. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 2012;243:79-82.
- Steckert AV, Valvassori SS, Moretti M, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Role of oxidative stress in the pathophysiology of bipolar disorder. *Neurochem Res.* 2010; 35(9):1295-301.

Steullet P, Cabungcal JH, Coyle J, Didriksen M, Gill K, Grace AA, Hensch TK, LaMantia AS, Lindemann L, Maynard TM, Meyer U, Morishita H, O'Donnell P, Puhl M, Cuenod M, Do KQ. Oxidative stress-driven parvalbumin interneuron impairment as a common mechanism in models of schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2017; 22(7):936-43.

Styck KM, Watkins MW. Structural Validity of the WISC-IV for Students With ADHD. *J Atten Disord*. 2017; 21(11):921-928.

Takano K, Goto K, Motobayashi M, Wakui K, Kawamura R, Yamaguchi T, Fukushima Y, Kosho T. Early manifestations of epileptic encephalopathy, brain atrophy, and elevation of serum neuron specific enolase in a boy with beta-propeller protein-associated neurodegeneration. *Eur J Med Genet*. 2017; 60(10):521-6.

Takano K, Shiba N, Wakui K, Yamaguchi T, Aida N, Inaba Y, Fukushima Y, Kosho T. Elevation of neuron specific enolase and brain iron deposition on susceptibility-weighted imaging as diagnostic clues for beta-propeller protein-associated neurodegeneration in early childhood: Additional case report and review of the literature. *Am J Med Genet A*. 2016; 170A(2):322-8.

Tédde S. Crianças com deficiência intelectual: a aprendizagem e a inclusão [Dissertação de mestrado]. Programa de Pós-Graduação - Mestrado em Educação. Americana (SP): Centro Universitário Salesiano de São Paulo; 2012.

Thanan R, Oikawa S, Hiraku Y, Ohnishi S, Ma N, Pinlaor S, Yongvanit P, Toscano CD, Guilarte TR. Lead neurotoxicity: from exposure to molecular effects. *Brain Res Brain Res Rev*. 2005; 49(3):529-54

Triaca V, Sposato V, Bolasco G, Ciotti MT, Pelicci P, Bruni AC, Cupidi C, Maletta R, Feligioni M, Nisticò R, Canu N, Calissano P. NGF controls APP cleavage by downregulating APP phosphorylation at Thr668: relevance for Alzheimer's disease. *Aging Cell*. 2016; 15(4):661-72.

Udayabanu M, Kumaran D, Nair RU, Srinivas P, Bhagat N, Aneja R, Katyal A. Nitric oxide associated with iNOS expression inhibits acetylcholinesterase activity and induces memory impairment during acute hypobaric hypoxia. *Brain Res* 2008; 1230:138-149.

Van Karnebeek CD, Jansweijer MC, Leenders AG, Offringa M, Hennekam RC. Diagnostic investigations in individuals with mental retardation: a systematic literature review of their usefulness. *Eur J Hum Genet*. 2005; 13(1):6-25.

Vasconcelos MM. Retardo mental. *Jornal de pediatria*. 2004; 80(2): 71-82.

Venkatramanan S, Armata IE, Strupp BJ, Finkelstein JL. Vitamin B-12 and Cognition in Children. *Adv Nutr*. 2016; 7(5):879-88.

Vissers LE, Gilissen C, Veltman JA. Genetic studies in intellectual disability and related disorders. *Nat Rev Genet*. 2016; 17(1):9-18.

Wang S, Irving G, Jiang L, Wang H, Li M, Wang X, Han W, Xu Y, Yang Y, Zeng T, Song F, Zhao X, Xie K. Oxidative Stress Mediated Hippocampal Neuron Apoptosis Participated in Carbon Disulfide-Induced Rats Cognitive Dysfunction. *Neurochem Res*. 2017; 42(2):583-94.

World Health Organization (WHO). The ICD-10 Classification of mental and behavioural disorders: clinical descriptions and diagnostic guidelines: Chapter V: mental retardation (F70-F79). 10ed. 2010.

Wu DM, Lu J, Zhang YQ, Zheng YL, Hu B, Cheng W, Zhang ZF, Li MQ. Ursolic acid improves domoic acid-induced cognitive deficits in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013; 271(2):127-36.

Yamada K, Mizuno M, Nabeshima T. Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory. *Life Sci*. 2002; 70(7):735-44. Review.

Yang C, Liu Y, Ni X, Li N, Zhang B, Fang X. Enhancement of the nonamyloidogenic pathway by exogenous NGF in an Alzheimer transgenic mouse model. *Neuropeptides*. 2014; 48(4):233-8.

Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*. 1994; 74(1):139-62.

Zandi PP, Anthony JC, Khachaturian AS, Stone SV, Gustafson D, Tschanz JT, Norton MC, Welsh-Bohmer KA, Breitner JC; Cache County Study Group. Reduced risk of Alzheimer disease in users of antioxidant vitamin supplements: the Cache County Study. *Arch Neurol*. 2004; 61(1):82-8.

Zhang DM, Ye JX, Mu JS, Cui XP. Efficacy of Vitamin B Supplementation on Cognition in Elderly Patients With Cognitive-Related Diseases. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 2017; 30(1):50-9.

Zhang J, Guo W, Tian B, Sun M, Li H, Zhou L, Liu X. Puerarin attenuates cognitive dysfunction and oxidative stress in vascular dementia rats induced by chronic ischemia. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015; 8(5):4695-704.

Zhu X, Raina AK, Perry G, Smith MA. Alzheimer's disease: the two-hit hypothesis. *Lancet Neurol*. 2004; 3(4):219-26.

Žitnanová I, Korytár P, Sobotová H, Horáková L, Sustrová M, Püeschel S, Duracková Z. Markers of oxidative stress in children with Down syndrome. *Clin Chem Lab Med*. 2006; 44(3):306-10.

Zoethout RW, Delgado WL, Ippel AE, Dahan A, van Gerven JM. Functional biomarkers for the acute effects of alcohol on the central nervous system in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol*. 2011; 71(3):331-50.

Žurek J, Fedora M. The usefulness of S100B, NSE, GFAP, NF-H, secretagogin and Hsp70 as a predictive biomarker of outcome in children with traumatic brain injury. *Acta Neurochir (Wien)*. 2012; 154(1):93-103.

ANEXO

ANEXO 1 – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA EM SERES HUMANOS DA UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE

UNIVERSIDADE DO EXTREMO
SUL CATARINENSE - UNESC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES SÉRICOS EM PLASMA DE CRIANÇAS COM DEFICIÊNCIA INTELLECTUAL ATENDIDAS EM UM CENTRO ESPECIALIZADO EM REABILITAÇÃO E SUA CORRELAÇÃO COM FATORES GESTACIONAIS E ALIMENTARES

Pesquisador: Lisiane Tuon Generoso Bitencourt

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 44961115.5.0000.0119

Instituição Proponente: Universidade do Extremo Sul Catarinense

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.212.173

Continuação do Parecer: 1.212.173

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_atualizado.docx	20/08/2015 22:44:51	Lisiane Tuon Generoso Bitencourt	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	20/08/2015 22:45:36	Lisiane Tuon Generoso Bitencourt	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	20/08/2015 22:53:22	Lisiane Tuon Generoso Bitencourt	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_515244.pdf	20/08/2015 22:53:53		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CRICIUMA, 02 de Setembro de 2015