



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATORIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA A SAÚDE

THAYSA WALLERIA DE ARAGÃO SANTOS

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO ESTRESSE
OXIDATIVO EM PACIENTES COM CARDIOPATIAS CONGÊNITAS**

RECIFE

2019

THAYSA WALLERIA DE ARAGÃO SANTOS

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO ESTRESSE
OXIDATIVO EM PACIENTES COM CARDIOPATIAS CONGÊNITAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Aplicada a Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Área de concentração: Biologia Aplicada à Saúde

Orientador: Prof^a. Dr^a. Danyelly Bruneska Gondim Martins.

RECIFE

2019

THAYSA WALLERIA DE ARAGÃO SANTOS

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO ESTRESSE
OXIDATIVO EM PACIENTES COM CARDIOPATIAS CONGÊNITAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Aplicada a saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Aprovada em: 12/03/2019

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Danyelly Bruneska Gondim Martins
Departamento de Bioquímica - Centro de Biociências – CB/UFPE

Prof^ª. Dr^ª. Jaqueline de Azevêdo Silva
Departamento de Genética - Centro de Biociências – CB/UFPE

Dr^ª Sandra da Silva Mattos
Cardiologia Materno-Fetal e Centro de Estudos - Real Hospital Português de Beneficência em Pernambuco

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Santos, Thaysa Walleria de Aragão

Avaliação da expressão de genes envolvidos no estresse oxidativo em pacientes com cardiopatias congênitas / Thaysa Walleria de Aragão Santos- 2019.

77 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Danyelly Brunaska Gondim Martins

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde. Recife, 2019.
Inclui referências e anexo

1. Doença cardíaca congênita 2. Estresse oxidativo 3. Sirtuínas I. Martins, Danyelly Brunaska Gondim (orient.) II. Título

616.12

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-018

*À minha família, por todo apoio,
dedico*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que tornou tudo possível, apesar de todas as dificuldades encontradas nesses dois anos de mestrado.

Agradeço à minha família que sempre me encorajou, em especial minha mãe, Simone, e minhas irmãs Jullyana e Izabella, que me apoiaram e ficaram do meu lado sempre. Amo vocês. Agradeço à minha tia Valéria, que sempre cuidou de mim como uma mãe.

Meu namorado, Matheus, que esteve comigo nos meus melhores e piores momentos do mestrado. Obrigada pelas caronas, pelas conversas de encorajamento, por acreditar em mim, me apoiar e ajudar. Obrigada por saber da minha pesquisa tanto quando eu. Não sei como seria sem você ao meu lado. Agradeço também aos meus sogros que sempre me apoiaram e oraram por mim.

Agradeço às minhas “Biomédivas” – Larissa, Jade, Adriana e Natália, pela amizade verdadeira que começou no primeiro dia de aula da graduação e continua firme e forte, mesmo com a correria dos experimentos do mestrado. Um agradecimento especial à minha melhor amiga, Lari, por todo apoio, por todos os almoços, sobremesas na Thorpes, conversas e tarde de compras na Polidoro. Obrigada por tornar tudo mais feliz.

Agradeço à minha orientadora, Danyelly Brunaska, pelos dias felizes com curvas de *melting* lindas e pelos dias tristes e sofridos com extrações no *Maxwell*. Acima de tudo me encorajar a tentar novamente (e novamente) e mudar tudo completamente. E sempre sorrindo me incentivando a ser mais otimista. E que venha o doutorado porque “trabalho não falta”.

Agradeço a todos do LIKA, do grupo PROSPECMOL – Grupo de Prospecção Molecular e Bioinformática, que me ajudaram tanto em experimentos quanto em conversas de apoio. Em especial, minha amiga de mestrado, Ananda, que acompanhou de perto todos os perrengues e alegrias desses dois anos.

Agradeço a todos aqueles que indiretamente ou diretamente contribuíram e influenciaram para minha formação acadêmica e científica.

“Acima de tudo, não tema os momentos difíceis, o melhor vem deles.”

Rita Levi-Montalcini

RESUMO

As doenças cardíacas congênitas (DCC) lideram as anormalidades fetais, e pacientes com DCC apresentam mais chances de desenvolver síndrome metabólica (SMet). Alterações de genes relacionados ao estresse oxidativo, como *eNOS* e *NRF2*, estão associadas a vários componentes da SMet. As sirtuínas (SIRT), família de sete isoformas (SIRT1-SIRT7) também envolvidas em processos oxidativos, podem ter efeito protetor ou prejudicial. Síndrome de Down (SD) é a anormalidade cromossômica autossômica mais frequentemente associada às DCC, representando um dos principais fenótipos da SD na primeira infância. Além disso, indivíduos com SD têm mais chances de desenvolver SMet, mas não está claro o papel de moléculas relacionadas ao estresse oxidativo em pacientes com DCC/SD. **OBJETIVO:** Avaliar a expressão dos genes *SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3*, *SIRT4*, *SIRT5*, *SIRT6*, *SIRT7*, *eNOS* e *NRF2* em pacientes com cardiopatias congênitas e síndrome de Down, correlacionando-a com a possibilidade de desenvolvimento de síndrome metabólica. **METODOLOGIA:** Foram avaliados 40 indivíduos divididos em 4 grupos: 5 pacientes com DCC, 20 pacientes com DCC/SD, 11 pacientes com SD e 4 pacientes saudáveis. Os níveis de expressão dos genes *eNOS*, *NRF2*, *SIRT1-7* foram avaliados através de PCR em tempo real, e os resultados foram correlacionados aos dados clínicos. **RESULTADOS:** Defeito do septo atrioventricular e defeito do septo ventricular foram as DCC mais frequentes nos pacientes avaliados (com SD e sem SD), apresentando 28,85% cada - seguidos por canal arterial persistente (23,08%) e defeito do septo atrial (9,61%). Os genes *SIRT2*, *SIRT4*, *eNOS* e *NRF2* se apresentaram *down regulated* nos grupos avaliados, enquanto *SIRT5* se mostrou *up regulated*. Nas análises da *SIRT1*, 60% dos pacientes com DCC/SD se apresentou *up regulated*, enquanto nas análises de *SIRT3*, 75% estava *down regulated*. Não foi detectada expressão das *SIRT6* e *SIRT7*. Entre as sirtuínas mitocondriais *SIRT4* e *SIRT5*, houve uma correlação regular positiva. Entre os genes *NRF2* e *SIRT1* e entre *NRF2* e *SIRT5* foram encontradas correlações regulares positivas. Quando avaliada a expressão e idade dos pacientes, *eNOS* e *SIRT3* apresentaram correlações regulares. Demais genes apresentaram fraca correlação. **CONCLUSÃO:** A diminuição de *SIRT1* e *SIRT2* pode contribuir para o estresse oxidativo em pacientes com DCC. *SIRT3* e *SIRT4* parecem estar mais relacionadas a indivíduos com SD do que com DCC. *SIRT5* aumentada pode representar um mecanismo protetor contra eventos oxidativos e desenvolvimento de SMet. Houve uma baixa expressão de *eNOS* e *NRF2*. Condições que levam ao aumento de estresse oxidativo podem aumentar as chances de desenvolvimento de SMet em pacientes com DCC.

Palavras-Chave: Doença Cardíaca Congênita. Estresse Oxidativo. Sirtuínas.

ABSTRACT

Congenital heart diseases (CHD) are the most frequent of the fetal abnormalities, and patients with CHD are more likely to develop metabolic syndrome (MetS). Alterations to genes related to oxidative stress, such as *eNOS* and *NRF2*, are associated to many components of MetS. The sirtuins (SIRT) are a family of seven isoforms (SIRT1-SIRT7) which are involved in oxidative processes and may have protective or harmful effects. Down Syndrome (DS) is the autosomal chromosomal abnormality most often associated to CHD, which represents the main DS phenotype in early childhood. Those with DS have more chances of developing MetS, but the role of molecules related to oxidative stress on patients with CHD/DS is still not clear.

OBJECTIVE: To evaluate the expression of the *SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3*, *SIRT4*, *SIRT5*, *SIRT6*, *SIRT7*, *eNOS* and *NRF2* genes in patients with congenital heart diseases and Down Syndrome, correlating it to the possibility of developing metabolic syndrome. **METHODOLOGY:** 40 subjects were evaluated and divided in 4 groups: 5 patients with CHD, 20 patients with CHD/DS, 11 patients with DS and 4 healthy patients. The expression levels of the *eNOS*, *NRF2*, *SIRT1-7* genes were evaluated through real-time PCR, and the results were correlated to their clinical data. **RESULTS:** Atrioventricular septal defect and ventricular septal defect were the most frequent CHD found on the evaluated patients (with DS and without DS), at a rate of 28,85% each – followed by patent ductus arteriosus (23,08%) and atrial septal defect (9,61%). The *SIRT2*, *SIRT4*, *eNOS* and *NRF2* genes were found to be *down regulated* in the evaluated groups, while the *SIRT5* gene was *up regulated*. *SIRT1* analyzes showed 60% of patients with CHD/DS to be *up regulated*, while analyzes of *SIRT3* showed 75% of patients to be *down regulated*. No expression of *SIRT6* and *SIRT7* was detected. Among the mitochondrial sirtuins *SIRT4* and *SIRT5*, there was a moderate positive correlation. Between the *NRF2* and *SIRT1* genes and the *NRF2* and *SIRT5* genes, moderate positive correlations were found. The *eNOS* and *SIRT3* genes showed moderate correlations between gene expression and patient age. The remaining genes presented weak correlations. **CONCLUSION:** The decrease in *SIRT1* and *SIRT2* may contribute to oxidative stress in patients with CHD. *SIRT3* and *SIRT4* seem to be more related to subjects with DS than to subjects with CHD. Increased *SIRT5* may represent a protective mechanism against oxidative events and the development of MetS. There was a low expression of *eNOS* and *NRF2*. Conditions that lead to an increase of oxidative stress may increase the chances of developing MetS for patients with CHD.

Key Words: Congenital Heart Disease. Oxidative stress. Sirtuins.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	PLANO GLOBAL PARA PREVENÇÃO E CONTROLE DE DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS 2013-2020.....	20
FIGURA 2 -	CAUSAS DE MORTE NO PERÍODO NEONATAL EM 2015. ANOMALIAS CONGÊNITAS SÃO IMPORTANTES CAUSAS DE MORTALIDADE E MORBIDADE APÓS O NASCIMENTO.....	22
FIGURA 3 -	CARIÓTIPO DE PACIENTE COM SÍNDROME DE DOWN. A SETA VERMELHA DEMONSTRA A TRISSOMIA DO CROMOSSOMO 21 (PATRÍCIA ET AL., 2014)	24
FIGURA 4 -	DEFEITOS CONGÊNTOS CARDÍACOS MAIS COMUNS NA SD. ADAPTADA DA ASSOCIAÇÃO AMERICANA DO CORAÇÃO.....	26
FIGURA 5 -	ASSOCIAÇÃO MOLECULAR DAS SIRTUÍNAS COM GENES SINALIZADORES ANTIOXIDANTES. EM DESTAQUE, A CORRELAÇÃO DAS SIRT E NRF2 E ENOS.....	30
FIGURA 6 -	DISTRIBUIÇÃO DAS SIRTUÍNAS NA CÉLULA. AS SIRT 1 , 6 E 7 SÃO ENCONTRADAS PRINCIPALMENTE NO NÚCLEO, A SIRT2 NO CITOPLASMA E AS SIRT 3, 4 E 5 SÃO ENCONTRADAS NAS MITOCÔNDRIAS (WANG ET AL., 2019).....	31
FIGURA 7 -	FUNÇÕES BIOLÓGICAS DA SIRT1. ADAPTADO DE NAKAGAWA ET AL., 2011.....	34
FIGURA 8 -	O GENE ENOS, LOCALIZADO NO CROMOSSOMO 7, E SEUS EFEITOS BIOLÓGICOS CAUSADOS POR ALTERAÇÕES NOS NÍVEIS DE NO. ADAPTADA DE VECOLI ET AL., 2014.....	37
FIGURA 9 -	VIA DE ATIVAÇÃO DO NRF2. ADAPTADO DE ZANG ET AL., 2015	39
FIGURA 10 -	DEFEITOS CARDÍACOS CONGÊNTOS EM PACIENTES COM SD E SUAS RESPECTIVAS IDADES.....	45
FIGURA 11 -	DEFEITOS CARDÍACOS CONGÊNTOS EM PACIENTES SEM SD E SUAS RESPECTIVAS IDADES.....	46
FIGURA 12 -	GRÁFICO DA EXPRESSÃO RELATIVA DE SIRT1.....	48
FIGURA 13 -	GRÁFICO DA EXPRESSÃO RELATIVA DE SIRT2.....	49
FIGURA 14 -	GRÁFICO DA EXPRESSÃO RELATIVA DE SIRT3.....	50
FIGURA 15 -	GRÁFICO DA EXPRESSÃO RELATIVA DE SIRT4.....	50

FIGURA 16 -	GRÁFICO DA EXPRESSÃO RELATIVA DE SIRT5.....	51
FIGURA 17 -	GRÁFICO DA EXPRESSÃO RELATIVA DE NRF2.....	52
FIGURA 18 -	GRÁFICO DE REGRESSÃO LINEAR RELACIONANDO A EXPRESSÃO DOS GENES SIRT4 E SIRT5.....	53
FIGURA 19 -	GRÁFICO DE REGRESSÃO LINEAR RELACIONANDO A EXPRESSÃO DOS GENES NRF2 E SIRT1.....	53
FIGURA 20 -	GRÁFICO DE REGRESSÃO LINEAR RELACIONANDO A EXPRESSÃO DOS GENES NRF2 E SIRT5.....	54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DEFINIÇÃO DE SÍNDROME METABÓLICA DE ACORDO COM A FUNDAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES. ADAPTADO DE DEEN ET AL., 2016.....	21
TABELA 2 - SEQUÊNCIA DE PRIMERS UTILIZADOS NA QPCR EM TEMPO REAL.....	42
TABELA 3 - FÓRMULAS UTILIZADAS PARA OS CÁLCULOS DE Δ CT E $\Delta\Delta$ CT. ...	42
TABELA 4 - TIPOS DE DOENÇAS CONGÊNITAS ENCONTRADAS EM PACIENTES COM SD E SEM SD.	44
TABELA 5 - RESULTADOS DA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE SIRT (SIRT1-SIRT7), ENOS E NRF2.....	47
TABELA 6 - CORRELAÇÃO ENTRE IDADE DOS PACIENTES E EXPRESSÃO GÊNICA.	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAP	Canal arterial persistente
cDNA	DNA complementar
CT	Limiar de ciclo, do inglês <i>cycle threshold</i>
CXR	Carboxy-X-Rhodamine
DCC	Doenças cardíacas congênitas
DCV	Doenças cardiovasculares
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSA	Defeito do septo atrial
DSAV	Defeito do septo atrioventricular
DSV	Defeito do septo ventricular
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERA	Elementos de resposta antioxidante
EVP	Estenose da valva pulmonar
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
HDAC	Histona desacetilase
HDL	Colesterol de alta densidade
IGF1R	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IMC	Índice de massa corpórea
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NAD ⁺	NAD oxidada
NADH	NAD reduzida
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NRF2	Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2
OMS	Organização Mundial de Saúde
PPAR γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-γ</i>
qPCR	PCR quantitativa em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico

RNA _m	RNA mensageiro
RNS	Espécies reativas de nitrogênio, do inglês <i>reactive nitrogen species</i> .
ROS	Espécies reativas de oxigênio, do inglês <i>reactive oxygen species</i> .
SD	Síndrome de Down
SIRT1	Sirtuína 1
SIRT2	Sirtuína 2
SIRT3	Sirtuína 3
SIRT4	Sirtuína 4
SIRT5	Sirtuína 5
SIRT6	Sirtuína 6
SIRT7	Sirtuína 7
SIRT	Sirtuínas
SMet	Síndrome metabólica
TF	Tetralogia de Fallot
TGA	Transposição de grandes artérias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OBJETIVOS.....	18
1.1.1	Geral	18
1.1.2	Específicos	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	DOENÇAS CARDIOVASCULARES	19
2.2	ANOMALIAS CONGÊNITAS	21
2.3	DOENÇAS CARDÍACAS CONGÊNITAS NA SÍNDROME DE DOWN.	24
2.4	ESTRESSE OXIDATIVO E SÍNDROME METABÓLICA	27
2.5	ESTRESSE OXIDATIVO NA SÍNDROME DE DOWN	28
2.6	GENES RELACIONADOS AO ESTRESSE OXIDATIVO	29
2.6.1	Sirtuínas	29
2.6.1.1	Sirtuína citoplasmática	31
2.6.1.2	Sirtuínas mitocondriais	32
2.6.1.3	Sirtuínas nucleares	33
2.6.2	eNOS.....	35
2.6.3	NRF2	38
3	METODOLOGIA.....	40
3.1	AMOSTRAS.....	40
3.2	EXTRAÇÃO DE RNA	40
3.3	SÍNTESE DE cDNA	41
3.4	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA	41
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
4	RESULTADOS.....	44
4.1	PREVALÊNCIA DAS DOENÇAS CONGÊNITAS CARDÍACAS	44
4.2	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES	46
4.2.1	Análises das sirtuínas	47
4.2.1.1	Sirtuínas nucleares	47
4.2.1.2	Sirtuína citoplasmática	48
4.2.1.3	Sirtuínas mitocondriais	49
4.2.2	Análises do gene <i>eNOS</i>	51
4.2.3	Análises do gene <i>NRF2</i>	51
4.3	REGRESSÃO LINEAR ENTRE A EXPRESSÃO DOS GENES	52
4.4	ANÁLISE DA CORRELAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO DOS GENES E IDADE DOS PACIENTES	54
5	DISCUSSÃO	55
5.1	FREQUÊNCIA DE DOENÇAS CARDÍACAS CONGÊNITAS	55
5.2	ANÁLISE DE SIRTUÍNAS	56
5.2.1	Sirtuínas Nucleares	56

5.2.2	Sirtuína citoplasmática	58
5.2.3	Sirtuínas Mitocondriais	59
5.3	GENE <i>eNOS</i>	60
5.4	GENE <i>NRF2</i>	61
6	CONCLUSÃO.....	64
	REFERÊNCIAS.....	65
	ANEXO A	75

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o último relatório da Organização Mundial de Saúde, as doenças cardiovasculares foram responsáveis por 44% das mortes por doenças crônicas não transmissíveis. Além dos fatores genéticos, fatores de estilo de vida influenciam na predisposição ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e suas complicações (WHO, 2018).

Assim como as doenças cardiovasculares (DCV) adquiridas, as doenças cardíacas congênitas (DCC) são liderança em mortalidade e morbidade em pacientes com malformações congênitas (CARVALHO, 2002). Adultos com DCC possuem maiores chances de desenvolvimento de síndrome metabólica (SMet) em relação à população em geral, devido à alterações metabólicas (DEEN et al., 2016; HSIEH et al., 2008).

DCC é o principal fenótipo relacionado à Síndrome de Down (SD), que tem como base genética a presença de três cópias do cromossomo 21 e resulta em diversas alterações no desenvolvimento físico e cognitivo (PFITZER et al., 2018; PLAIASU, 2017). Além disso, indivíduos com SD apresentam mais chances de desenvolver complicações relacionadas a fatores de maior predisposição ao desenvolvimento de DCV e SMet (KELLY et al., 2018). A SMet está associada ao risco aumentado de desenvolvimento das DCV e de diabetes tipo 2 e suas complicações (DEEN et al., 2016; HSIEH et al., 2008).

Estresse oxidativo está envolvido em diversas funções fisiológicas, porém é bem estabelecido que, quando há um desbalanço entre fatores antioxidantes e pró-oxidantes, há maiores chances de desenvolver SMet (ZHANG et al., 2015). Algumas moléculas como eNOS e NRF2 são conhecidas pela sua função antioxidante, sendo, dessa forma, protetoras contra o estresse oxidativo e também suas consequências. As sirtuínas (SIRT), por sua vez, são uma família de sete isoformas (SIRT1-SIRT7) que podem ter efeitos antioxidantes (SIRT1, 3 e 5), pró-oxidantes (SIRT2, 6 e 7) ou atuar nos dois efeitos (SIRT4) (SINGH et al., 2018). Alterações na expressão dos genes oxidantes *eNOS* e *NRF2* também estão relacionadas a vários componentes da síndrome metabólica, e isso pode se dar pelo seu papel no estresse oxidativo (CAI; HARRISON, 2000; XUE et al., 2013).

Há uma associação entre indivíduos com SD e alterações no ambiente mitocondrial com aumento do estresse oxidativo, principalmente por alguns genes presentes no cromossomo 21 terem papel na modulação dos níveis de estresse oxidativo (ARBUZOVA et al., 2002). Dessa forma, processos oxidativos podem ter um importante papel na predisposição ao desenvolvimento de SMet em pacientes com síndrome de Down.

Assim, levando em consideração os efeitos do estresse oxidativo em pacientes com DCC/SD e o conhecimento do papel de genes antioxidantes e pró-oxidantes na predisposição ao desenvolvimento de doenças metabólicas, é importante avaliar a expressão dos genes *SIRT* (*SIRT1-SIRT7*), *eNOS* e *NRF2* para determinar seu potencial preditivo para DCC, e possíveis implicações no desenvolvimento de síndrome metabólica nestes pacientes.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Avaliar o perfil de expressão dos genes *SIRT1-7*, *eNOS*, *NRF2* em pacientes com cardiopatias congênitas e síndrome de Down, avaliando sua correlação.

1.1.2 Específicos

- Avaliar os níveis de expressão dos genes *SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT6* e *SIRT7* e a influência no estresse oxidativo em pacientes com a doença cardíaca congênita e síndrome de Down;
- Analisar os níveis de expressão de sirtuínas mitocondriais *SIRT3*, *SIRT4* e *SIRT5* e sua relação com o estresse oxidativo e sua influência no processo da doença cardíaca congênita e síndrome de Down;
- Avaliar os níveis de expressão de moléculas antioxidantes - *eNOS* e *NRF2* - em pacientes com cardiopatias congênitas e síndrome de Down;
- Correlacionar a expressão com os dados clínicos disponíveis;

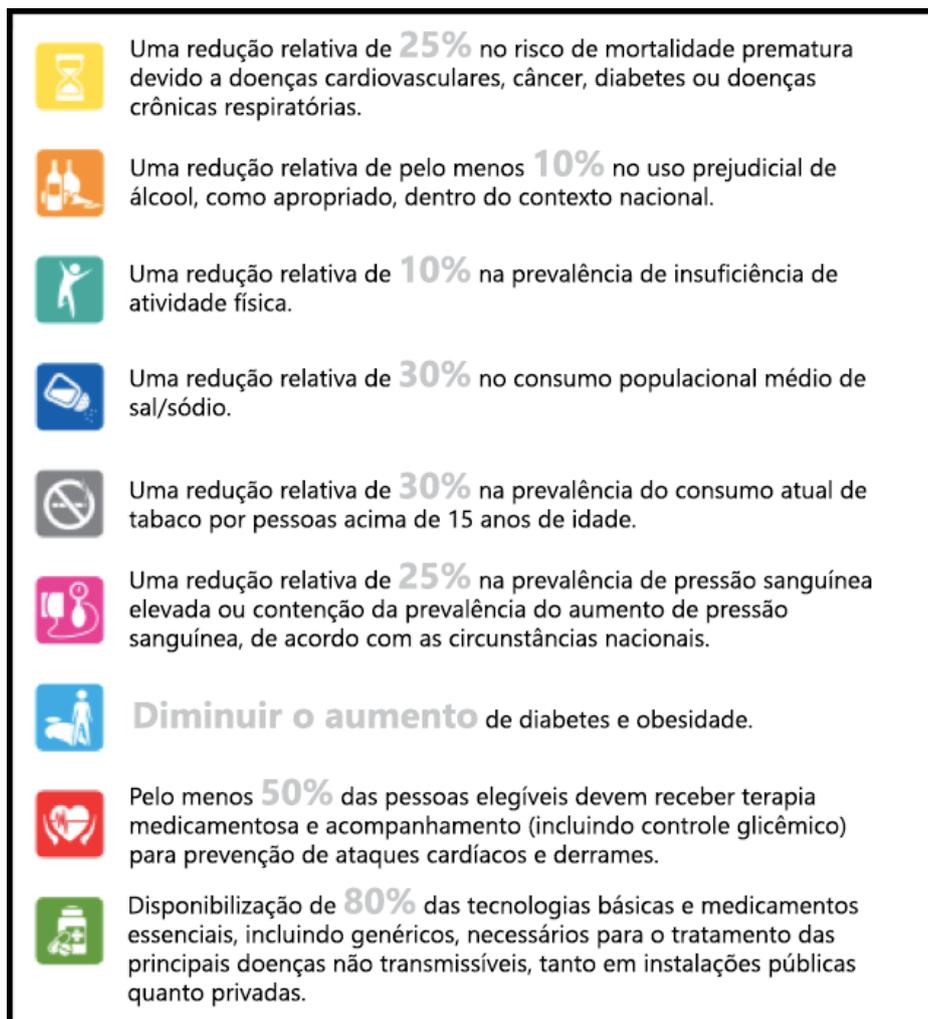
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES

DCV são a principal causa de morte no mundo, com estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 17.9 milhões de mortes por DCV em 2016 (31% do número de mortes no mundo). Além dos fatores genéticos hereditários, alguns fatores de risco para DCV são bem difundidos, como dieta rica em gorduras e carboidratos, inatividade física e uso de drogas como tabaco e álcool. A presença desses fatores de risco leva ao aumento da pressão arterial, dos níveis de glicose e de lipídios no sangue, e pode acarretar em distúrbios do peso e obesidade – elevando o risco de desenvolver doença coronária, ataque cardíaco, derrame, falência cardíaca e outras complicações cardiovasculares (WHO, 2017).

DCV são um grupo de desordens no coração e nos vasos sanguíneos, e incluem: doença coronária cardíaca, doença cerebrovascular, doença reumática cardíaca, trombose profunda, embolia pulmonar e doença cardíaca congênita (JOSEPH et al., 2017). Tendo como base a importância de evitar os fatores modificáveis, a OMS elaborou um “Plano global para prevenção e controle de doenças crônicas não transmissíveis 2013-2020” que inclui ações como a redução da prevalência de hipertensão, implementando políticas para reduzir uso excessivo de álcool, inatividade física, sobrepeso e obesidade (WHO, 2013) (Fig. 1).

Figura 1. Plano global para prevenção e controle de doenças crônicas não transmissíveis 2013-2020



Fonte: Adaptado de WHO, 2013.

A SMet está associada ao risco aumentado de desenvolvimento das DCV e de diabetes tipo 2 e suas complicações. A SMet é caracterizada por várias alterações metabólicas, dentre as quais destacam-se: obesidade, resistência à insulina, níveis elevados de triglicérides e de glicose em jejum, níveis diminuídos de colesterol de alta densidade (HDL), e hipertensão (DEEN et al., 2016; HSIEH et al., 2008).

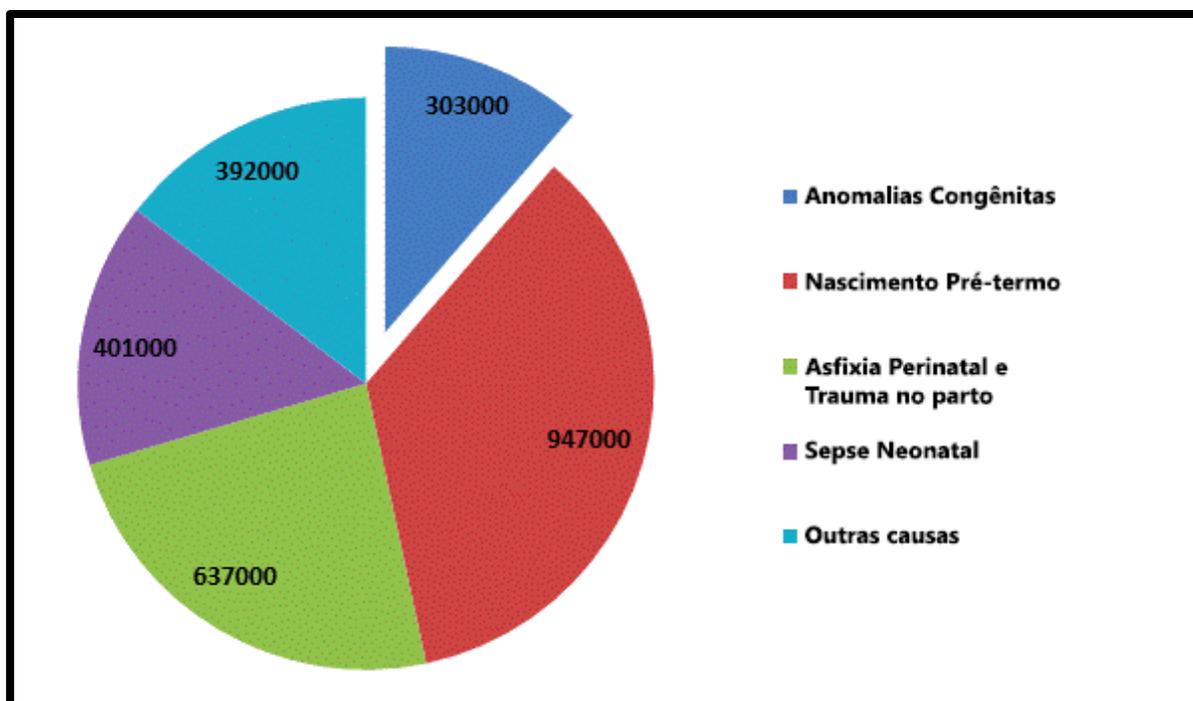
Tabela 1. Definição de síndrome metabólica de acordo com a Fundação Internacional de Diabetes. Adaptado de Deen et al., 2016.

Obesidade (definida como circunferência abdominal* com valores étnicos específicos) e mais duas características abaixo:	
Hipertensão	Pressão sanguínea sistólica > 130mm Hg ou pressão sanguínea diastólica > 85 mm Hg
	Ou tratamento de hipertensão previamente diagnosticada
Hipertrigliceridemia	>150 mg/dL
	Ou tratamento para anormalidades lipídicas
Redução de HDL (lipoproteína de alta densidade)	<40 mg/dL em homens
	<50 mg/dL em mulheres
	Ou tratamento para anormalidades lipídicas
Hiperglicemia em jejum	>100 mg/dL
	Ou diabetes previamente diagnosticada
* Se o IMC for >30 kg/m ² , a obesidade pode ser determinada e a circunferência abdominal não precisa ser mensurada.	

2.2 ANOMALIAS CONGÊNITAS

Anomalias congênitas, também conhecidas como desordens ou malformações congênitas, são importantes causas de morte neonatal e na infância, além de levarem a doenças crônicas e problemas no desenvolvimento. As malformações congênitas foram responsáveis por 303.300 mortes durante o período neonatal em 2015, correspondendo a aproximadamente 11,3% das mortes de neonatos no ano (WHO, 2016) (Fig. 2).

Figura 2. Causas de morte no período neonatal em 2015. Anomalias congênicas são importantes causas de mortalidade e morbidade após o nascimento.



Fonte: Adaptado de WHO, 2016.

As anomalias congênicas podem ser estruturais ou funcionais. Elas ocorrem no período intrauterino, podendo ser identificadas no pré-natal, após o nascimento ou durante a infância. As desordens congênicas mais graves e comuns são doenças cardíacas congênicas, defeitos no tubo neural e síndrome de Down. Essas malformações não possuem causas definidas, porém acredita-se que aproximadamente 50% de todas as anomalias congênicas não estão relacionadas a apenas uma causa, mas sim ao conjunto de causas genéticas, do ambiente e outros fatores de risco (KELLY et al., 2018).

As DCC são as anomalias mais frequentes no feto, sendo aproximadamente seis vezes mais frequentes que anormalidades cromossômicas e quatro vezes mais comuns que defeitos no tubo neural (CARVALHO, 2002). Estima-se que a população de adultos com DCC é de 1,2 milhões na Europa e 1 milhão nos EUA, com tendência a aumentar (VERHEUGT et al., 2010). No Brasil, DCC são a principal causa de morte de crianças com anormalidades congênicas e, por isso, a implementação de políticas de saúde pública podem levar à diminuição da mortalidade desses indivíduos. Em um estudo feito no Brasil em 2018, dentre as desordens

neurológicas e malformações relacionadas a DCC, a síndrome de Down liderou a incidência de anormalidades cromossômicas (ROCHA et al., 2018).

Com os avanços da pediatria, as DCC são tratadas na infância e a maioria dessas crianças sobrevive até a idade adulta (DEEN et al., 2016). Entretanto, alguns estudos revelaram que pacientes com DCC apresentam maiores chances de desenvolver alterações cardiovasculares como aterosclerose e doença da artéria coronária, resultando em morte (VERHEUGT et al., 2010). Uma forte associação também foi encontrada entre hipertensão, hiperlipidemia e DCC (GIANNAKOULAS et al., 2009).

Uma pesquisa com 448 adultos portadores de DCC revelou maiores chances de desenvolvimento de SMet em relação à população em geral, devido aos maiores níveis de triglicerídeos e de glicemia em jejum, menor nível de lipoproteína de alta densidade (HDL) e presença de obesidade (DEEN et al., 2016). Dessa forma, há a necessidade de uma avaliação prévia dos fatores de risco para SMet nos pacientes com DCC, além de medidas preventivas, como monitoramento da pressão arterial, resistência a insulina e avaliação do perfil lipídico regularmente.

Além disso, pacientes com DCC apresentam restrições quanto à prática de atividades físicas, levando a um estilo de vida sedentário, que por sua vez é um fator de risco para obesidade e, conseqüentemente, SMet (DEEN et al., 2016). A obesidade, então, já foi relatada associada a DCC e DCV adquiridas em crianças, e, junto com o sobrepeso, estão presentes em aproximadamente 30% da população pediátrica com DCC. A obesidade infantil pode estar também relacionada à hipertensão sistêmica, diabetes tipo 2 e disfunções endoteliais, sendo um preditor para doença arterial coronária e morte prematura na fase adulta (COHEN, 2012; PINTO et al., 2007). Sendo assim, a avaliação de crianças com DCC desde a infância torna-se uma medida preventiva para o desenvolvimento de SMet no futuro.

Em contrapartida, foi encontrada em um estudo recente uma maior frequência de baixo peso em pacientes adultos com DCC. Porém, para doenças como falência do coração, estar abaixo do peso (baixo índice de massa corpórea - IMC) representa um grande fator de risco de morbidade e mortalidade (ZAQOUT et al., 2019).

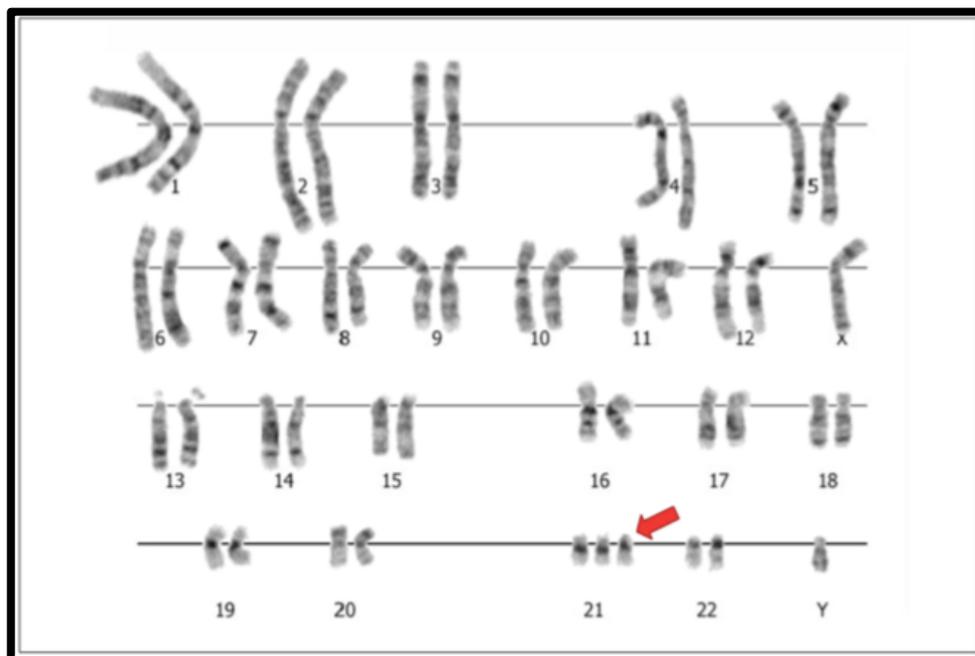
Alterações no metabolismo da glicose também foram encontradas em indivíduos adultos com DCC (OHUCHI et al., 2009). Dessa forma, levando em consideração o papel de alterações na dosagem da glicose no desenvolvimento de SMet, faz-se importante realizar a avaliação do perfil metabólico da glicose nos pacientes com DCC. Além disso, foi relatada hipertensão em

pacientes com DCC, um importante fator de risco para aterosclerose e SMet (WARE et al., 2018).

2.3 DOENÇAS CARDÍACAS CONGÊNITAS NA SÍNDROME DE DOWN

A SD tem como base genética a presença de três cópias do cromossomo 21 ao invés de duas (por isso também é conhecida como Trissomia do cromossomo 21), o que também causa uma alteração na expressão de genes contidos nesse cromossomo (PLAIASU, 2017) (Fig. 3). Além das dificuldades cognitivas, aparência típica e anormalidades cardíacas e do trato digestivo, indivíduos com SD são associados a uma aceleração no processo de envelhecimento, sendo relacionados a doenças como o Alzheimer e algumas doenças autoimunes (ARBUZOVA et al., 2002).

Figura 3. Cariótipo de paciente com Síndrome de Down. A seta vermelha demonstra a trissomia do cromossomo 21 (PATRÍCIA et al., 2014).



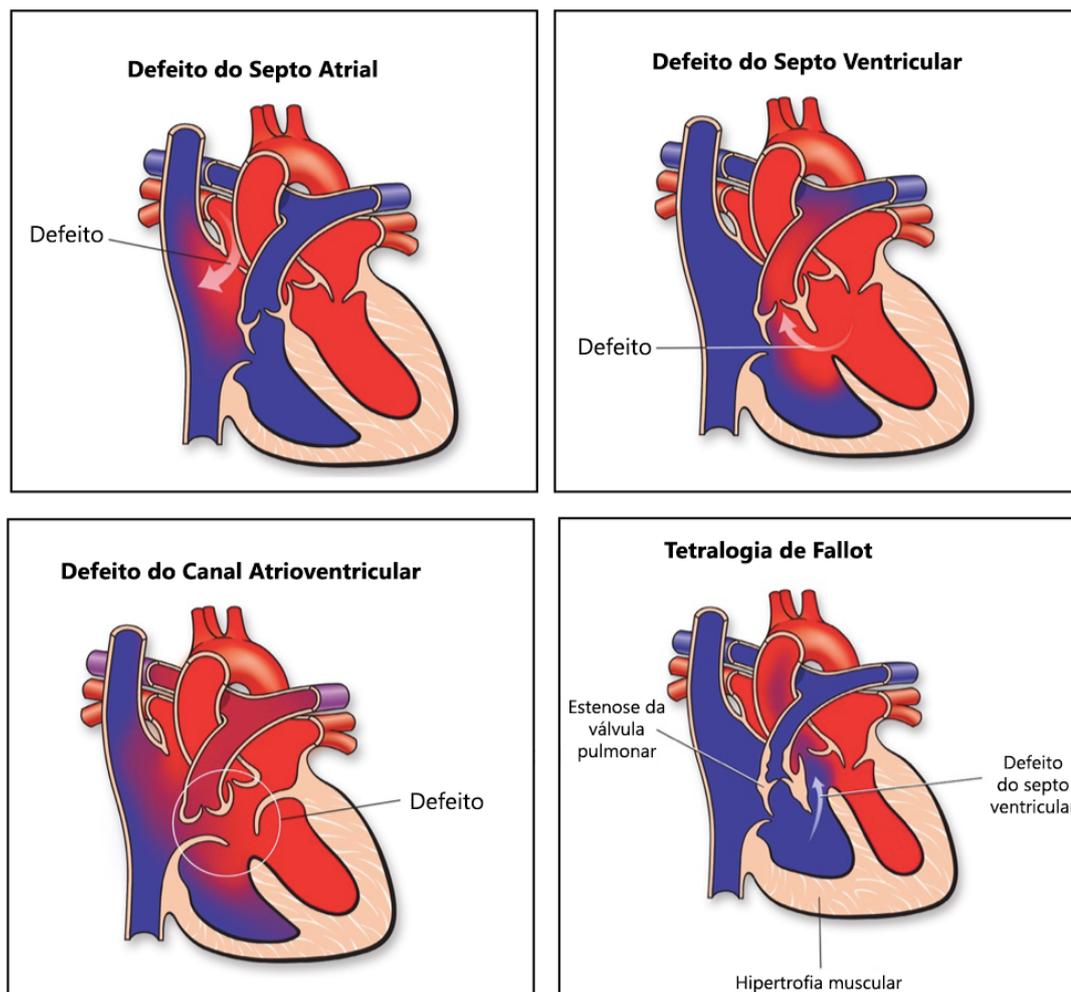
A SD não tem uma causa específica, mas pode ser relacionada à idade materna avançada, que aumenta o risco de anormalidades cromossômicas. A SD pode ser detectada ainda durante a gravidez através de exames como ultrassom, identificando anormalidades no primeiro e segundo trimestres. Porém, uma avaliação antes da concepção poderia ser feita, realizando uma análise cromossômica e de histórico familiar (BOGGS et al., 2017).

SD é a anormalidade cromossômica autossômica mais frequentemente associada a DCC (PFITZER et al., 2018). Aproximadamente 50% das crianças com SD possuem alguma DCC, representando um dos principais fenótipos da SD na primeira infância (KELLY et al., 2018). O espectro dessas doenças em pacientes com SD é vasto, e a gravidade depende do acometimento estrutural cardíaco e de seus grandes vasos, levando a maiores ou menores níveis de morbidade e mortalidade neonatal (PLAIASU, 2017). As DCC mais comuns no grupo de recém nascidos com SD são defeitos no septo atrioventricular (DSAV), defeitos no septo ventricular (DSV), tetralogia de Fallot (TF) e defeitos no septo atrial (DSA) (PFITZER et al., 2018).

De acordo com a Associação Americana do Coração, o DSA ocorre quando há um orifício na parede que separa as duas câmaras superiores do coração, enquanto o DSV ocorre quando não há o fechamento entre as duas câmaras inferiores do coração, causando uma maior pressão no coração ou redução do oxigênio no corpo. Já o DSAV afeta todas as quatro câmaras do coração, havendo uma mistura entre o sangue venoso e arterial, impossibilitando o direcionamento correto do sangue para a circulação por parte das válvulas. A TF é um conjunto de quatro defeitos cardíacos: um orifício entre as câmaras inferiores do coração, uma obstrução do coração para os pulmões, a localização da aorta acima de um orifício nas câmaras inferiores, e espessamento do músculo que circunda a câmara inferior direita (Fig. 4).

Essas DCC podem ser tratadas cirurgicamente, entretanto, mesmo com cirurgias bem-sucedidas de pacientes com DCC, estudos demonstraram que, após algumas intervenções, há maiores chances de desenvolver DCV. Em pacientes submetidos à cirurgia para correção de TF, por exemplo, há uma grande prevalência de desenvolvimento de aterosclerose e de doença coronária (BRADLEY et al., 2013; MOONS et al., 2006). Após a coarctação da aorta e cirurgia de transposição de grandes artérias (TAG), pacientes podem desenvolver problemas coronários (LEGENDRE, 2003).

Figura 4. Defeitos congênitos cardíacos mais comuns na SD. Adaptada da Associação Americana do coração.



Além de DCC, os pacientes com SD parecem ter outros componentes que contribuem para o desenvolvimento de doenças metabólicas como a SMet. Indivíduos com SD são caracterizados por sobrepeso ou obesidade (que podem estar relacionados ao sedentarismo reportado nesses pacientes), fatores que contribuem para o risco de desenvolver SMet (KELLY et al., 2018). Estes pacientes também apresentam altos níveis de triglicerídeos e gordura corporal quando comparados ao grupo controle, mais um componente da síndrome metabólica (DRAHEIM et al., 2010).

Foi observado ainda um aumento da incidência de diabetes tipo 1 em indivíduos com SD, também compondo a SMet (BERGHOLDT et al., 2006). Por outro lado, adultos com SD parecem ter uma proteção para aterosclerose, hipertensão arterial e doença coronária arterial, (VERSACCI et al., 2018). Adultos e crianças com SD apresentam diferenças nas características

relacionadas à SMet, porém o fenótipo da obesidade está presente nos dois grupos (DE ASUA et al., 2014).

2.4 ESTRESSE OXIDATIVO E SÍNDROME METABÓLICA

O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes (tendendo para as oxidantes), levando a alterações nas vias de sinalização e no controle dos processos redox, e a danos celulares (SINGH et al., 2018). Dessa forma, pelo desbalanço entre fatores pró e antioxidantes no organismo, ocorre o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS - do inglês *reactive oxygen species*) e de nitrogênio (RNS - do inglês *reactive nitrogen species*).

Em condições fisiológicas, as células geram ROS deliberadamente através da cadeia respiratória e outros processos metabólicos, para ativar a sinalização molecular e mecanismos de defesa imunológica (GOSZCZ et al., 2015). ROS regulam várias funções celulares, que incluem crescimento celular, contração, dilatação, migração de células vasculares, tônus muscular, entre outros (MONTEZANO et al., 2015). Por sua importância em várias funções fisiológicas, determinados níveis ROS apresentam efeitos benéficos, como no processo do metabolismo da glicose, adipogênese e diferenciação de adipócitos (ZHANG et al., 2015).

A relação entre SMet e estresse oxidativo é bem estabelecida, sendo este um fator chave para processos ateroscleróticos e trombóticos, além de estar envolvido na etiologia de derrame isquêmico, ataque cardíaco e doenças arteriais (GOSZCZ et al., 2015). ROS são importantes na fisiopatologia das DCV, já que o aumento dos seus níveis está relacionado a danos celulares e morte celular (necrose e apoptose), peroxidação lipídica, e alterações de vias de sinalização do balanço de moléculas oxidativas e redutoras. O estresse oxidativo também está relacionado a outros componentes da SMet e DCV, como hipertensão, aterosclerose, diabetes, falência cardíaca hipertrofia cardíaca, distúrbios no metabolismo lipídico e, conseqüentemente, obesidade.(BARANČÍK et al., 2016; GIORDANO et al., 2005; MONTEZANO et al., 2015; ZHANG et al., 2015).

Na resistência à insulina, o estresse oxidativo, induzido por redução na função mitocondrial, leva à produção excessiva de ROS, que inibe o receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1R), prejudicando o principal transportador de glicose (Glut4) e suprimindo genes da insulina das células beta pancreáticas (KANETO et al., 2001; TANAKA

et al., 2008). O estresse oxidativo também é relatado na hipertensão como sendo um importante fator tanto nessa doença quanto na diabetes tipo 2, apesar de ainda não ser claro o mecanismo pelo qual essa relação é feita em humanos (GROSSMAN et al., 2008).

2.5 ESTRESSE OXIDATIVO NA SÍNDROME DE DOWN

Diversos estudos demonstraram a presença de um estresse oxidativo crônico e disfunções mitocondriais na SD, tanto a nível celular quanto fisiológico (ZAMPONI et al., 2018). A regulação negativa da atividade mitocondrial ocorre devido a uma resposta adaptativa para minimizar os danos causados por estresse oxidativo e preservar a função celular (HELGUERA et al., 2013).

Mitocôndrias têm como função principal a produção de energia nas células, mas também atuam no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (PARIHAR et al., 2015). Durante a respiração celular, as mitocôndrias produzem altos níveis de ROS e radicais livres. Como no cromossomo 21 estão presentes genes relacionados à resposta ao estresse oxidativo, algumas pesquisas defendem que haja um desbalanço na expressão gênica em pacientes portadores de SD, levando ao acúmulo de ROS e radicais livres, o que estaria relacionado à patogênese dessa síndrome (ARBUZOVA et al., 2002).

Eventos oxidativos gerados a partir de alterações mitocondriais já foram relacionados a fenótipos da SD, como atraso no desenvolvimento cognitivo, anormalidades dendríticas, neurodegeneração, oftalmoplegia, hipotonia e cardiomiopatia (VALENTI et al., 2014). Evidências do comprometimento mitocondrial na SD já foram demonstradas em estudos de cultura de células e de tecidos, onde foram analisados genes envolvidos em processos como fosforilação oxidativa, síntese de ATP e no ciclo de Krebs (VALENTI et al., 2010).

Alguns marcadores de estresse oxidativo, como peroxidação lipídica, modificações de proteínas e danos ao DNA, foram encontrados aumentados em indivíduos com SD (VALENTI et al., 2011). Também já foram observados o aumento das ROS e diminuição dos níveis de antioxidantes em indivíduos com SD (VALENTI et al., 2014). No entanto, não há um consenso definitivo sobre a relação entre disfunções mitocondriais e a patogênese da SD.

2.6 GENES RELACIONADOS AO ESTRESSE OXIDATIVO

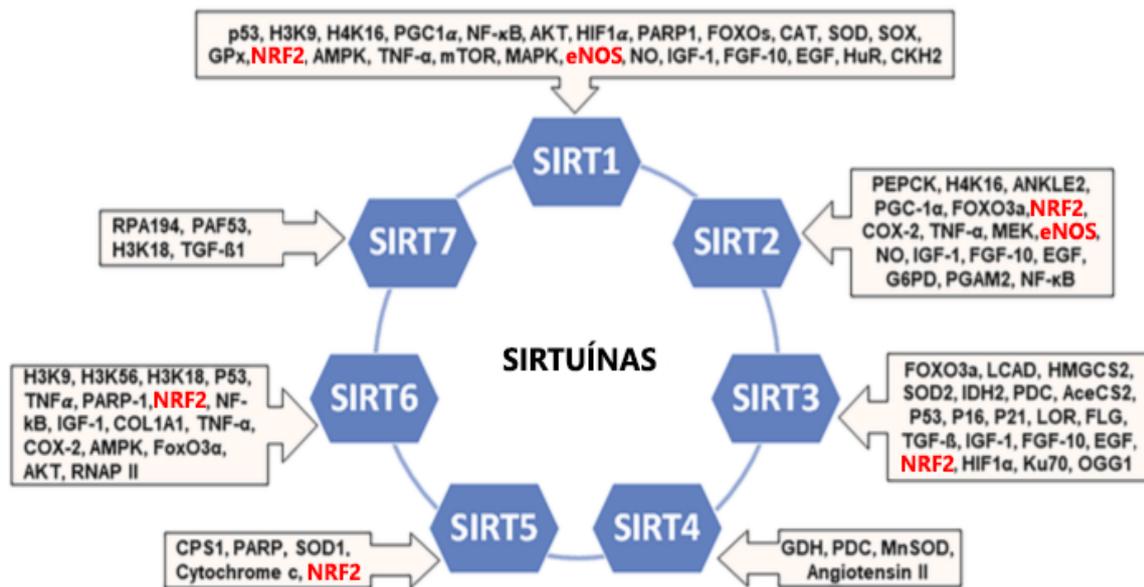
2.6.1 Sirtuínas

As SIRT são uma família de histona desacetilases (HDAC) dependentes de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), com sete isoformas (SIRT1-SIRT7) (MATSUSHIMA et al., 2015). Elas possuem papel fundamental em diversas funções celulares, como desacetilação de histonas, acetilação e desacetilação de proteínas (SINGH et al., 2018).

A epigenética estuda as mudanças que alteram a expressão do DNA sem modificar sua sequência, através de mecanismos como metilação do DNA, modificação de histonas, remodelamento da cromatina, e RNA não codificantes (KADAKIA et al., 2018; LIU et al., 2015). Modificações epigenéticas podem ser observadas em células procariontes e eucariontes, sendo responsáveis por diversas funções biológicas estando relacionadas a um ambiente de risco durante as fases primárias do desenvolvimento fetal, podendo levar à hipóxia e desregulações metabólicas, imunes e de estresse (CARTIER et al., 2018). A modificação de histonas é um importante mecanismo epigenético no qual o DNA, que é estruturalmente envolvido em histonas, tem sua expressão gênica modificada pela acetilação (por enzimas histonas acetiltransferases) e desacetilação (feita por enzimas histonas desacetilases) (MATSUSHIMA et al., 2015).

Os processos de desacetilação promovidos pelas SIRT estão envolvidas em processos pró-oxidantes e antioxidantes. Estas moléculas desempenham funções mitocondriais e metabólicas, além de atuar no reparo a danos no DNA (NAKAGAWA et al., 2011). Enquanto as SIRT1, SIRT3 e SIRT5 protegem as células do ROS, as SIRT2, SIRT6 e SIRT7 modulam genes importantes em mecanismos de estresse oxidativo, estimulando a produção de ROS. A SIRT4 é conhecida tanto pela indução da produção de ROS quanto pelo seu papel antioxidante (SINGH et al., 2018). Além disso, as SIRT interagem em vias com várias outras moléculas antioxidantes, destacando-se especialmente o *NRF2* e o gene *eNOS* (Fig 5).

Figura 5. Associação molecular das sirtuínas com genes sinalizadores antioxidantes. Em destaque, a correlação das SIRT e NRF2 e eNOS.

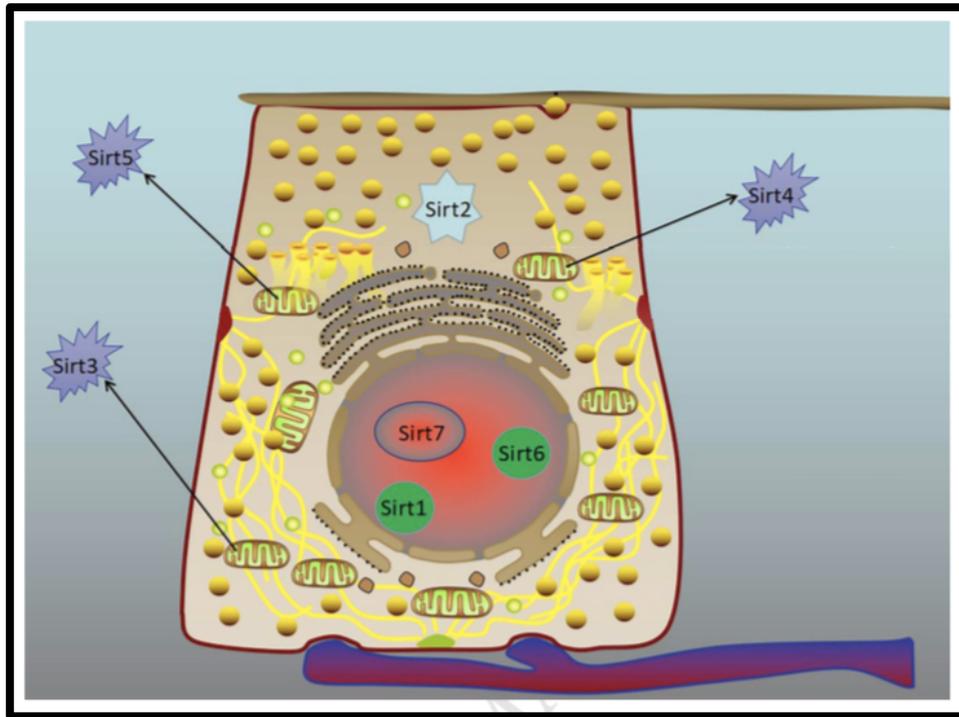


Fonte:: Adaptada de SINGH et al., 2018.

Vários estudos sugerem que as SIRT são alvos potenciais para o estudo de múltiplas patologias, incluindo DCV, e essa relação pode ser devido ao envolvimento das sirtuínas em processos oxidantes e antioxidantes. Dessa forma, suas funções nas DCV são controversas: enquanto algumas são caracterizada por desempenharem função protetora, como as SIRT1 e SIRT3, a SIRT6 pode ter uma função protetora ou não (XU et al., 2016).

As SIRT diferem quanto à sua localização (Fig. 6), podendo estar no núcleo (SIRT1, SIRT6 e SIRT7), citoplasma (SIRT2) ou nas mitocôndrias (SIRT3, SIRT4 e SIRT5) (WANG et al., 2019). A SIRT1 e a SIRT2 são as mais estudadas em alterações por DCV (MATSUSHIMA et al., 2015). As SIRT3, SIRT4 e SIRT5 influenciam todos aspectos da função mitocondrial: produção de energia, sinalização, tradução mitocondrial, apoptose e biogênese mitocondrial, tendo um importante papel na regulação metabólica e homeostase energética (PARIHAR et al., 2015).

Figura 6. Distribuição das sirtuínas na célula. As SIRT 1, 6 e 7 são encontradas principalmente no núcleo, a SIRT2 no citoplasma e as SIRT 3, 4 e 5 são encontradas nas mitocôndrias (WANG et al., 2019).



2.6.1.1 Sirtuína citoplasmática

A *SIRT2* é expressa em vários tecidos, como cérebro, tecido adiposo e coração, sendo responsável por várias funções metabólicas que incluem diferenciação de adipócitos, oxidação de ácidos graxos, gliconeogênese, sensibilidade à insulina e resposta inflamatória (ALAGEEL et al., 2018).

Dessa forma, a baixa expressão de *SIRT2* pode ser relacionada à DCV, como é o caso da hipertrofia cardíaca e do infarto agudo do miocárdio (TANG et al., 2017). Em obesos, o tecido adiposo é caracterizado por baixos níveis de *SIRT2*, o que leva à supressão de genes envolvidos na promoção do gasto energético e no catabolismo dos ácidos graxos, contribuindo para obesidade (KRISHNAN et al., 2012). Essa expressão diminuída foi relacionada à SMet, uma vez que baixos níveis de *SIRT2* levaria ao aumento da adipogênese (ALAGEEL et al., 2018). Ainda não está claro o papel da *SIRT2* em relação à diabetes, uma vez que alta expressão de *SIRT2* já foi relacionada à resistência à insulina (LIU et al., 2018), enquanto a diminuição da atividade de *SIRT2* foi observada em camundongos diabéticos obesos (WATANABE et al., 2018).

A *SIRT2* também é responsável pela acetilação de G6PD, regulando-a negativamente e mantendo a homeostase durante o estresse oxidativo, já que a G6PD desempenha um papel

essencial na resposta ao estresse oxidativo ao produzir NADH, principal redutor intracelular (WANG et al., 2014).

2.6.1.2 Sirtuínas mitocondriais

Dentre as SIRT mitocondriais, a SIRT3 é a principal desacetilase mitocondrial, estando envolvida em vias metabólicas energéticas (LOMBARD et al., 2007). A SIRT3 está envolvida na prevenção da apoptose e na modulação do estresse oxidativo, além de atuar na proteção do DNA mitocondrial contra danos e estar envolvida nas vias de reparo (CHENG et al., 2013).

O coração é o órgão que mais consome energia, e as mitocôndrias ocupam de 30% a 35% do volume total dos cardiomiócitos, fornecendo 90% do ATP necessário para a função cardíaca normal. As mitocôndrias também exercem um papel central na morte celular, e estão envolvidas na patogênese de doenças cardíacas, particularmente infarto agudo do miocárdio, lesão por isquemia e reperfusão, e insuficiência cardíaca. Dessa forma, as sirtuínas mitocondriais, especialmente a SIRT3, são importantes na manutenção da função cardíaca e no equilíbrio do gasto energético (PARODI-RULLÁN; CHAPA-DUBOCQ; JAVADOV, 2018).

A expressão de *SIRT3* foi relatada como importante na preservação da função cardíaca e dos vasos sanguíneos na obesidade (ZENG et al., 2015), uma vez que a SIRT3 regula o metabolismo da glicose e lipídios e mantém os níveis de ATP do miocárdio, protegendo também os cardiomiócitos de distúrbios metabólicos mediados por estresse oxidativo (SUN et al., 2018). Dessa forma, a expressão da *SIRT3* também tem um papel importante nas fisiopatologias da obesidade, diabetes mellitus e hiperlipidemia, podendo levar, em ratos, ao desenvolvimento de SMet por um aumento na acetilação (diminuição da expressão de SIRT3) – porém, em seres humanos, essa relação ainda não é clara (ALAGEEL et al., 2018).

A deficiência de *SIRT3* acelera o desenvolvimento da SMet pela sua relação com os fatores de risco para o desenvolvimento de doenças metabólicas (WINNIK et al., 2014). Experimentos em ratos mostraram que a ausência da *SIRT3* leva a distúrbios de oxidação e do metabolismo de ácidos graxos e da glicose (HIRSCHEY et al., 2010). Em um estudo com camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, observou-se obesidade acelerada na ausência da *SIRT3* - dessa forma, a perda de *SIRT3* contribui para a SMet em ratos e possivelmente em humanos (HIRSCHEY et al., 2011). Apesar de não ter sido encontrada associação entre piora da placa aterosclerótica e a deficiência de SIRT3, a perda desta sirtuína

foi relatada no ganho de peso acelerado em camundongos (WINNIK et al., 2014). Dessa forma, a expressão da *SIRT3* poderia contribuir protegendo contra esses fatores de risco.

A *SIRT4* também está envolvida na homeostase lipídica, regulando negativamente as enzimas do metabolismo dos ácidos graxos, atuando no metabolismo energético e nas DCV (LAURENT et al., 2013; XU et al., 2016). Esta sirtuína mitocondrial apresenta alta expressão em tecidos como cérebro, fígado, rim e coração, além das células beta pancreáticas, regulando várias vias metabólicas na mitocôndria (PARIHAR et al., 2015). Pelo seu papel na regulação metabólica, a *SIRT4* atua diminuindo os níveis circulantes de ácidos graxos (TARANTINO et al., 2014) e pode estimular a lipogênese no tecido adiposo, indicando sua importância no equilíbrio entre oxidação e síntese de gordura (LAURENT et al., 2013). No entanto, a *SIRT4* pode levar ao aumento da produção de ROS que, juntamente com uma grande quantidade de ácidos graxos livres, pode resultar em disfunção endotelial e aterosclerose, sendo estes fatores de risco para doença arterial coronariana e SMet (TARANTINO et al., 2014).

A *SIRT5* tem sua função no metabolismo celular e na homeostase do metabolismo energético, além de estar envolvida no mecanismo de excreção da uréia (PARIHAR et al., 2015; TATONE et al., 2018). Na presença de estresse mitocondrial, a *SIRT5* desacetila o citocromo c, que é essencial para a apoptose, tendo um papel na regulação da mesma (VERDIN et al., 2010). A *SIRT5* apresenta alta expressão nas células do coração humano quando comparados a outros tecidos e, por isso, essa sirtuína parece ter um importante papel na fisiopatologia das DCV. Pela alta expressão da *SIRT5* no tecido cardíaco, camundongos com depleção dessa sirtuína desenvolvem disfunção cardíaca, hipertrofia patológica e aumento de fibrose (SADHUKHAN et al., 2016). A falta de *SIRT5* em camundongos também foi associada à modulação da lesão por isquemia e reperfusão, ao tamanho do infarto do miocárdio e à função contrátil cardíaca prejudicada (BOYLSTON et al., 2016).

2.6.1.3 Sirtuínas nucleares

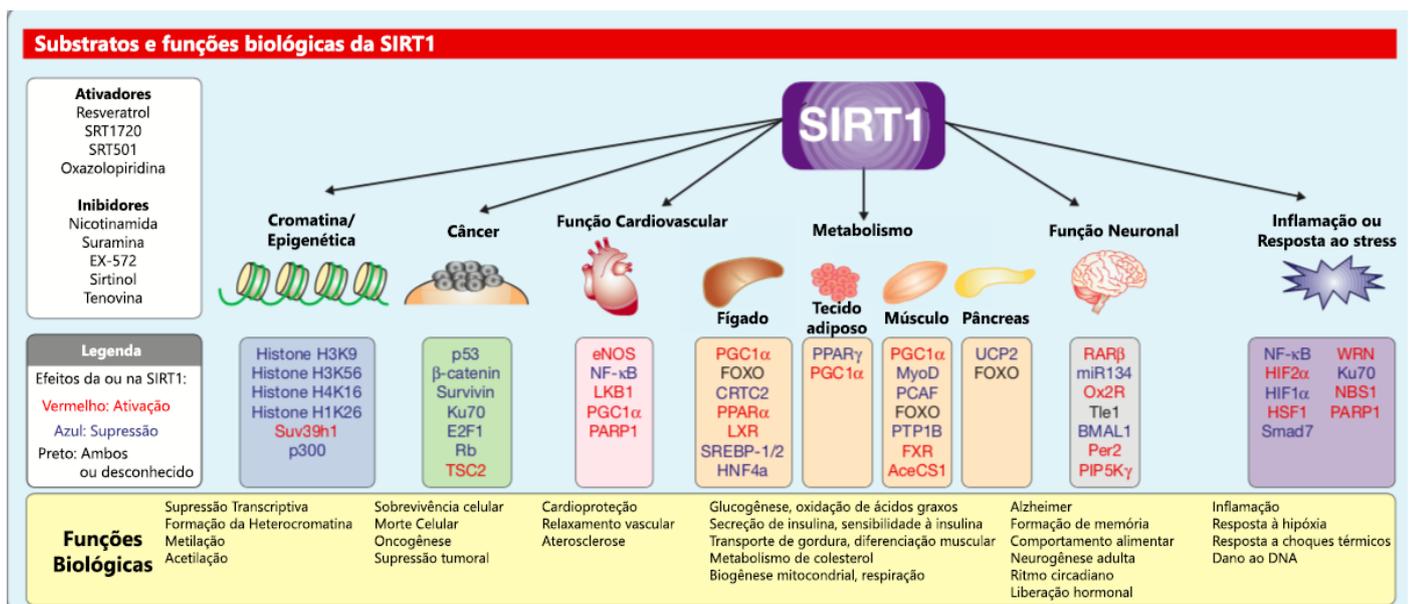
A *SIRT1* tem função importante no desenvolvimento, senescência celular e vias da morte celular, interagindo com várias vias e ativando mecanismos oxidantes de defesa celular (SINGH et al., 2018). Dessa forma, a *SIRT1* tem função protetora contra eventos de estresse oxidativo.

A *SIRT1* funciona reprimindo a via do PPAR γ (*Peroxisome proliferator-activated receptor- γ*) que age diretamente no metabolismo de lipídios e da glicose, levando à inibição da

adipogênese (PHAM et al., 2018). Por essa inibição, a SIRT1 tem um papel protetor no desenvolvimento de síndrome metabólica uma vez que a expressão reduzida da *SIRT1* leva à expressão aumentada de PPAR γ e, conseqüentemente, ao aumento da deposição de gordura (QIAO et al., 2015). A atividade aumentada da *SIRT1* em camundongos foi encontrada bloqueando a diferenciação de PPAR γ e de adipócitos, diminuindo o acúmulo de gordura (FANG et al., 2017).

Outra exemplo da função protetora da *SIRT1* é a sua atuação anti-aterosclerótica através da ativação da enzima eNOS, reduzindo a atividade de NF- κ B (MIRANDA et al., 2015). A SIRT1 também está envolvida em processos celulares, incluindo a manutenção e diferenciação de células-tronco. Na embriogênese de camundongos, a ausência da *SIRT1* está relacionada a anormalidades na placenta e, conseqüentemente, defeitos no desenvolvimento fetal (ARUL NAMBI RAJAN et al., 2018) (Fig. 7).

Figura 7. Funções biológicas da SIRT1. Adaptado de NAKAGAWA et al., 2011.



A SIRT6 é uma sirtuína com função na repressão de inflamação, envelhecimento e danos ao DNA. A SIRT6 também está envolvida no metabolismo energético e em processos fisiopatológicos como câncer, obesidade e resistência à insulina (KUANG et al., 2018). Em relação às DCV, em alguns estudos, a *SIRT6* foi encontrada agravando a lesão isquêmica, porém em outros, age com função protetora contra danos causados por hipóxia. Baixos níveis dessa sirtuína também são relacionados à insuficiência cardíaca, apresentando expressão diminuída

em lesões ateroscleróticas em camundongos, com função protetora em disfunções endoteliais (MAKSIN-MATVEEV et al., 2015; WANG et al., 2016; XU et al., 2016).

A *SIRT6* suprime a expressão de genes metabólicos da glicose, diminuindo sua captação, podendo ter um efeito protetor contra diabetes (TATONE et al., 2018). Em camundongos, essa relação foi comprovada com a diminuição da expressão de *SIRT6*, resultando em hipoglicemia severa (KUANG et al., 2017). Assim, algumas terapias alternativas para diabetes estão sendo estudadas utilizando ativadores dessa sirtuína (KUANG et al., 2018). Na obesidade, a expressão de *SIRT6* foi encontrada reduzida no tecido adiposo de camundongos obesos, resultado oposto ao observado em pacientes com obesidade mórbida após a perda de peso, com altos níveis de *SIRT6* no tecido adiposo, o que pode ter acontecido pela diminuição da inflamação (KUANG et al., 2017; MOSCHEN et al., 2013).

A *SIRT7*, por sua vez, foi relacionada ao estresse oxidativo, apresentando função na regulação da captação de ácidos graxos e síntese e armazenamento de triglicerídeos, além de inibir a proliferação e migração das células endoteliais e do músculo liso (MERKSAMER et al., 2013; TATONE et al., 2018; XU; BAI; JIN, 2016). A supressão de *SIRT7* leva a várias alterações patológicas no coração, uma vez que essa sirtuína tem um papel regulador importante na homeostase cardíaca (FAVERO et al., 2015). Em camundongos, ausência de *SIRT7* levou ao desenvolvimento de hipertrofia cardíaca, cardiomiopatia inflamatória e apoptose de cardiomiócitos, e conseqüentemente morte prematura desses animais (VAKHRUSHEVA et al., 2008).

2.6.2 eNOS

As células endoteliais são particularmente susceptíveis ao estresse oxidativo pela disponibilidade comprometida de óxido nítrico (NO), que é um importante antioxidante, além de proteger as células de morte celular causada por ROS (CAI; HARRISON, 2000). A diminuição de NO pela ação das ROS está envolvida em condições fisiopatológicas, incluindo dislipidemias, aterosclerose, hipertensão, diabetes e insuficiência cardíaca (CAI; HARRISON, 2000).

NO, além de ser um sinalizador molecular universal (ZHOU et al., 2014), é um importante vasodilatador que possui um efeito protetor no organismo humano (ALKHARFY et al., 2010). Esta molécula possui diversos alvos espalhados por todo corpo, tendo papel importante na neurotransmissão, tônus vascular, regulação da transcrição de genes, tradução de

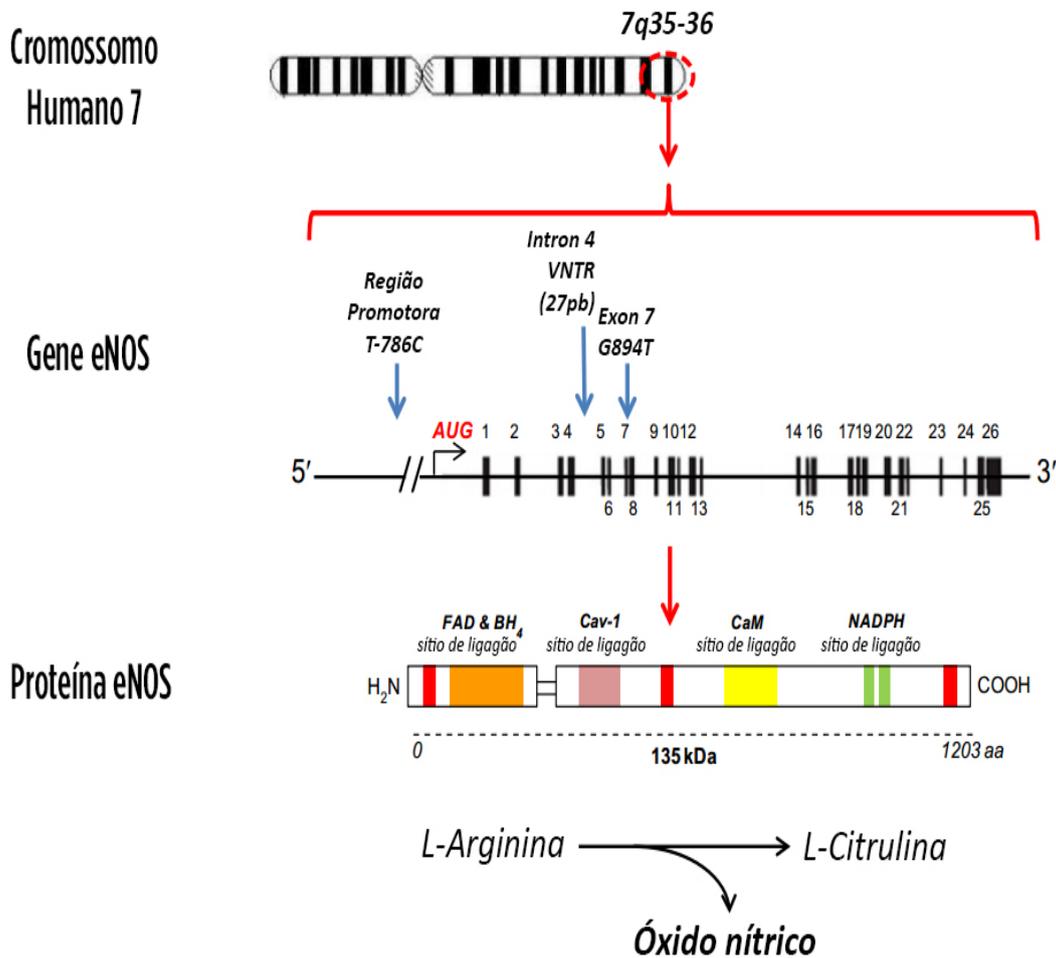
RNA mensageiro (RNAm) e modificações protéicas pós traducionais (FÖRSTERMANN et al., 2012). No entanto, uma produção aumentada de NO pode alterar mecanismos de reparo do DNA, interferindo na estrutura do ácido nucléico (LUO et al., 2014).

O NO é produzido a partir de uma via que inclui a conversão de L-arginina em L-citrulina, que é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), possuindo três isoformas reconhecidas. Essas isoformas são: óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), com atividade funcional principalmente nos vasos sanguíneos; óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), que possui funções nas células nervosas; e óxido nítrico sintase induzível (iNOS), cuja atividade está relacionada a diversas condições patológicas - como, por exemplo, em casos de sepse (ALKHARFY et al., 2010).

A produção de NO é, em sua maior parte, sintetizada pela enzima eNOS (OLIVEIRA-PAULA et al., 2016). A deficiência dessa enzima vem sendo relacionada ao desenvolvimento de DCV associadas à SMet, doença coronária, hipertensão e altos níveis de colesterol (ALKHARFY et al., 2010; HSIEH et al., 2008; SAWADA et al., 2008). Dessa forma, a adequada homeostase do sistema cardiovascular depende diretamente da enzima eNOS, uma vez que o NO possui diversas funções como mediador de importantes processos celulares (HASSANI IDRISSE et al., 2016).

A enzima eNOS é um produto do gene *eNOS*, que possui 26 éxons e 21pb, localizado no cromossomo 7q35–36. A região promotora do gene *eNOS* tem função de regulação da expressão gênica, além de ser responsável pela manutenção da função endotelial, e de estar presente nos estágios iniciais da cardiogênese (ALKHARFY et al., 2010; HSIEH et al., 2008; ZHOU et al., 2014) (Fig. 8).

Figura 8. O Gene eNOS, localizado no cromossomo 7, e seus efeitos biológicos causados por alterações nos níveis de NO.



Efeitos biológicos do óxido nítrico em nível vascular

- Relaxamento das células vasculares lisas → **vasodilatação**
- Inibição de migração e proliferação de células musculares lisas vasculares
- Prevenção de adesão leucocitária
- Inibição de adesão, ativação, secreção e agregação plaquetária

Fonte: Adaptada de VECOLI et al., 2014.

As principais funções fisiológicas da enzima eNOS são: vasodilatação; inibição da adesão e agregação plaquetária; inibição da adesão leucocitária e, conseqüentemente, da inflamação; controle da proliferação das células lisas vasculares; e estimulação da angiogênese (FÖRSTERMANN et al., 2012).

Alterações no gene *eNOS* têm sido relacionadas principalmente ao desenvolvimento de DCV, como: doença arterial coronária, fibrilação atrial, cardiomiopatia dilatada e infarto do miocárdio (HASSANI IDRISSEI et al., 2016). Além disso, estudos revelam que esse gene pode promover hipertensão arterial; derrame cerebral; pré-eclâmpsia; e desordens metabólicas - em

especial, diabetes (ALPOIM et al., 2014; DUPLAIN et al., 2001; MONTI et al., 2003; WANG et al., 2013).

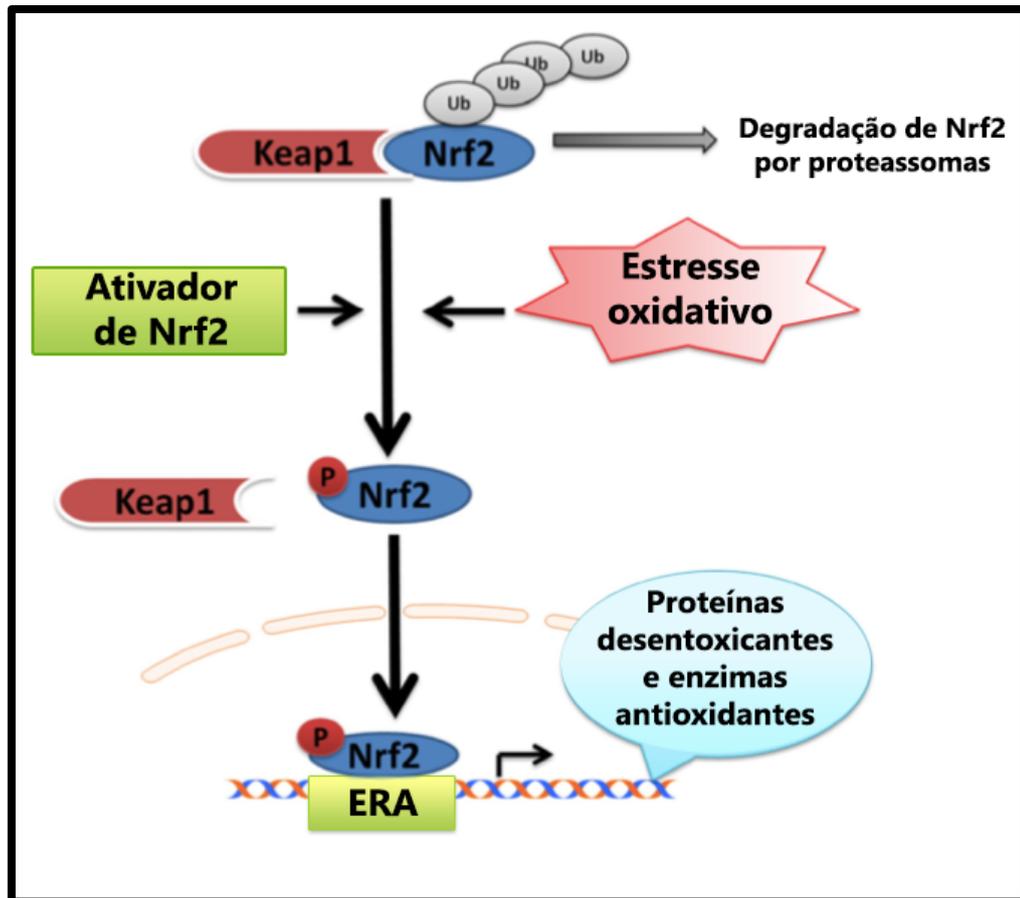
Disfunção endotelial é associada à diminuição do NO e, conseqüentemente, ao aumento das chances de desenvolver DCV, já que o endotélio vascular modula a estrutura dos vasos, lise de trombos, vasoconstrição, e vasodilatação – fatores de risco para o desenvolvimento de placa aterosclerótica e, conseqüentemente, DCV (SATTA et al., 2017). Além do seu papel nas células endoteliais, a eNOS tem atividade no tecido adiposo perivascular e isso também implica na homeostase vascular, já que há a liberação de NO (DAIBER et al., 2019).

2.6.3 NRF2

O fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (NRF2) é um importante fator de transcrição envolvido na manutenção da homeostase nos processos de estresse oxidativo (ZHANG et al., 2015). Dessa forma, o NRF2 é identificado como um importante protetor celular contra o estresse oxidativo, além de agir no controle de expressão de outros genes envolvidos em processos antioxidantes (KOBAYASHI et al., 2006).

Em condições normais, o NRF2 se encontra no citoplasma ligado ao seu inibidor endógeno Keap1, que impede a passagem do NRF2 para o núcleo e sua degradação. Sob condições endógenas e exógenas de estresse oxidativo, o NRF2 se torna estável e se libera do complexo NRF2/Keap1, ativando-se. O NRF2 ativado se transloca para o núcleo e se liga a elementos de resposta antioxidante (ERA), ativando a transcrição de diversos genes antioxidantes (ZHANG et al., 2015) (Fig. 9).

Figura 9. Via de ativação do NRF2



Fonte: Adaptado de ZANG et al., 2015.

Além do seu papel em processos oxidativos, o *NRF2* já foi relacionado à regulação de alguns componentes da SMet, como no caso do metabolismo lipídico e de glicose na obesidade (TANAKA et al., 2008). Apesar da importância do *NRF2* na regulação do peso e sua relação com a obesidade, estudos em camundongos demonstraram que a deficiência de *NRF2* pode ser um fator de proteção contra obesidade, porém resulta em um fenótipo de SMet severa, agravando a resistência à insulina, hiperglicemia e hipertrigliceridemia (XUE et al., 2013). O *NRF2* parece ter importante função no controle da pressão arterial, já que tratamento com ativadores dessa molécula (epicatequina) diminuiu a resposta hipertensiva – entretanto, não é certo se essa diminuição é uma resposta direta ao tratamento com *NRF2* ou se deve à diminuição do estresse oxidativo associado à hipertensão (GÓMEZ-GUZMÁN et al., 2012).

NRF2 tem papel importante na regulação do estresse oxidativo em pacientes com SD, prevenindo danos oxidativos severos e aumentando viabilidade e função celular (ZAMPONI et al., 2018), mas ainda não está claro o seu papel na DCC.

3 METODOLOGIA

3.1 AMOSTRAS

Foi realizada a coleta causa-controle de amostras de sangue total de 67 pacientes, com idades entre 15 dias de vida e 23 anos, foram coletadas em instituições públicas dos estados da Paraíba e de Pernambuco. Os pacientes foram separados em quatro grupos: pacientes com DCC, pacientes com DCC/SD, pacientes com SD e indivíduos saudáveis. As amostras foram coletadas em tubos de 4mL K3 EDTA (BD Vacuette®) com 2mL RNA later para preservar o RNA. Após a chegada no laboratório, as amostras foram fracionadas e armazenadas no freezer à -80°C.

O projeto foi aprovado pelo Comitê De Ética Em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos (UFPE/CCS No.1172909), e os responsáveis pelas crianças assinaram um termo de consentimento (ANEXO A).

3.2 EXTRAÇÃO DE RNA

A extração do RNA de sangue total foi feita utilizando o kit *QIAamp RNA Blood Mini Kit*® (Qiagen). Na primeira etapa, 600µL de sangue com RNA later foram misturados com 3mL de *Buffer EL* e essa mistura foi incubada por 15 minutos. Após a centrifugação à 400xg por 10 minutos à 4°C, o sobrenadante foi descartado e 1,2mL de *Buffer EL* foram utilizados para ressuspender as células. As amostras foram centrifugadas novamente à 400xg por 10 minutos à 4°C e foram adicionados 350µL de *Buffer RLT*. O lisado foi transferido para coluna, onde foi centrifugado por 2 minutos. Na etapa posterior, foi adicionado etanol 70% ao lisado, e essa mistura foi transportada para outra coluna onde foi centrifugada por 15 segundos à 8000xg. A coluna foi transferida para outro tubo de coleta, e foram adicionados 700µL de *Buffer RWI*, sendo a amostra centrifugada por 15 segundos à 8000xg para lavagem. Após essa etapa, foram adicionados 500µL de *Buffer RPE* na coluna com um novo tubo coletor, e foi realizada uma centrifugação por 15 segundos à 8000xg. Após isso, mais 500µL de *Buffer RPE* foram adicionados, e a centrifugação foi repetida. 50µL de *RNase-free water* foram utilizados para eluição do RNA extraído.

Após a extração, todas as amostras foram quantificadas pelo Espectrofotômetro NanoDrop® – 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE) para verificação da purificação da extração. As amostras de RNA ficaram armazenadas à -80°C até a realização da qPCR.

3.3 SÍNTESE DE cDNA

O cDNA foi obtido a partir do Kit *QuantiTect® Reverse Transcription Kit* (Qiagen). Foram utilizados 2µL de *gDNA Wipeout Buffer* em 12µL de amostra de RNA para eliminação de resquícios de DNA genômico. A concentração de RNA respeitou o limite estipulado pelo kit de 10pg até 1µgRNA . Após a mistura dos reagentes, o tubo foi incubado por 2 minutos à 42°C no termociclador *Veriti™ 96-Well Thermal Cycler* (Thermo Fisher Scientific). Após a incubação, foram adicionados aos tubos 1µL de *Quantiscript Reverse Transcriptase*, 4µL de *Quantiscript RT Buffer* e 1µL de *RT Primer Mix*, totalizando o volume final de 20µL. Para finalizar, os tubos foram incubados por 15 minutos à 42°C, seguido de uma segunda incubação por 3 minutos à 95°C. As amostras de cDNA ficaram armazenadas à -80°C até a realização da qPCR.

3.4 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

A análise por qPCR foi realizada no equipamento *StepOnePlus™* (Applied Biosystems), utilizando o kit *GoTaq® qPCR Master Mix* (PROMEGA). As amostras de cDNA foram quantificadas antes da qPCR e diluídas à concentração de 50ng/µL. O volume final da reação foi de 10µL, onde 5µL foram de SYBR; 0,1µL de primer; 0,1µL de CXR (Carboxy-X-Rhodamine); e 2,8µL de água; utilizando 2µL de amostra de cDNA (100ng de cDNA).

Para análise da expressão das sirtuínas (*SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3*, *SIRT4*, *SIRT5*, *SIRT6* e *SIRT7*), foram utilizados primers específicos, assim como para análise do gene *NRF2* e do gene *eNOS*. A *β-actina* foi utilizado como gene de referência (Tabela 2). Para ciclagem, foi utilizado o protocolo *fast* com 1 ciclo inicial de 95°C por 2 minutos para ativação da *Taq DNA polimerase*, seguido de 40 ciclos de desnaturação (95°C por 3 segundos) e anelamento (60°C por 30 segundos). Após esses ciclos, foi realizada a curva de *melting*. Cada amostra foi analisada em duplicata e foi considerado apenas desvio padrão menor de 0,5 entre os Cts das

duplicatas. A partir dos resultados de Ct das amostras, foi calculado o ΔCt , $\Delta\Delta Ct$ e o $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para as análises de níveis de expressão de cada gene (Tabela 3).

Tabela 2. Sequência de primers utilizados na qPCR em tempo real.

GENE	Sequência de Primers (5'- 3')
<i>SIRT1</i>	GTTTCATGATAGCAAGCGGTTTC /GTCATGGTTCCTTTGCAACAG
<i>SIRT2</i>	TCAGAACATCCCCCAATCTC/ GATGCCTGTTTAAGCTTGG
<i>SIRT3</i>	GAAGCTCATGGAACCTTTGC/ AGAACACAATGTCGGGCTTC
<i>SIRT4</i>	TGGGGTTCAGGACTTGG/ CAGAGCTCCACGGATGC
<i>SIRT5</i>	TAACTAAAGCCCGCCTCAAG/ ATCGACTTGGACCAATCTGG
<i>SIRT6</i>	GCCAGTTCACACCTTC/ AGTCGAGGATGTCGGTGAA
<i>SIRT7</i>	CTTTCTGAAGCAGTGTCCACA/ AATACTTGGTCGTCTACACAGG
<i>NRF2</i>	CGTAGCCGAAGAAACCTCAT/ ACATCCAGTCAGAAACCAGTG
<i>eNOS</i>	ACGATGGTGACTTTGGCTA/ TGGAGGATGTGGCTGTCT
<i>β-actina</i>	GCCGATCCACACGGAGTACT/ CCTGGCACCCAGCACAAAT

Tabela 3. Fórmulas utilizadas para os cálculos de ΔCt e $\Delta\Delta Ct$.

$\Delta Ct =$	Ct médio gene de estudo – Ct médio gene de referência
$\Delta\Delta Ct =$	ΔCt grupo doente - ΔCt grupo saudável

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada no *Graph Pad Prism 7*. Teste de ANOVA foi utilizado para analisar a diferença entre os níveis de expressão entre os grupos em relação ao grupo controle (ΔCt , $\Delta\Delta Ct$ e $2^{-\Delta\Delta Ct}$). Sempre que possível, o $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi calculado com o grupo controle sendo o grupo saudável. Quando nenhum indivíduo saudável expressava o gene de estudo, o grupo controle foi considerado o grupo de pacientes com SD. Para verificar se havia diferença significativa entre a expressão do gene nos grupos de análise, foram utilizados testes de Qui-quadrado e teste-T, onde o $p < 0,05$ foi considerado significativo. Em todos os grupos, foi

verificada a normalidade a partir do teste *Shapiro-Wilk*. O coeficiente de correlação (r) foi calculado entre a expressão dos genes e a idade dos pacientes, considerando a correlação fraca quando $0 < r < 0,3$; regular quando $0,3 < r < 0,7$; e forte quando $0,7 < r < 1$. Também foram realizadas análises de regressão linear para avaliar a correlação entre a expressão dos genes entre si, e o valor do coeficiente de determinação (R^2) foi determinado a fim de avaliar o relacionamento entre os genes avaliados.

4 RESULTADOS

4.1 PREVALÊNCIA DAS DOENÇAS CONGÊNITAS CARDÍACAS

Um total de 52 pacientes com doença cardíaca congênita e/ou síndrome de Down foram incluídos no estudo (Tabela 4). O defeito do septo atrioventricular (DSAV) (28,85%) foi a cardiopatia mais frequente nos pacientes avaliados (com e sem SD), junto com o defeito do septo ventricular (DSV) (28,85%). A segunda maior frequência foi de casos de canal arterial persistente (CAP) (23,08%), seguida por defeito do septo atrial (DSA) (9,61%) e estenose de valva pulmonar (EVP) (9,61%). Em seguida, houve a prevalência de pacientes com transposição de grandes artérias (TGA) (5,76%), e obstrução da aorta (1,92%) e tronco arterioso (1,92%). A tetralogia de Fallot (TF) teve a menor frequência (3,84%).

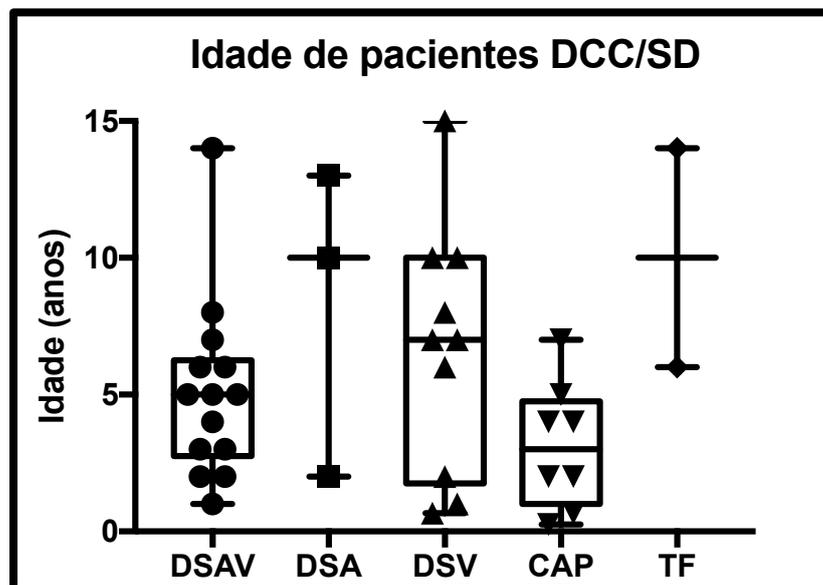
Tabela 4. Tipos de doenças congênitas encontradas em pacientes com SD e sem SD.

Defeito Congênito Cardíaco	Número de pacientes
<i>Pacientes com SD (n=33)</i>	
Defeito do septo atrioventricular	14
Defeito do septo ventricular	10
Defeito do septo atrial	3
Canal arterial persistente	8
Tetralogia de Fallot	2
Obstrução da aorta	1
<i>Pacientes sem SD (n=19)</i>	
Estenose de valva pulmonar	5
Defeito do septo ventricular	5
Canal arterial persistente	4
Transposição de grandes artérias	3
Defeito do septo atrial	2
Defeito do septo atrioventricular	1
Tronco arterioso	1

Avaliando os pacientes com SD isoladamente, a maioria apresentou DSAV (42,42%), seguido por DSV (30,3%). Em terceiro lugar na prevalência nos pacientes com SD avaliados está o CAP (24,24%). O DSA teve a quarta maior prevalência (9,09%), seguido por TF (6,06%) e obstrução da aorta (3,03%). Seis indivíduos com SD e cardiopatia (18,1%) apresentaram mais de uma DCC.

Avaliando a idade dos pacientes com SD e suas respectivas DCC, o DSAV acometeu crianças entre 1 e 14 anos, com mediana de 5 anos (Fig. 10). DSA foi encontrado em crianças de 2 aos 13 anos de idade, com mediana de 10 anos, enquanto o DSV foi registrado em pacientes de 8 meses a 15 anos, com mediana idade de 7 anos. O CAP representou o grupo de pacientes mais novos, sendo encontrado desde em recém-nascidos até crianças de 7 anos, com mediana de 3 anos, enquanto a TF foi mais prevalente em crianças acima dos cinco anos de idade, com mediana de 10 anos. Entretanto, não houve diferença significativa entre a idade dos pacientes e as DCC avaliadas ($p=0,5292$).

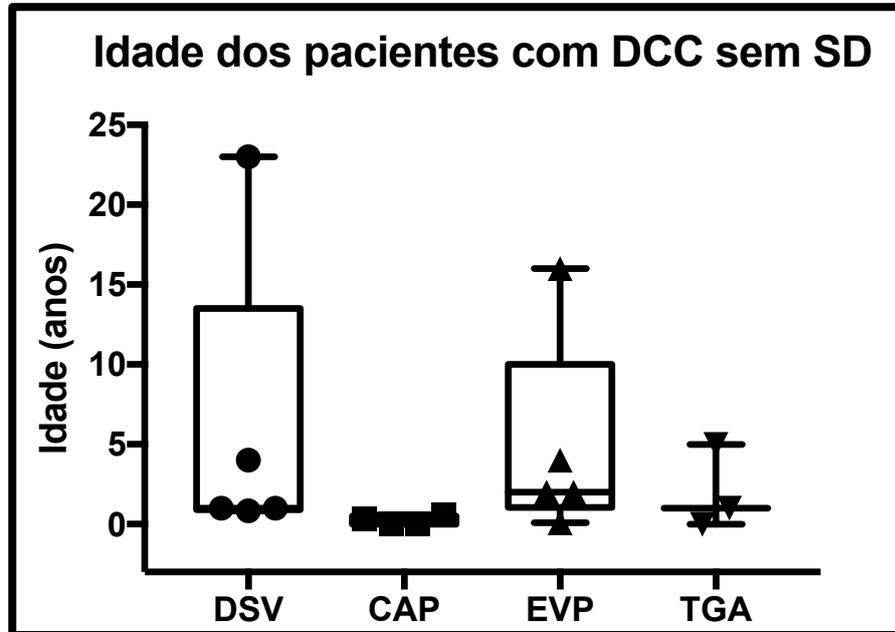
Figura 10. Defeitos cardíacos congênitos em pacientes com SD e suas respectivas idades.



Os pacientes com cardiopatia e sem SD apresentaram como DCC mais frequentes a EVP (16,32%) e o DSV (16,32%), seguidos por CAP (21,05%), TGA (15,79%), DSA (10,53%) e por tronco arterioso (5,26%) e DSAV (5,26%). Quando avaliada a relação dessas DCC com a idade dos pacientes, o CAP está presente em recém-nascidos e crianças de até 3 meses de vida (mediana=0,165/2 meses) (Fig. 11). DSV e EVP foram observadas em pacientes mais velhos, entretanto, com medianas de idade de 1 e 2 anos, respectivamente. Porém obtiveram mediana semelhante, de 1 e 2 anos, respectivamente. Pacientes com TGA apresentaram idade desde o

nascimento até os 5 anos de vida, com mediana de 1 ano. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,6949$).

Figura 11. Defeitos cardíacos congênitos em pacientes sem SD e suas respectivas idades.



4.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES

Do total de 67 amostras, 40 foram utilizadas para a análise da expressão genética. Sendo 5 pacientes com DCC, 20 pacientes com DCC/SD, 11 pacientes com SD e 4 pacientes saudáveis. A razão para redução do número de pacientes foram problemas relacionados a qualidade da amostra e o perfil de β -actina dessas amostras.

Na Tabela 5 é possível observar o número de pacientes que apresentaram expressão dos genes *SIRT1-7*, *eNOS* e *NRF2*, e o de pacientes onde não foi detectada a expressão desses genes.

Os pacientes com curvas de *melting* fora do padrão foram excluídos das análises. A expressão de *SIRT1* apresentou diferença significativa entre os grupos SD e DCC, enquanto que para a expressão de *SIRT5* e *NRF2* apresentaram diferença estatística entre os grupos DCC e DCC/SD.

Tabela 5. Resultados da análise da expressão de SIRT (*SIRT1-SIRT7*), *eNOS* e *NRF2*.

Grupos	DCC		DCC/SD		SD		Saudável		<i>p</i> -valor
	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	
<i>SIRT1</i>	1	3	10	8	11	0	0	4	0,0081*
<i>SIRT2</i>	1	4	9	10	8	3	1	3	0,1644
<i>SIRT3</i>	0	5	9	11	4	5	0	4	0,1053
<i>SIRT4</i>	4	1	19	1	10	1	4	0	0,6435
<i>SIRT5</i>	5	0	19	1	11	0	3	0	<0,0001*
<i>eNOS</i>	0	5	3	16	2	9	0	4	0,6245
<i>NRF2</i>	2	3	20	0	9	2	2	2	0,0038*

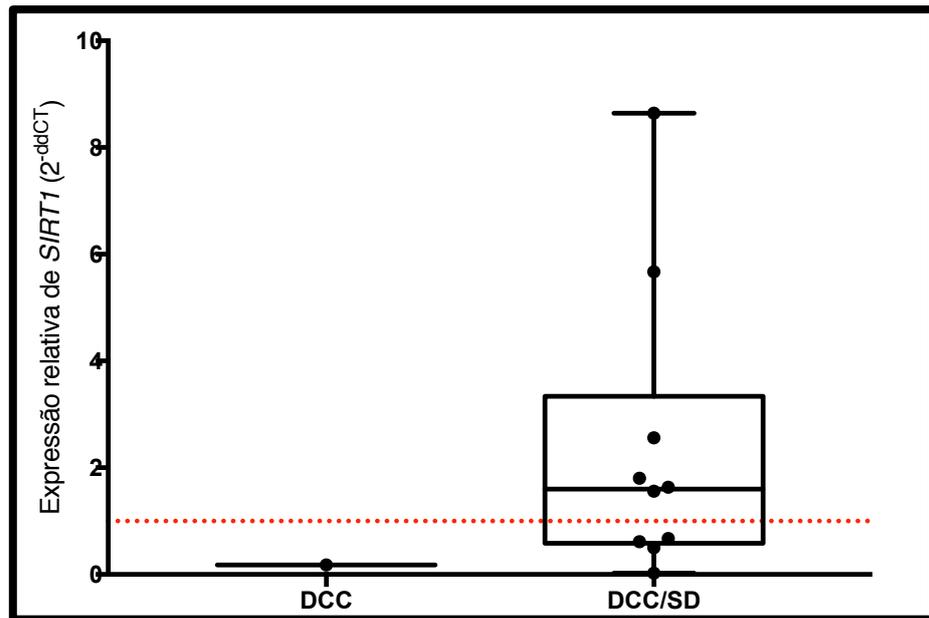
^a: *SIRT6* e *SIRT7* não apresentaram expressão gênica.

4.2.1 Análises das sirtuínas

4.2.1.1 Sirtuínas nucleares

No grupo dos pacientes com DCC/SD, 55,5% expressou o gene da *SIRT1*, enquanto que em apenas 25% do grupo de pacientes com DCC foi detectada a expressão. No grupo de pacientes com SD, todos expressaram *SIRT1*. Como nenhum dos pacientes do grupo controle demonstrou expressão do gene *SIRT1*, para o cálculo no $\Delta\Delta\text{Ct}$ foi considerado o grupo com SD foi considerado calibrador (Fig. 12).

Figura 12. Gráfico da expressão relativa de *SIRT1*.

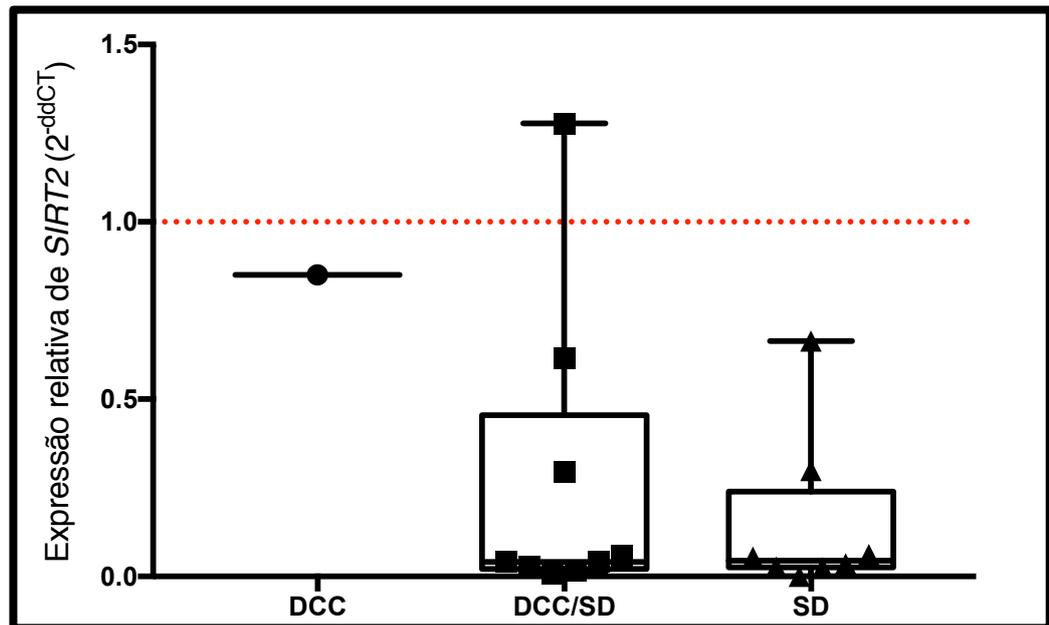


No grupo de DCC apenas um paciente apresentou expressão, sendo a mesma *down regulated*. Já no grupo de pacientes com DCC/SD, 60% se apresentaram *up regulated*, porém sem diferença estatisticamente significativa. Não foi detectada expressão de *SIRT6* e *SIRT7* em nenhum dos pacientes, em nenhum dos grupos.

4.2.1.2 Sirtuína citoplasmática

No grupo com SD foi possível observar a expressão de *SIRT2* em 72,8% dos pacientes. No grupo de DCC/SD, 47,4% apresentaram expressão do *SIRT2*, enquanto que apenas 20% do grupo de indivíduos com DCC expressou este gene. Além disso, em apenas 25% do grupo saudável foi detectada a expressão de *SIRT2*. Não houve diferença significativa entre o número de pacientes que expressaram e que não expressaram o gene da *SIRT2* em nenhum dos grupos avaliados (Fig. 13). Em relação aos níveis de expressão, todos os grupos se mostraram *down regulated* em relação ao grupo saudável, não havendo diferença significativa entre os grupos.

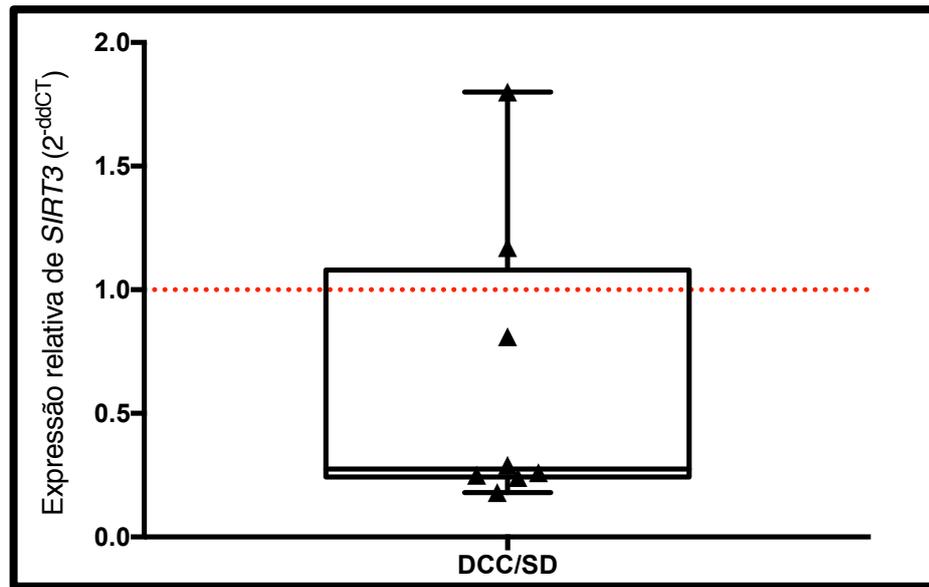
Figura 13. Gráfico da expressão relativa de SIRT2.



4.2.1.3 Sirtuínas mitocondriais

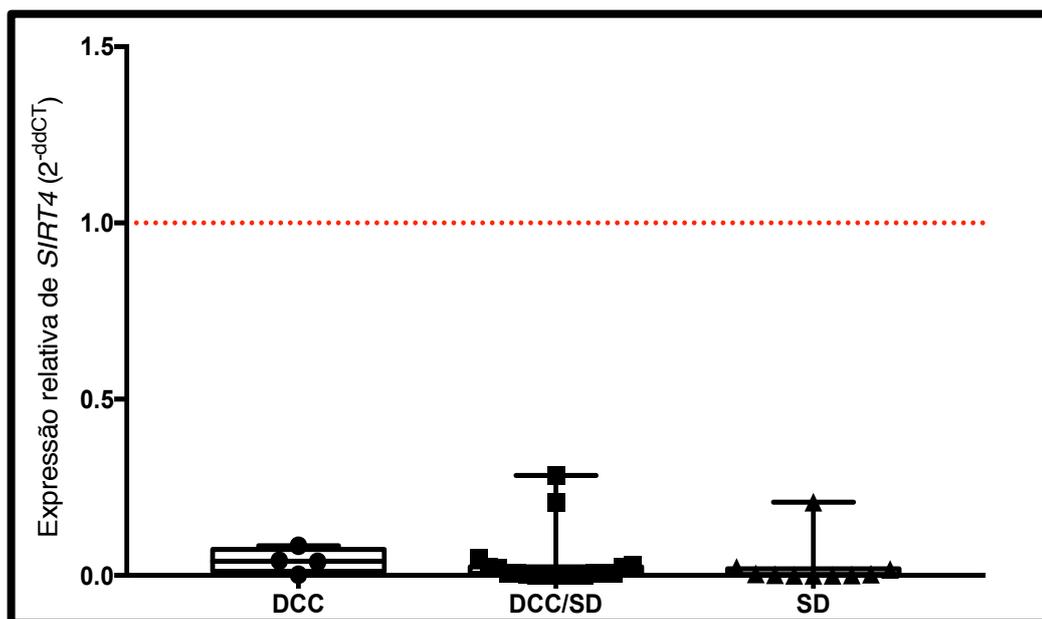
Dentre as sirtuínas mitocondriais (*SIRT3*, *SIRT4* e *SIRT5*) as *SIRT4* e *SIRT5* tiveram maior expressão que a *SIRT3*. Nas análises de *SIRT3* nos grupos de DCC/SD (45%) e dos pacientes com SD (44,5%), houve um baixo índice de expressão dessa sirtuína. Analisando os pacientes com DCC, não foi detectada a expressão da *SIRT3*, e o mesmo ocorreu com os indivíduos do grupo saudável. Dessa forma, não houve diferença significativa entre os grupos. Devido à ausência da expressão de *SIRT3* dos pacientes do grupo saudável, o grupo com SD foi considerado como calibrador para o cálculo do $\Delta\Delta C_t$. Com isso, a maioria dos pacientes com DCC/SD se apresentaram *down regulated* em relação ao grupo de indivíduos com SD (Fig. 14).

Figura 14. Gráfico da expressão relativa de SIRT3.



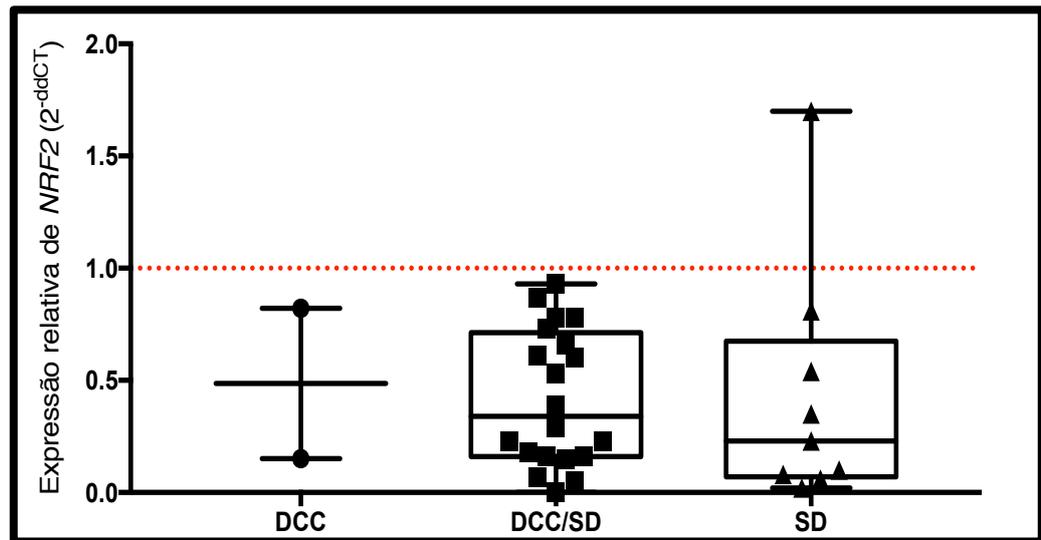
Em todos os grupos, grande parte dos pacientes expressaram o gene da *SIRT4*: 80% do grupo de DCC, 95% dos DCC/SD, e 91% dos pacientes com SD. No grupo saudável, todos os indivíduos expressaram *SIRT4*. Análise estatística entre o número de pacientes que expressaram e que não expressaram o gene da *SIRT4*, não apresentou significância. Quando avaliados os níveis de expressão nos diferentes grupos, foi demonstrado que todos se apresentavam *down regulated* (Fig. 15).

Figura 15. Gráfico da expressão relativa de SIRT4.



significativa desse gene. Houve diferença estatisticamente significativa entre o número de pacientes que expressou e não expressou *NRF2* (Fig. 18). Em relação aos níveis de expressão, todos os grupos se encontraram *down regulated* em relação ao grupo saudável, entretanto, sem diferença estatística.

Figura 17. Gráfico da expressão relativa de *NRF2*.

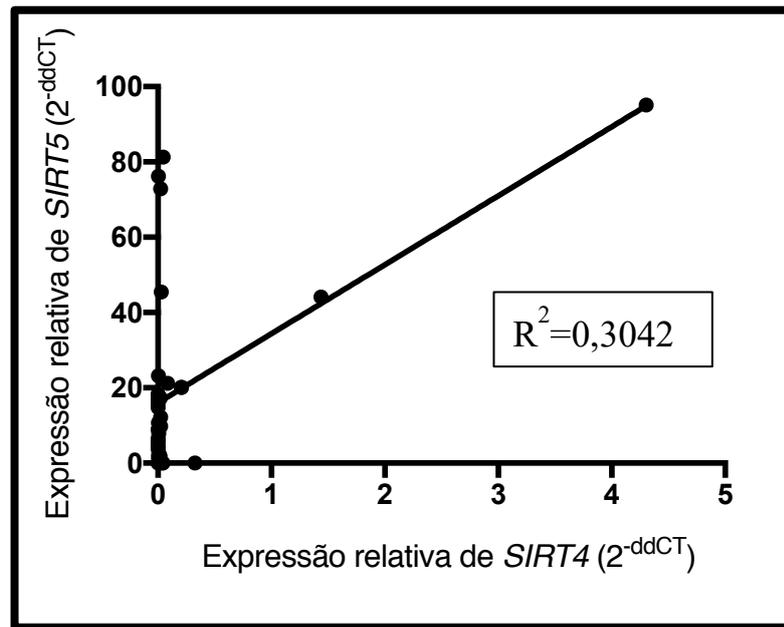


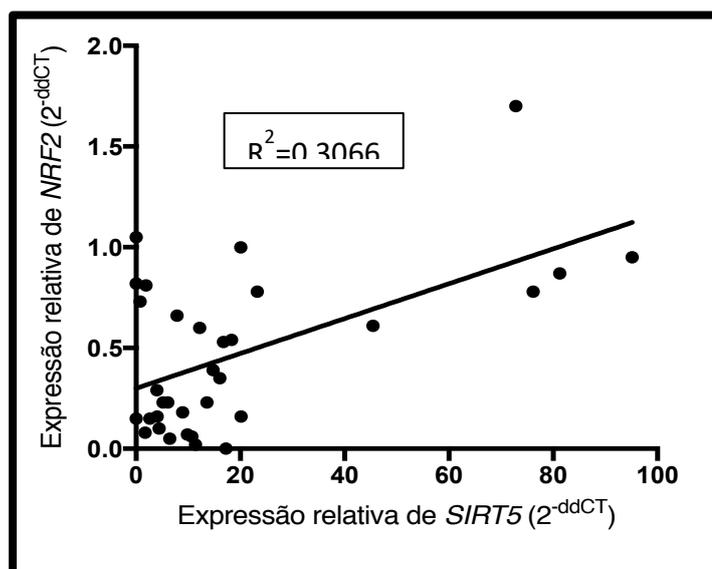
4.3 REGRESSÃO LINEAR ENTRE A EXPRESSÃO DOS GENES

A análise de regressão linear apresentou correlação negativa entre a expressão dos genes *SIRT1* e *SIRT2* ($r=-0,01201$; $R^2=0,0001442$); *SIRT2* e *SIRT3* ($r=-0,2619$; $R^2=0,0686$); e *SIRT1* e *SIRT3* ($r=-0,1401$; $R^2=0,01962$); entretanto, de acordo com os valores de r e R^2 , as interações entre as variáveis são fracas.

Entre as sirtuínas mitocondriais *SIRT4* e *SIRT5*, houve uma correlação positiva regular ($r=0,5516$; $p=0,0006$) e o valor de R^2 mostra uma relação entre as duas variáveis ($R^2=0,3042$). Entre *SIRT3* e *SIRT4*, entretanto, foi encontrada uma correlação negativa fraca ($r=-0,1333$; $R^2=0,01777$), e uma correlação positiva fraca foi encontrada entre *SIRT3* e *SIRT5* ($r=0,2002$; $R^2=0,04007$) (Fig. 19).

Figura 18. Gráfico de regressão linear relacionando a expressão dos genes *SIRT4* e *SIRT5*.





4.4 ANÁLISE DA CORRELAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO DOS GENES E IDADE DOS PACIENTES

Uma correlação negativa regular foi encontrada entre a expressão de *SIRT3* ($r=-0,4442$) e de *eNOS* ($r=-0,4728$) e a idade dos pacientes avaliados. Isso revela que a expressão desses genes diminuiu com o aumento da idade. Além disso, houve uma correlação positiva fraca entre as expressões dos genes *SIRT1* ($r=0,2216$), *SIRT2* ($r=0,2638$), *SIRT4* ($r= 0,174$), *SIRT5* ($r=0,07935$) e *NRF2* ($0,06569$) e a idade dos indivíduos (Tabela 6). Neste caso, a expressão aumentou com a idade.

Tabela 6. Correlação entre idade dos pacientes e expressão gênica.

Correlação entre idade dos pacientes e expressão gênica		
Gene	Coefficiente de correlação (r)	p-value
<i>SIRT1</i>	0,2216	0,3217
<i>SIRT2</i>	0,2638	0,2901
<i>SIRT3</i>	-0,4442	0,1283
<i>SIRT4</i>	0,174	0,303
<i>SIRT5</i>	0,07935	0,6358
<i>eNOS</i>	-0,4728	0,4213
<i>NRF2</i>	0,06569	0,712

5 DISCUSSÃO

5.1 FREQUÊNCIA DE DOENÇAS CARDÍACAS CONGÊNITAS

Uma revisão sistemática demonstrou que DSV (34%) é a DCC de maior prevalência mundial, seguida de DSA (13%), CAP (10%), estenose pulmonar (8%), Tetralogia de Fallot (5%) e TGA (5%) (VAN DER LINDE et al., 2011). Na América do Sul, há uma maior prevalência de DSV, seguido por CAP, estenose pulmonar, TGA e finalmente DSA (VAN DER LINDE et al., 2011). Nossos achados diferem da frequência mundial - entretanto, quando consideradas as frequências da América do Sul, há uma semelhança entre a prevalência de DSV e de CAP.

As DCC mais comuns no grupo de recém nascidos com SD são DSAV, DSV, TF e DSA (PFITZER et al., 2018). De acordo com as análises dos pacientes com SD deste estudo, houve uma maior prevalência de DSAV, seguido por DSV, CAP, DSA e TF. Dessa forma, exceto pela alta frequência de pacientes com CAP e a menor frequência de pacientes com TF em relação à de DSA, os resultados obtidos são semelhantes ao estudo de *Pfitzer et al.*

Análises da prevalência de DCC em um estudo no Paraná revelaram maiores frequências de DSV (28,3%), seguido por DSAV (8,1%) e DSA (7,7%) (GUITTI, 2005). Comparado aos nossos resultados do total dos pacientes (com e sem SD), pode-se dizer que a frequência de DSV (28,85%), de DSAV (28,85%) e de DSA (9,61%) são superiores ao estudo citado.

Dentre as DCC relacionadas a síndromes, SD teve a prevalência de 55%, onde 33% dos indivíduos com SD apresentaram defeitos no septo atrioventricular e 18% mostraram defeitos septais (atrial e ventricular) (GUITTI, 2005). Nas nossas análises, foram encontrados valores de prevalência maiores de DSAV e de pacientes com SD e defeitos septais.

Em Minas Gerais, num grupo de 28.915 recém-nascidos, foram encontrados 352 casos de DCC, dos quais, dos portadores de síndromes congênicas em torno de 50% eram pacientes com SD. Enquanto as lesões septais (atrial e ventricular) corresponderam a 90,3% dos casos de DCC, defeitos do septo atrioventricular corresponderam a 38,7%, além de alta frequência de DSAV e de defeitos septais em pacientes com SD (AMORIM et al., 2008), maiores do que os observados em nossos resultados.

Outro estudo brasileiro realizado em São Paulo com 119 pacientes demonstrou DSV como a DCC mais frequente (23,5%), seguido por DSAV (14,2%) e pelo DSA (9,2%) (ROCHA et al., 2018). Em nossos resultados, obtivemos frequências semelhantes - entretanto,

encontramos percentuais superiores dessas DCC em relação às análises da região Sudeste do país. No estudo de Rocha et al., a TF (5%) apresentou frequências superiores aos resultados encontrados neste trabalho, enquanto CAP (2,5%) apresentou frequências muito inferiores.

Um estudo na América do Norte também revelou maior frequência de DSAV (47%), enquanto DSV (44%) foram mais frequentes que DSA (37%) (FREEMAN et al., 2009). Apesar de termos obtido a mesma ordem de frequência percentual, a prevalência dessas DCC foi inferior à do referido estudo, que não envolvia pacientes com SD. Um estudo avaliando DCC em 63 pacientes com SD da população asiática revelou que 35% desses pacientes apresentaram DSAV, 25% eram portadores de DSA e 9,5% apresentaram DSV (JAIYESIMI; BAICHO, 2007). As frequências de DSAV e DSA foram semelhantes às encontradas neste trabalho, porém a frequência de DSV foi inferior às encontradas nas nossas análises. Por outro lado, em outro estudo realizados na Ásia, as frequências de DSAV (2,7%) e DSA (5,6%) foram inferiores às encontradas nas nossas análises, enquanto DSV (33,2%) apresentou uma frequência elevada (MAT BAH et al., 2018). Do número total de DCC relacionadas com síndromes, 56% correspondeu a pacientes com SD. Entre os indivíduos com SD, a maior frequência foi DSV (33,9%), seguido de DSAV (17,2%) e DSA (8,9%) (MAT BAH et al., 2018). Essas frequências também foram diferentes das encontradas no nosso trabalho, onde a prevalência de DSAV (42,42%) e DSA (9,09%) foram maiores, e pacientes com DSV (30,3%) obtiveram prevalência inferior.

A relação da idade dos pacientes com SD e suas respectivas cardiopatias foi observada no estudo de *Jaiyesimi et al.*, onde DSAV foram mais prevalentes em neonatos, seguidos de crianças de até 1 ano e crianças entre 1 e 10 anos; DSA foram mais frequentes em neonatos e crianças até 1 ano e menos frequentes em crianças entre 1 e 10 anos; e DSV foram mais prevalentes em crianças entre 1 e 10 anos, seguidos de crianças de até 1 ano e neonatos (JAIYESIMI; BAICHO, 2007). Esses resultados foram semelhantes aos que obtivemos, onde DSAV e DSA foram mais prevalentes em crianças mais velhas (mediana de 5 anos e de 10 anos, respectivamente) e DSV foram mais frequentes em crianças mais novas (mediana de 7 anos).

5.2 ANÁLISE DE SIRTUÍNAS

5.2.1 Sirtuínas Nucleares

A *SIRT1* aumentada é um fator protetor para o desenvolvimento de retardo cognitivo (WANG et al., 2018). Os indivíduos com SD possuem limitações cognitivas e dificuldade de

realização de atividades físicas - e, por este último motivo, esses pacientes são propensos a acúmulo de gordura, sobrepeso e obesidade (ARBUZOVA et al., 2002; KELLY et al., 2018). Dessa forma, o aumento da expressão da *SIRT1* encontrada em alguns pacientes com DCC/SD nos resultados apresentados poderia ser um fator protetor para o retardo cognitivo apresentado pelos indivíduos com SD, além de contribuir para maiores chances de desenvolvimento de obesidade, fator de risco para a SMet.

Os mecanismos antioxidantes da *SIRT1* foram reportados na diminuição da predisposição a Alzheimer e outras doenças degenerativas (WANG et al., 2018). Logo, baixa expressão de *SIRT1* em pacientes com SD poderia ser mais um fator no aumento das chances de desenvolvimento de Alzheimer, doença que portadores de SD apresentam altas chances de desenvolver (ARBUZOVA; HUTCHIN; CUCKLE, 2002). Dessa forma, de acordo com os resultados obtidos, altos níveis de *SIRT1* na maioria dos pacientes com SD (com e sem DCC) poderia ser um fator que contribui para o retardo no desenvolvimento cognitivo e predisposição ao desenvolvimento de Alzheimer.

Indivíduos com SD apresentam perfil metabólico de estresse oxidativo, que poderia ser controlado pela *SIRT1* já que esta molécula tem papel protetor contra eventos de estresse oxidativo (ARBUZOVA; HUTCHIN; CUCKLE, 2002; SINGH et al., 2018). Avaliando o perfil de expressão no grupo estudado, a *SIRT1* parece ter uma função protetora na SD para eventos oxidantes, já que no grupo de pacientes com SD (com e sem cardiopatia) houve um maior número de indivíduos que expressaram o gene em relação aos outros grupos ($p=0,0116$). Dessa forma, o gene está mais relacionado à SD que à fisiopatologia das DCC.

A *SIRT1* também já foi descrita como protetora contra DCV, como falência cardíaca, e os baixos níveis de expressão dessa sirtuína são relacionados à SMet (DE KREUTZENBERG et al., 2010; MATSUSHIMA et al., 2015). No presente estudo, poucos pacientes com DCC apresentaram expressão de *SIRT1* quando comparado aos outros grupos estudados ($p=0,0116$). Logo, essa baixa expressão dos pacientes com DCC pode ser fator protetor da *SIRT1* contra falência cardíaca. Por outro lado, *down regulation* do *SIRT1* nesses pacientes poderia contribuir para o aumento do risco de desenvolvimento de SMet no futuro. Não foram encontrados estudos demonstrando relação entre a expressão da *SIRT1* com as DCC avaliadas (com e sem SD) no presente estudo.

Em relação à expressão de *SIRT6* e *SIRT7*, também não foram encontrados estudos relacionando essas sirtuínas com a fisiopatologia das DCC, nem com a patogênese da SD. Algumas condições são conhecidas por alterar a expressão da *SIRT6*, como por exemplo o

estresse oxidativo, que diminui sua expressão, interferindo em processos fisiopatológicos modulados por essa sirtuína, como o envelhecimento celular e a inflamação (LIU et al., 2014). Além disso, o envelhecimento e uma dieta exacerbada, dois fatores para o desenvolvimento de diabetes e obesidade, foram reportados como causadores da diminuição de nível e função da *SIRT6*, resultando em alterações no metabolismo de glicose e de lipídios (KUANG et al., 2018). Adicionalmente, foi encontrada uma diminuição da atividade da *SIRT1* após a ligação da *SIRT7* em camundongos, e essa interação antagônica entre tais sirtuínas é importante para a manutenção do tecido adiposo, podendo estar envolvida na obesidade (FANG et al., 2017). No entanto, estas hipóteses não parecem estar relacionadas à não detecção da expressão de *SIRT6* e *SIRT7* nas amostras avaliadas no nosso trabalho.

5.2.2 Sirtuínas citoplasmáticas

A *SIRT2* é conhecida por influenciar genes que promovem o estresse oxidativo (SINGH et al., 2018). Apesar disso, ela foi relacionada ao combate do desenvolvimento de DCV através da proteção contra danos no processo de isquemia e reperfusão (MATSUSHIMA et al., 2015). Quase 50% dos pacientes com DCC/SD expressaram a *SIRT2* (47,4%). Entretanto, foi encontrada *down regulated* em todos os grupos analisados. Pela função da *SIRT2* na promoção do estresse oxidativo, este perfil pode funcionar como um efeito protetor. Além disso, a *SIRT2* pode estar mais relacionada a indivíduos com SD do que a indivíduos com DCC, já que mais de 70% dos pacientes com SD expressaram esse gene.

A *SIRT2* é responsável pela diminuição da adipogênese (KELLY et al., 2018). Além do fenótipo de obesidade, os pacientes com SD são caracterizados pela sua proteção natural contra aterosclerose, e a *SIRT2* também foi encontrada inibindo a progressão da placa aterosclerótica em experimentos em camundongos (ARBUZOVA et al., 2002; VERSACCI et al., 2018; ZHANG et al., 2018). Apesar do ter sido alto o número de pacientes com SD que expressaram a *SIRT2* (70%), seus níveis de expressão foram baixos, com um perfil de *down regulation* desse gene nos grupos de pacientes com SD e com DCC/SD. Logo, a *down regulation* dessa sirtuína poderia contribuir para as maiores chances de desenvolvimento de obesidade nos pacientes com SD. Entretanto, em relação à proteção contra aterosclerose nestes pacientes, a *SIRT2 down regulated* não colaboraria para a função protetora contra aterosclerose apresentada por indivíduos com SD.

A *SIRT2* é altamente expressa nas células endoteliais, mediando a resposta ao estresse oxidativo (LIU et al., 2013). Pela sua função nas células endoteliais, a inibição farmacológica

da *SIRT2* levou à atenuação da toxicidade celular induzida pela oxidação (LIU et al., 2013). Por outro lado, a alta expressão dessa sirtuína foi relacionada à inibição da progressão da placa aterosclerótica, aumentando sua estabilidade (ZHANG; MA; XIANG, 2018). Dessa forma, a *down regulation* da *SIRT2* pode aumentar o ambiente oxidativo e piorar a progressão da placa aterosclerótica, contribuindo para a SMet na idade adulta.

5.2.3 Sirtuínas Mitocondriais

A maioria dos estudos que descreve o estresse oxidativo em pacientes com SD utiliza como base as alterações mitocondriais, pela função dessa organela nos processos oxidativos (ARBUZOVA et al., 2002; HELGUERA et al., 2013; VALENTI et al., 2010, 2011, 2014; ZAMPONI et al., 2018). Além disso, há uma resposta adaptativa das atividades mitocondriais, que levam à regulação negativa da organela na SD (HELGUERA et al., 2013). Isso demonstra a necessidade de terapias mitocondriais para preservar a viabilidade e recuperar a função celular na SD e, possivelmente, outras condições clínicas em que o metabolismo energético é comprometido. Levando em consideração o papel das mitocôndrias, entre todas as sirtuínas analisadas neste estudo, as sirtuínas mitocondriais 3, 4 e 5 podem estar mais intimamente relacionadas à SD.

Apesar da *SIRT3* ser relacionada à expressão de genes oxidativos, essa sirtuína também já foi caracterizada como protetora contra eventos cardiovasculares (SINGH et al., 2018; XU et al., 2016). Nas análises de *SIRT3*, poucos pacientes expressaram o gene, e os indivíduos com DCC/SD mostraram um perfil de *down regulation*, o que pode ser explicado pela regulação negativa mitocondrial dos pacientes com SD. A ausência da expressão de *SIRT3* nos grupos saudáveis e com DCC pode ser um fator protetor contra outras DCVs e SMet pelo papel oxidativo da sirtuína. Adicionalmente, já foi demonstrada a associação entre a perda da função da *SIRT3* e insuficiência cardíaca, e entre lesões cardíacas causadas por isquemia e reperfusão do miocárdio (KOENTGES; BODE; BUGGER, 2016). Por isso, algumas terapias com agonistas de *SIRT3* estão sendo estudadas para prevenção de hipertrofia cardíaca e lesão de isquemia e reperfusão (HU et al., 2016). Dessa forma, o perfil de diminuição da expressão da *SIRT3* encontrado na maioria dos pacientes com DCC/SD poderia ser prejudicial para função cardiovascular desses pacientes, que já se apresenta comprometida.

A *SIRT4* já foi estabelecida tanto pelo seu papel na oxidação quanto em processos antioxidantes. Dessa forma, ainda não está claro quando a sua expressão pode ou não aumentar as chances de desenvolver SMet (SINGH et al., 2018). A *SIRT4* também está envolvida no

metabolismo energético e na homeostase lipídica (LAURENT et al., 2013). O perfil de *down regulation* na expressão dessa sirtuína corrobora a teoria da depleção mitocondrial dos pacientes com SD, mas não podemos determinar se há aumento das chances de desenvolvimento de SMet neste grupo, assim como para os pacientes portadores de DCC.

Em conjunto, *SIRT4* e *SIRT5* podem desempenhar um papel importante nas patologias cardíacas (KOENTGES; BODE; BUGGER, 2016). Nossos resultados corroboram essa hipótese, já que houve uma correlação entre a expressão dessas duas sirtuínas, onde as duas parecem aumentar sua expressão proporcionalmente.

Pelo seu papel no metabolismo lipídico e da glicose, a *SIRT5* também pode estar relacionada ao desenvolvimento de DCV e SMet (WU et al., 2014). Em estudo com camundongos numa condição de estresse cardíaco crônico, a *SIRT5* demonstrou um papel fundamental na manutenção do metabolismo oxidativo cardíaco para garantir a sobrevivência dos animais (HERSHBERGER et al., 2017). Camundongos com deficiência de *SIRT5* exibiram alterações no metabolismo dos ácidos graxos, diminuição da produção de ATP e cardiomiopatia hipertrófica, sugerindo a importância dessa sirtuína na função cardíaca (SADHUKHAN et al., 2016). Dessa forma, a alta expressão da *SIRT5* encontrada em nossos resultados pode ser um fator protetor contra alterações nas funções metabólicas e na função cardíaca, através da regulação do equilíbrio dos mecanismos de estresse oxidativo em pacientes com DCC.

5.3 GENE *eNOS*

Alterações no gene *eNOS* têm sido relacionadas principalmente ao desenvolvimento de DCV pela disfunção endotelial, que é associada à diminuição do NO - fator de risco para o desenvolvimento de placa aterosclerótica e, conseqüentemente, DCV (HASSANI IDRISSE et al., 2016; SATTA et al., 2017). Como os pacientes com SD são caracterizados pela sua proteção natural contra aterosclerose, o esperado seria que esses indivíduos apresentassem um perfil de *up regulation* de *eNOS*. Entretanto, foram encontrados poucos pacientes com a expressão desse gene, sendo todos os indivíduos pacientes com SD (com DCC e sem DCC).

Os indivíduos com SD têm uma característica de estresse oxidativo crônico (ZAMPONI et al., 2018). A expressão do gene *eNOS* no grupo de DCC/SD se apresentou *down regulated*. Se levada em consideração apenas a regulação negativa desse gene neste estudo, os pacientes com DCC/SD teriam maiores chances de desenvolver SMet. Porém, poucos pacientes apresentaram a expressão do gene *eNOS*, dificultando as análises.

A enzima eNOS se relaciona em algumas vias com as SIRT. Em um estudo avaliando os efeitos do resveratrol (composto com diversos efeitos biológicos, como proteção de DCV e SMet), o gene *eNOS* teve expressão e atividade aumentadas, e a *SIRT1* parece ter um efeito estimulante na produção de NO, através da desacetilação de *eNOS* (ZORDOKY et al., 2014). Além disso, a *SIRT1* regula a fisiologia celular, controlando a homeostase endotelial e a funcionalidade vascular, modulando a atividade da enzima eNOS (D'ONOFRIO et al., 2018). Nos resultados deste trabalho, a *SIRT1* teve sua expressão *up regulated* em alguns pacientes com DCC/SD. Uma hipótese seria que a SIRT1 pode estar envolvida na modulação do gene *eNOS*. Assim, pela alta expressão da *SIRT1* em alguns pacientes, pode haver um silenciamento e consequentemente uma desregulação na expressão de *eNOS*. Desta forma, pacientes com DCC/SD poderiam ter maiores chances de desenvolver outras DCV e SMet, apesar dessas duas moléculas serem caracterizadas por sua função protetora contra essas doenças.

A regulação negativa da *SIRT3* em cultura de células endoteliais humanas leva ao aumento das ROS mitocondriais e diminuição da sinalização da insulina, levando também à diminuição de eNOS e consequentemente de NO (YANG et al., 2016) (YANG et al., 2016) (YANG et al., 2016) (YANG et al., 2016). Logo, a superprodução de ROS causada pela deficiência de *SIRT3* leva à resistência endotelial à insulina e atenua a disfunção endotelial na obesidade (YANG et al., 2016). A expressão aumentada de *SIRT3* leva à redução da disfunção endotelial provocada pela oxidação (XIE et al., 2016). Dessa forma, a baixa expressão de *SIRT3* encontrada em nosso estudo pode ter contribuído para a *down regulation* do *eNOS*, já que foi encontrada uma forte correlação positiva entre esses dois genes. Assim, a diminuição da expressão dos genes *eNOS* e *SIRT3* poderia acarretar no aumento de ROS e, consequentemente, elevar o risco de alterações endoteliais que podem levar a maiores chances de desenvolver SMet em pacientes com DCC.

5.4 GENE *NRF2*

O *NRF2* é um antioxidante que tem um papel importante na regulação do estresse oxidativo na SD (ZAMPONI et al., 2018). Dessa forma, todos os indivíduos com SD avaliados neste trabalho expressaram *NRF2*. Apesar do alto número de indivíduos que expressaram esse gene, todos os grupos se apresentaram *down regulated*. Pelas suas funções antioxidantes, a deficiência de *NRF2* (ou baixa expressão) pode ser relacionada a um fator agravante para SMet, podendo ainda piorar os níveis lipídicos e contribuir para o perfil de adiposidade apresentado por indivíduos com SD.

A deficiência de *NRF2* é relacionada ainda a diversos componentes da SMet, como dislipidemias e desregulação no metabolismo da insulina (XUE et al., 2013). Houve uma *down regulation* na expressão de *NRF2* nos grupos de pacientes com DCC (com e sem SD), podendo este ser um fator para aumento da chance de indivíduos desse grupo desenvolverem SMet no futuro.

Os genes *eNOS* e *NRF2* se relacionam em vias e sob estresse oxidativo. Quando há disponibilidade limitada de cofatores essenciais para *eNOS*, a ativação de *NRF2* leva à redução dos níveis de *eNOS* (HEISS et al., 2009). Ao contrário do gene *eNOS*, houve um alto número de pacientes que expressaram o gene *NRF2*. Dessa forma, o *NRF2* estaria contribuindo mais efetivamente para proteção contra eventos oxidativos e, conseqüentemente, SMet, em relação ao gene *eNOS*. Logo, a diferença entre níveis de expressão de *eNOS* e *NRF2* pode se dar pelo equilíbrio entre as duas moléculas.

Além disso, *eNOS* e *NRF2* se relacionam através da *SIRT1*. Sob o efeito do resveratrol e na presença de estresse oxidativo, a *SIRT1* ativa *eNOS* e *NRF2*, resultando em efeitos anti-hipertensivos (ZORDOKY et al., 2014). Em conjunto com *SIRT1*, os efeitos antioxidantes do *NRF2* podem ser importantes para diminuição do estado oxidativo encontrado na SD. De acordo com os resultados obtidos, a ativação do *NRF2* pela *SIRT1* parece ser mais efetiva do que a de *eNOS* em pacientes com SD. Dessa forma, essas três moléculas juntas poderiam contribuir para evitar o desenvolvimento de SMet.

A *SIRT1* também atua na redução de retardo cognitivo, através de mecanismos antioxidantes e anti-inflamatórios através das vias de sinalização SIRT1/NRF2/NF-kB (WANG et al., 2018). Essa atuação em conjunto pode ser importante em indivíduos com SD, já que a dificuldade de aprendizado é uma característica de grande parte desses pacientes.

SIRT2 também foi relatada como reguladora dos níveis nucleares de *NRF2*. Mediante a ação de *SIRT2*, foi demonstrada uma desacetilação do gene *NRF2*, resultando em redução dos níveis de *NRF2* total e nuclear em vias do metabolismo do ferro – fontes naturais de ROS (YANG et al., 2017). De acordo com os resultados obtidos, o perfil de *down regulation* da *SIRT2* nos pacientes avaliados pode ter diminuído a desacetilação do gene *NRF2*, o que levou esse gene a ter uma baixa expressão. O *NRF2* também se relaciona com as *SIRT 1, 3, 5 e 6*, uma vez que essas sirtuínas modulam os níveis de ROS, enzimas antioxidantes e estresse oxidativo através de fatores de transcrição, como o *NRF2*, regulando também a atividade de elementos de respostas antioxidantes (SINGH et al., 2018). Nas nossas análises, foram observadas correlações regulares entre *NRF2* e *SIRT1*, e entre *NRF2* e *SIRT5*. Assim, as *SIRT 1 e 5* no

nosso estudo parecem contribuir para a diminuição do ambiente de estresse oxidativo, encontrado principalmente em pacientes com SD, através de *NRF2*.

6 CONCLUSÃO

De acordo com o perfil de expressão, as *SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3* e o gene *eNOS* parecem estar mais relacionados a pacientes com SD que a DCC. A diminuição da expressão de *SIRT1*, sirtuína antioxidante, em pacientes com DCC pode ser um fator para o aumento do estresse oxidativo e consequentemente pode apresentar um fator de risco para o desenvolvimento de DCVs adquiridas. Por outro lado, a diminuição da expressão de *SIRT2* em pacientes com DCC pode ser um fator de proteção para o desenvolvimento de outras DCV, pelo papel pró oxidante dessa sirtuína.

Em relação às SIRT mitocondriais, a *SIRT3* se apresentou *down regulated*, o que contribui para maiores riscos de desenvolver DCV nos pacientes com DCC/SD. Não foi possível observar um perfil para *SIRT4*, já que ela apresentou baixa expressão em pacientes de todos os grupos - além disso, não há consenso entre sua contribuição positiva ou negativa na fisiopatologia do estresse oxidativo na DCC. Por outro lado, a *SIRT5* demonstrou uma alta expressão em todos os grupos, sendo este um fator protetor contra mecanismos do estresse oxidativo e desenvolvimento de componentes da SMet nos pacientes com DCC e contra o estresse oxidativo crônico de indivíduos com SD.

As *SIRT6* e *SIRT7* não demonstraram contribuição para a patogênese da SD e da DCC neste estudo. A expressão de *eNOS* foi baixa em todos os grupos avaliados, porém a *SIRT1* e a *SIRT3* podem ter tido um efeito regulatório em vias metabólicas associadas, levando à diminuição da expressão de *eNOS*. Já o gene *NRF2*, que teve baixos níveis de expressão em pacientes com DCC, pode estar envolvido no desenvolvimento de SMet, modulando a função da NRF2 em componentes metabólicos. Além disso, em pacientes com SD, os baixos níveis de expressão podem piorar o estresse oxidativo crônico e ser um fator de risco para obesidade, características desses pacientes. A baixa expressão do *NRF2* pode ter ocorrido devido à regulação negativa exercida por *SIRT1*, *SIRT2* e *SIRT5*. Além disso, em conjunto, *eNOS*, *NRF2* e *SIRT1* poderiam reduzir o ambiente de oxidação característico da SD, diminuindo dessa forma as chances de desenvolver DCV e SMet neste grupo.

REFERÊNCIAS

- ALAGEEL, A. et al. Evidence supporting a mechanistic role of sirtuins in mood and metabolic disorders. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 86, n. May, p. 95–101, 2018.
- ALKHARFY, K. M. et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms (894G > T and -786T > C) and Risk of Coronary Artery Disease in a Saudi Population. **Archives of Medical Research**, 2010.
- ALPOIM, P. N. et al. Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase gene in early and late severe preeclampsia. **Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society**, v. 42C, p. 19–23, 2014.
- AMORIM, L. F. P. et al. Presentation of congenital heart disease diagnosed at birth: analysis of 29,770 newborn infants. **Jornal de Pediatria**, v. 0, n. 0, p. 83–90, 2008.
- ARBUZOVA, S.; HUTCHIN, T.; CUCKLE, H. Mitochondrial dysfunction and Down's syndrome. **BioEssays**, v. 24, n. 8, p. 681–684, 2002.
- ARUL NAMBI RAJAN, K. et al. Sirtuin1 is required for proper trophoblast differentiation and placental development in mice. **Placenta**, v. 62, n. 2018, p. 1–8, 2018.
- Associação Americana do Coração. Disponível em <<https://www.heart.org/en/health-topics/congenital-heart-defects>> Acesso em: Janeiro, 2019.
- BARANČÍK, M. et al. Nrf2 as a Key Player of Redox Regulation in Cardiovascular Diseases. **Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca**, v. 65, p. S1–S10, 2016.
- BERGHOLDT, R. et al. Increased prevalence of Down's syndrome in individuals with type 1 diabetes in Denmark: A nationwide population-based study. **Diabetologia**, v. 49, n. 6, p. 1179–1182, 2006.
- BOGGS, S. et al. Neonatal Ethics Teaching Program - Scenario-Oriented Learning in Ethics: Announcing the Diagnosis of Trisomy 21. **MedEdPORTAL Publications**, v. 13, p. 1–7, 2017.
- BOYLSTON, J. A. et al. Characterization of the cardiac succinylome and its role in ischemia-reperfusion injury. p. 73–81, 2016.
- BRADLEY, E.; PARKER. Cardiovascular disease in late survivors of tetralogy of fallot: a tertiary care center experience. **Texas Heart Institute Journal**, v. 40, n. 4, p. 418–423, 2013.
- CAI, H.; HARRISON, D. G. Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases -The Role of Oxidant Stress. p. 840–844, 2000.

- CARTIER, J. et al. Alterations in glucose concentrations affect DNA methylation at Lrg1 in an ex vivo rat cortical slice model of preterm brain injury. **European Journal of Neuroscience**, v. 47, n. 5, p. 380–387, 2018.
- CARVALHO, J. S. Improving the effectiveness of routine prenatal screening for major congenital heart defects. **Heart**, v. 88, n. 4, p. 387–391, 2002.
- CHENG, Y. et al. Interaction of Sirt3 with OGG1 contributes to repair of mitochondrial DNA and protects from apoptotic cell death under oxidative stress. **Cell Death and Disease**, v. 4, n. 7, p. 1–11, 2013.
- COHEN, M. S. Clinical practice: The effect of obesity in children with congenital heart disease. **European Journal of Pediatrics**, v. 171, n. 8, p. 1145–1150, 2012.
- D'ONOFRIO, N.; SERVILLO, L.; BALESTRIERI, M. L. SIRT1 and SIRT6 Signaling Pathways in Cardiovascular Disease Protection. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 28, n. 8, p. 711–732, 2018.
- DAIBER, A. et al. **New Therapeutic Implications of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Function / Dysfunction in Cardiovascular Disease.** [s.l: s.n.].
- DE ASUA, D. R. et al. A cross-sectional study of the phenotypes of obesity and insulin resistance in adults with Down syndrome. **Diabetes and Metabolism Journal**, v. 38, n. 6, p. 464–471, 2014.
- DE KREUTZENBERG, S. V. et al. Downregulation of the longevity-associated protein sirtuin 1 in insulin resistance and metabolic syndrome: Potential biochemical mechanisms. **Diabetes**, v. 59, n. 4, p. 1006–1015, 2010.
- DEEN, J. F. et al. Metabolic syndrome in adults with congenital heart disease. **Journal of the American Heart Association**, v. 5, n. 2, p. 1–8, 2016.
- DRAHEIM, C. C.; GEIJER, J. R.; DENGEL, D. R. Comparison of Intima-Media Thickness of the Carotid Artery and Cardiovascular Disease Risk Factors in Adults With Versus Without the Down Syndrome. **AJC**, v. 106, n. 10, p. 1512–1516, 2010.
- DUPLAIN, H. et al. Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. **Circulation**, v. 104, n. 3, p. 342–5, 2001.
- FANG, J. et al. Sirt7 promotes adipogenesis in the mouse by inhibiting autocatalytic activation of Sirt1. 2017.
- FAVERO, G. et al. Sirtuins , aging , and cardiovascular risks. 2015.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. **Nitric oxide synthases: Regulation and function** *European Heart Journal*, 2012.

FREEMAN, S. B. et al. Ethnicity, sex, and the incidence of congenital heart defects: a report from the National Down Syndrome Project. *Genetics in Medicine*, v. 10, n. 3, p. 173–180, 2009.

GIANNAKOULAS, G. et al. Burden of Coronary Artery Disease in Adults With Congenital Heart Disease and Its Relation to Congenital and Traditional Heart Risk Factors. *American Journal of Cardiology*, v. 103, n. 10, p. 1445–1450, 2009.

GIORDANO, F. J. Review series Oxygen , oxidative stress , hypoxia , and heart failure. *J. Clin. Invest.*, v. 115, n. 3, p. 500–508, 2005.

GÓMEZ-GUZMÁN, M. et al. Epicatechin lowers blood pressure, restores endothelial function, and decreases oxidative stress and endothelin-1 and NADPH oxidase activity in DOCA-salt hypertension. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 52, n. 1, p. 70–79, 2012.

GOSZCZ, K. et al. Antioxidants in cardiovascular therapy : panacea or false hope ? v. 2, n. July, p. 1–22, 2015.

GROSSMAN, E. Does Increased Oxidative Stress Cause Hypertension? *Diabetes Care*, v. 31, n. Supplement 2, p. S185–S189, 1 fev. 2008.

GUITTI, J. C. DOS S. Epidemiological characteristics of congenital heart diseases in Londrina, Paraná South Brazil. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 74, n. 5, p. 400–404, 2005.

HASSANI IDRISSE, H. et al. Association of G894T eNOS, 4G/5G PAI and T1131C APOA5 polymorphisms with susceptibility to myocardial infarction in Morocco. *Meta Gene*, v. 9, p. 56–61, 2016.

HEISS, E. H. et al. Active NF-E2-related factor (Nrf2) contributes to keep endothelial NO synthase (eNOS) in the coupled state: Role of reactive oxygen species (ROS), eNOS, and heme oxygenase (HO-1) levels. *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 46, p. 31579–31586, 2009.

HELGUERA, P. et al. Adaptive Downregulation of Mitochondrial Function in Down Syndrome. *Cell Metabolism*, v. 17, n. 1, p. 132–140, jan. 2013.

HERSHBERGER, K. A. et al. Sirtuin 5 is required for mouse survival in response to cardiac pressure. v. 292, p. 19767–19781, 2017.

- HIRSCHEY, M. D. et al. SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. **Nature**, v. 464, n. 7285, p. 121–125, 4 mar. 2010.
- HIRSCHEY, M. D. et al. SIRT3 Deficiency and Mitochondrial Protein Hyperacetylation Accelerate the Development of the Metabolic Syndrome. v. 44, n. 2, p. 177–190, 2011.
- HSIEH, M.-C. et al. The association of endothelial nitric oxide synthase G894T polymorphism with C-reactive protein level and metabolic syndrome in a Chinese study group. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 57, n. 8, p. 1125–9, 2008.
- HU, D. et al. Roles of SIRT3 in heart failure : from bench to bedside *. v. 17, n. 11, p. 821–830, 2016.
- JAIYESIMI, O.; BAICHO, V. Cardiovascular malformations in Omani Arab children with Down's syndrome. **Cardiology in the Young**, v. 17, n. 2, p. 166–171, 2007.
- JOSEPH, P. et al. Reducing the global burden of cardiovascular disease, part 1: The epidemiology and risk factors. **Circulation Research**, v. 121, n. 6, p. 677–694, 2017.
- KADAKIA, R. et al. HHS Public Access. v. 12, n. Suppl 1, p. 57–64, 2018.
- KANETO, H. et al. Activation of the Hexosamine Pathway Leads to Deterioration of Pancreatic β -Cell Function through the Induction of Oxidative Stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 33, p. 31099–31104, 2001.
- KELLY, A. et al. Relationships of Body Composition to Cardiac Structure and Function in Adolescents With Down Syndrome are Different than in Adolescents Without Down Syndrome. **Pediatric Cardiology**, v. 0, n. 0, p. 0, 2018.
- KOBAYASHI, M.; YAMAMOTO, M. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 46, n. 1, p. 113–140, 2006.
- KOENTGES, C.; BODE, C.; BUGGER, H. SIRT3 in Cardiac Physiology and Disease. v. 3, n. October, p. 22–29, 2016.
- KRISHNAN, J. et al. Dietary obesity-associated Hif1 α activation in adipocytes restricts fatty acid oxidation and energy expenditure via suppression of the Sirt2-NAD⁺ system. p. 259–270, 2012.
- KUANG, J. et al. Fat-specific Sirt6 ablation sensitizes mice to high-fat diet-induced obesity and insulin resistance by inhibiting lipolysis. 2017.
- KUANG, J. et al. The Role of Sirt6 in Obesity and Diabetes. v. 9, n. February, p. 1–9, 2018.

- LAURENT, G. et al. SIRT4 Coordinates the Balance between Lipid Synthesis and Catabolism by Repressing Malonyl CoA Decarboxylase. **Molecular Cell**, v. 50, n. 5, p. 686–698, jun. 2013.
- LEGENDRE, A. Coronary Events After Arterial Switch Operation for Transposition of the Great Arteries. **Circulation**, v. 108, n. 90101, p. 186II–190, 2003.
- LIU, J. et al. Global Gene Expression Profiling Reveals Functional Importance of Sirt2 in Endothelial Cells under Oxidative Stress. p. 5633–5649, 2013.
- LIU, R. et al. Oxidative Stress Induces Endothelial Cell Senescence via Downregulation of Sirt6. v. 2014, 2014.
- LIU, T. et al. Functional genetic variants within the SIRT2 gene promoter in type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 137, p. 200–207, 2018.
- LIU, X. et al. Maternal Preconception Body Mass Index and Offspring Cord Blood DNA Methylation: Exploration of Early Life Origins of Disease. **Environ Mol Mutagen**, v. 55, n. 3, p. 223–230, 2015.
- LOMBARD, D. B. et al. Mammalian Sir2 Homolog SIRT3 Regulates Global Mitochondrial Lysine Acetylation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 24, p. 8807–8814, 2007.
- LUO, J. Q. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene G894T polymorphism and myocardial infarction: A meta-analysis of 34 studies involving 21068 subjects. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.
- MAKSIN-MATVEEV, A. et al. Sirtuin 6 protects the heart from hypoxic damage. **Experimental Cell Research**, v. 330, n. 1, p. 81–90, 2015.
- MAT BAH, M. N. et al. The birth prevalence, severity, and temporal trends of congenital heart disease in the middle-income country: A population-based study. **Congenital Heart Disease**, v. 13, n. 6, p. 1012–1027, 2018.
- MATSUSHIMA, S.; SADOSHIMA, J. The role of sirtuins in cardiac disease. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 309, n. 9, p. H1375–H1389, 2015.
- MERKSAMER, P. I. et al. The sirtuins , oxidative stress and aging : an emerging link. v. 5, n. 3, p. 144–150, 2013.

- MIRANDA, M. X. et al. The Sirt1 activator SRT3025 provides atheroprotection in Apoe^{-/-} mice by reducing hepatic Pcsk9 secretion and enhancing Ldlr expression. **European Heart Journal**, v. 36, n. 1, p. 51–59, 2015.
- MONTEZANO, A. C. et al. Redox signaling, Nox5 and vascular remodeling in hypertension. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 24, n. 5, p. 425–433, 2015.
- MONTI, L. D. et al. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms are associated with type 2 diabetes and the insulin resistance syndrome. **Diabetes**, v. 52, n. 5, p. 1270–1275, 2003.
- MOONS, P. et al. Prevalence of cardiovascular risk factors in adults with congenital heart disease. **European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation**, v. 13, n. 4, p. 612–616, 28 ago. 2006.
- MOSCHEN, A. R. et al. Adipose tissue and liver expression of SIRT1 , 3 , and 6 increase after extensive weight loss in morbid obesity. **JOURNAL OF HEPATOLOGY**, v. xxx, p. 1–8, 2013.
- NAKAGAWA, T.; GUARENTE, L. Sirtuins at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 6, p. 833–838, 2011.
- OHUCHI, H. et al. High prevalence of abnormal glucose metabolism in young adult patients with complex congenital heart disease. **American Heart Journal**, v. 158, n. 1, p. 30–39, 2009.
- OLIVEIRA-PAULA, G. H.; LACCHINI, R.; TANUS-SANTOS, J. E. Endothelial nitric oxide synthase: From biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms. **Gene**, v. 575, n. 2, p. 584–599, 2016.
- PARIHAR, P. et al. Mitochondrial sirtuins: Emerging roles in metabolic regulations, energy homeostasis and diseases. **Experimental Gerontology**, v. 61, p. 130–141, 2015.
- PARODI-RULLÁN, R. M.; CHAPA-DUBOCQ, X. R.; JAVADOV, S. Acetylation of Mitochondrial Proteins in the Heart : The Role of SIRT3. v. 9, n. August, p. 1–20, 2018.
- PFITZER, C. et al. Dynamics in prevalence of Down syndrome in children with congenital heart disease. p. 107–115, 2018.
- PFLUGER, P. T. et al. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 28, p. 9793–9798, 2008.
- PHAM, J. et al. The role of Sirtuin1–PPAR γ axis in placental development and function. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 60, n. 4, p. R201–R212, maio 2018.

- PICARD, F. et al. Erratum: Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- γ . **Nature**, v. 429, n. 6993, p. 771–776, 2 jun. 2004.
- PINTO, N. M. et al. Obesity Is a Common Comorbidity in Children With Congenital and Acquired Heart Disease. **Pediatrics**, v. 120, n. 5, p. e1157–e1164, 2007.
- PLAIASU, V. Down Syndrome - Genetics and Cardiogenetics. **Maedica**, v. 12, n. 3, p. 208–213, 2017.
- QIAO, L. et al. Maternal high-fat feeding increases placental lipoprotein lipase activity by reducing SIRT1 expression in mice. **Diabetes**, v. 64, n. 9, p. 3111–3120, 2015.
- ROCHA, L. A. et al. Risk Factors for Mortality in Children with Congenital Heart Disease Delivered at a Brazilian Tertiary Center. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 33, n. 6, p. 603–607, 2018.
- SADHUKHAN, S. et al. Metabolomics-assisted proteomics identifies succinylation and SIRT5 as important regulators of cardiac function. v. 113, n. 16, p. 1–6, 2016.
- SATTA, S. et al. The Role of Nrf2 in Cardiovascular Function and Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.
- SAWADA, T. et al. Relation of the Glu298Asp polymorphism of the nitric oxide synthase gene to hypertension and serum cholesterol in Japanese workers. **Preventive Medicine**, 2008.
- SINGH, C. K. et al. The Role of Sirtuins in Antioxidant and Redox Signaling. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 28, n. 8, p. 643–661, 10 mar. 2018.
- SUN, W. et al. SIRT3 : A New Regulator of Cardiovascular Diseases. v. 2018, 2018.
- TANAKA, Y. et al. NF-E2-Related Factor 2 Inhibits Lipid Accumulation and Oxidative Stress in Mice Fed a High-Fat Diet. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 325, n. 2, p. 655–664, 2008.
- TANG, X. et al. SIRT2 acts as a cardioprotective deacetylase in pathological cardiac hypertrophy. **Circulation**, v. 136, n. 21, p. 2051–2067, 2017.
- TARANTINO, G. et al. Circulating Levels of Sirtuin 4 , a Potential Marker of Oxidative Metabolism , Related to Coronary Artery Disease in Obese Patients Suffering from NAFLD , with Normal or Slightly Increased Liver Enzymes. v. 2014, 2014.
- TATONE, C. et al. Sirtuins in gamete biology and reproductive physiology: Emerging roles and therapeutic potential in female and male infertility. **Human Reproduction Update**, v. 24, n. 3, p. 267–289, 2018.

- VAKHRUSHEVA, O. et al. Sirt7 Increases Stress Resistance of Cardiomyocytes and Prevents Apoptosis and Inflammatory Cardiomyopathy in Mice. p. 703–710, 2008.
- VALENTI, D. et al. Impairment of F1F0-ATPase, adenine nucleotide translocator and adenylate kinase causes mitochondrial energy deficit in human skin fibroblasts with chromosome 21 trisomy. **The Biochemical journal**, v. 431, n. 2, p. 299–310, 2010.
- VALENTI, D. et al. Deficit of complex I activity in human skin fibroblasts with chromosome 21 trisomy and overproduction of reactive oxygen species by mitochondria: involvement of the cAMP/PKA signalling pathway. **Biochemical Journal**, v. 435, n. 3, p. 679–688, 2011.
- VALENTI, D. et al. Mitochondrial dysfunction as a central actor in intellectual disability-related diseases: An overview of Down syndrome, autism, Fragile X and Rett syndrome. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 46, n. P2, p. 202–217, 2014.
- VAN DER LINDE, D. et al. Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: A systematic review and meta-analysis. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 58, n. 21, p. 2241–2247, 2011.
- VERDIN, E. et al. Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signaling. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 35, n. 12, p. 669–675, dez. 2010.
- VERHEUGT, C. L. et al. Mortality in adult congenital heart disease. **European Heart Journal**, v. 31, n. 10, p. 1220–1229, 2010.
- VERSACCI, P. et al. Cardiovascular disease in Down syndrome. v. 30, n. 5, p. 616–622, 2018.
- WANG, F. et al. A SIRT1 agonist reduces cognitive decline in type 2 diabetic rats through antioxidative and anti-inflammatory mechanisms. **Molecular Medicine Reports**, p. 1040–1048, 2018.
- WANG, M. et al. Endothelial NO Synthase Gene Polymorphisms and Risk of Ischemic Stroke in Asian Population: A Meta-Analysis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.
- WANG, X. X. et al. SIRT6 protects cardiomyocytes against ischemia/reperfusion injury by augmenting FoxO3 α -dependent antioxidant defense mechanisms. **Basic Research in Cardiology**, v. 111, n. 2, p. 1–19, 2016.
- WANG, Y. et al. Regulation of G 6PD acetylation by SIRT2 and KAT9 modulates NADPH homeostasis and cell survival during oxidative stress #. v. 33, n. 12, 2014.
- WANG, Y. et al. An overview of Sirtuins as potential therapeutic target: Structure, function and modulators. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 161, p. 48–77, 2019.

- WARE, A. L. et al. Prevalence of Coronary Artery Disease Risk Factors and Metabolic Syndrome in Children with Heart Disease. **Pediatric Cardiology**, v. 39, n. 2, p. 261–267, 2018.
- WATANABE, H. et al. Sirt2 facilitates hepatic glucose uptake by deacetylating glucokinase regulatory protein. **Nature Communications**, p. 1–14, 2018.
- WHO. World Health Organization - Global action plan for the prevention and control of NCDs 2013-2020, 2013. Disponível em <<https://www.who.int/nmh/publications/ncd-action-plan/en/>> Acesso em: Janeiro, 2019.
- WHO. World Health Organization - Congenital anomalies, 2016. Disponível em <https://www.who.int/topics/congenital_anomalies/en/> Acesso em: Janeiro, 2019.
- WHO. World Health Organization - Cardiovascular disease, 2017. Disponível em <https://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/> Acesso em: Janeiro, 2019.
- WINNIK, S. et al. Deletion of Sirt3 does not affect atherosclerosis but accelerates weight gain and impairs rapid metabolic adaptation in LDL receptor knockout mice : implications for cardiovascular risk factor development. 2014.
- WU, Y. T.; WU, S. B.; WEI, Y. H. Roles of sirtuins in the regulation of antioxidant defense and bioenergetic function of mitochondria under oxidative stress. **Free Radical Research**, v. 48, n. 9, p. 1070–1084, 2014.
- XIE, L. et al. SIRT3 Mediates the Antioxidant Effect of Hydrogen Sulfide in Endothelial Cells. v. 24, n. 6, p. 329–343, 2016.
- XU, S.; BAI, P.; JIN, Z. G. Sirtuins in Cardiovascular Health and Diseases. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 27, n. 10, p. 677–678, 2016.
- XUE, P. et al. Adipose deficiency of Nrf2 in ob/ob mice results in severe metabolic syndrome. **Diabetes**, v. 62, n. 3, p. 845–854, 2013.
- YANG, L. et al. SIRT3 Deficiency Induces Endothelial Insulin Resistance and Blunts Endothelial-Dependent Vasorelaxation in Mice and Human with Obesity. **Nature Publishing Group**, n. December 2015, p. 1–12, 2016.
- YANG, X. et al. Sirtuin 2 regulates cellular iron homeostasis via deacetylation of transcription factor NRF2. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 4, p. 1505–1516, 2017.
- ZAMPONI, E. et al. Nrf2 stabilization prevents critical oxidative damage in Down syndrome cells **Aging Cell**, 2018.

ZAQOUT, M. et al. Body mass index in adults with congenital heart disease. **Congenital Heart Disease**, n. January, p. 1–8, 25 jan. 2019.

ZENG, H. et al. High-fat diet induces cardiac remodelling and dysfunction : assessment of the role played by SIRT3 loss. v. 19, n. 8, p. 1847–1856, 2015.

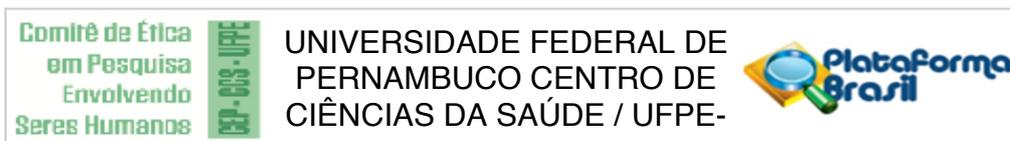
ZHANG, B. C.; MA, Y. F.; XIANG, C. H. SIRT2 decreases atherosclerotic plaque formation in low-density lipoprotein receptor-deficient mice by modulating macrophage polarization. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 97, n. September 2017, p. 1238–1242, 2018.

ZHANG, Z. et al. The role of the Nrf2/Keap1 pathway in obesity and metabolic syndrome. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 16, n. 1, p. 35–45, 2015.

ZHOU, K. et al. Genetic variants of the endothelial NO synthase gene (eNOS) may confer increased risk of sporadic congenital heart disease. **Genetics and Molecular Research**, 2014.

ZORDOKY, B. N. M.; ROBERTSON, I. M.; DYCK, J. R. B. Preclinical and clinical evidence for the role of resveratrol in the treatment of cardiovascular diseases. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1852, n. 6, p. 1155–1177, 2014.

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Em busca da origem das cardiopatias congênitas em portadores de síndrome de Down.

Pesquisador: Sandra da Silva Mattos

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 47407615.4.0000.5208

Instituição Proponente: CIRCULO DO CORACAO DE PERNAMBUCO

Patrocinador Principal: CIRCULO DO CORACAO DE PERNAMBUCO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.172.909

Data da Relatoria: 05/08/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa com desenho de caso-controle envolvendo 200 indivíduos com Síndrome de Down para avaliar a associação entre alterações gênicas e cardiopatias.

Objetivo da Pesquisa:

Verificar a associação entre alterações na expressão gênica e presença de polimorfismos na origem das cardiopatias congênitas em portadores de síndrome de Down.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos de uma coleta sanguínea. Benefícios: Os pacientes e seus responsáveis terão maiores informações sobre a genética que levou ao defeito cardíaco, fato este que pode até ser usado como fator prognóstico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de pesquisa envolvendo 200 portadores de S. de Down divididos em 2 grupos, com e sem anormalidades cardíacas detectadas por ecocardiograma. Não consta a proporção de indivíduos em cada grupo. Serão submetidos a coleta de 20ml de sangue para análise genética que está detalhada no protocolo. Não está descrito onde os pacientes serão recrutados.

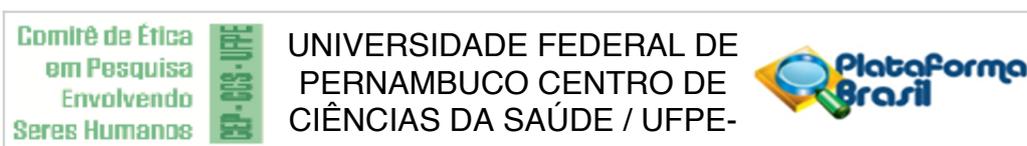
Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600

UF: PE **Município:** RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.172.909

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Constam: Termo de assentimento (TALE), TCLE para maiores de 18 anos, TCLE para analfabetos e TCLE para pais ou responsáveis, o projeto e suas informações básicas, Folha de rosto, termo de confidencialidade, autorização de uso de dados, carta de anuência (2).

Recomendações:

Adequar a linguagem dos TALE e TCLEs ao nível de compreensão dos participantes, especialmente no 1º parágrafo de informações sobre a pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Adequar a linguagem do TALE e TCLEs ao nível de compreensão dos participantes, especialmente no 1º parágrafo de informações sobre a pesquisa. Por exemplo, em vez de "Descrição da pesquisa: o objetivo desta pesquisa é analisar a expressão gênica e pesquisar polimorfismos e padrão de metilação em genes localizados na região entre Tiam e Kcnj6 e correlaciona-los com a presença de cardiopatia congênita em portadores de síndrome de Down. Para tal, será obtida uma amostra sanguínea dos participantes para análise, assim como pesquisa do seu histórico médico." Sugiro : O objetivo desta pesquisa é avaliar se alterações ou diferenças em alguns genes estão associados a doenças congênitas (de nascença) do coração em pessoas com Síndrome de Down.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

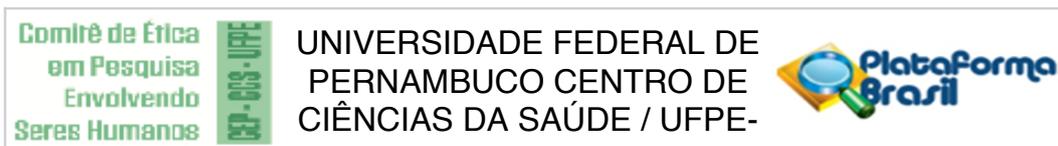
Considerações Finais a critério do CEP:

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.172.909

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

RECIFE, 06 de Agosto de 2015

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
 (Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br