

Evaluación de marcadores de estrés oxidativo en pacientes con Síndrome Down en edad pediátrica.

Evaluation of oxidative stress biomarkers in paediatric Down Syndrome patients.

Aracelis Martínez Rubio,^I Gretel Riverón Forment,^{II} Judith Pupo Balboa,^{III} Araceli Lantigua Cruz,^{IV} Olivia Martínez Bonne.^V

Resumen

El Síndrome Down constituye la cromosomopatía más frecuente y la primera causa de retraso mental de causa genética a nivel mundial y en Cuba. Aún se desconoce cómo la presencia del cromosoma 21 extra da lugar al fenotipo característico de este síndrome. En este sentido la participación de las especies reactivas del oxígeno ha sido propuesta como uno de los mecanismos que intervienen en la patogénesis del mismo. Dicho mecanismo se fundamenta en la sobreexpresión de al menos 10 genes en el cromosoma 21 relacionados con el estrés oxidativo. Uno de estos genes es el gen *SOD1* que codifica una importante enzima del sistema antioxidante celular. Se evaluó un grupo de marcadores de estrés oxidativo en pacientes con Síndrome Down en edad pediátrica. La muestra estuvo conformada por 36 niños (0-5 años), de ellos 12 con Síndrome Down y 24 niños como controles, residentes en Ciudad de La Habana. Los padres emitieron su consentimiento para que su hijo fuera incluido en el estudio. Se determinaron los niveles plasmáticos de malondialdehído, productos avanzados de oxidación a proteínas y grupos tioles libres. Además se determinaron las actividades de las enzimas Cu/Zn superóxido dismutasa, catalasa y glutatión reductasa intraeritrocitarias mediante métodos espectrofotométricos. En los pacientes con Síndrome Down se observó un incremento significativo en las actividades de la Cu/Zn superóxido dismutasa y de la catalasa, así como de los niveles de grupos tioles libres, respecto al grupo control. El comportamiento del resto de los marcadores evaluados no difirió entre los grupos.

Palabras claves: Síndrome Down, trisomía 21, estrés oxidativo, especies reactivas del oxígeno, daño oxidativo, marcadores de estrés oxidativo.

Abstract

Down Syndrome is the most common chromosomopathy and the leading cause of mental retardation of genetic cause in worldwide and in Cuba. The mechanisms by which trisomy 21 leads to its characteristic phenotype are unclear. In this regard, the involvement of reactive oxygen species has been proposed as one of the mechanisms involved in pathogenesis. It has been reported that overexpression of at least 10 genes on chromosome 21 are associated with oxidative stress. One of these genes is the *SOD1* gene that encodes an important enzyme in the cellular antioxidant system. The aim of this study was to evaluate some oxidative stress biomarkers in Down syndrome patients. The universe of study included 36 children (0-5 years), 12 SD patients and 24 control subjects, from Havana City. Informed consent was obtained from all parents of children who participated in this study. It were determined plasmatic levels of Malondialdehyde, Advanced Oxidation Protein Products, Total Thiols and intraerythrocytic enzymatic activities of Cu/Zn Superoxide Dismutase, Catalase and Glutathione Reductase by spectrophotometric methods. It was found statistically increases in Cu/Zn Superoxide Dismutase and Catalase activities and high plasmatic levels of total thiols in Down syndrome group. The activity of the others enzymes tested, the ratio of Cu/Zn Superoxide Dismutase to Catalase and oxidative damage markers in the Down syndrome patients were not different from the control group. It was obtained an increase in Cu/Zn Superoxide Dismutase activity in paediatric Down syndrome's patients, could be related with presence of extra copy of chromosome 21.

Keywords: Trisomy 21, Down syndrome, reactive oxygen species, oxidative damage, oxidative stress biomarkers.ç

^I Doctora en Medicina. Especialista de Primer Grado en Genética Clínica. Profesora Asistente. Centro Provincial de Genética Médica de Guantánamo. Cuba.

^{II} Máster en Bioquímica. Licenciada en Bioquímica. Investigador Agregado, Profesor Instructor. Laboratorio de Estrés Oxidativo. Centro Nacional de Genética Médica. Cuba.

^{III} Doctora en Ciencias. Especialista de Primer Grado en Bioquímica. Investigador Agregado. Laboratorio de Estrés Oxidativo. Centro Nacional de Genética Médica. Cuba

^{IV} Doctora en Ciencias. Especialista de Segundo Grado en Genética Clínica. Profesora e Investigadora Titular. Centro Nacional de Genética Médica. Cuba

^V Técnico del Laboratorio de Estrés Oxidativo. Centro Nacional de Genética. Cuba

Introducción

El Síndrome Down (SD; OMIM 190685) es una de las enfermedades genéticas más frecuentes que se manifiesta con retraso mental, y está asociado a la trisomía completa o parcial del brazo largo del cromosoma 21 humano (HSA21).^{1,2} La trisomía 21 es la alteración cromosómica más común, diagnosticada al nacimiento, en la que los individuos sobreviven la edad pediátrica.³ Su incidencia varía con la edad materna y difiere en las poblaciones en un rango entre 1/319 nacidos vivos y 1/1000 nacidos vivos.⁴

En el 95% de los casos el síndrome se debe a la trisomía completa, mientras que un pequeño número de individuos presenta trisomía parcial, microtrisomía o duplicación de genes simples.^{5,6} Igualmente, es menos frecuente que la trisomía se presente en mosaico o que involucre una translocación Robertsoniana.^{7,8}

Desde su descubrimiento en 1959 por Jerome Lejeune, uno de los mayores retos ha sido la identificación de los genes del HSA21 u otros elementos genómicos funcionales que contribuyen a los aspectos específicos del fenotipo. Sin embargo, los mecanismos moleculares que dan lugar al síndrome con un complejo espectro clínico de rasgos variables que afecta la mayoría de los sistemas de órganos aún se desconocen.^{9,10} Está caracterizado por más de 80 rasgos clínicos que incluyen deterioro cognitivo, hipotonía muscular, baja estatura, dismorfias características, retraso del desarrollo, defectos metabólicos, enfermedad congénita del corazón, estenosis o atresia duodenal, ano imperforado, enfermedad de Hirschprung, deficiencias del sistema inmune, riesgo incrementado de leucemia, comienzo temprano de enfermedad de Alzheimer, envejecimiento prematuro, entre otros. Además, existe un riesgo disminuido de presentar tumores sólidos y ateroesclerosis.^{7,9-11}

Existe una gran variabilidad fenotípica con marcadas diferencias en la penetrancia y expresividad de la mayoría de los rasgos entre los individuos con SD, que no solo se explica a partir de la hipótesis de la dosis en triple copia de los genes del cromosoma 21.^{2,11-13} Algunos de los genes del HAS21 que han mostrado sobreexpresión en triple copia están relacionados con el estrés oxidativo.^{1,3,4,7,9} De hecho, al menos 10 genes en este cromosoma se vinculan con las especies reactivas del oxígeno.¹

En el SD se ha sugerido que el estrés oxidativo interviene en la patogénesis del daño cognitivo, el envejecimiento temprano, el desarrollo prematuro de la enfermedad de Alzheimer, una mayor susceptibilidad a las infecciones, la presencia de mutagenicidad celular relacionada con un mayor riesgo de desarrollar leucemia, entre otros.¹⁴

Múltiples son las evidencias que indican que el es-

trés oxidativo ocurre en el SD desde etapas muy tempranas del desarrollo del individuo.¹⁵⁻¹⁸ A niveles fisiológicos, las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, participan como mensajeros intracelulares en cascadas de señalización. Sin embargo, los niveles incrementados de estas especies pueden conducir a la alteración del estado redox celular y producir modificaciones oxidativas a los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos, así como afectar la expresión génica y la transducción de señales.^{3,19}

Uno de los genes presentes en el cromosoma 21 relacionados con el estrés oxidativo y que se sobreexpresa en triple copia es el gen *SOD1*, que se localiza en 21q22.2–22.3.^{9,15} Este gen codifica la enzima Cu-Zn Superóxido Dismutasa (SOD1), que interviene en la eliminación del anión superóxido como parte de los mecanismos de defensa antioxidante celular.²⁰ Sin embargo, los niveles elevados de expresión de esta enzima y de su actividad se han relacionado con el estrés oxidativo en el SD.^{15,16}

Teniendo en cuenta lo anterior, en este trabajo evaluamos un grupo de marcadores de estrés oxidativo en un conjunto de niños con SD en edades pediátricas. De acuerdo con las teorías actuales, los resultados derivados de este estudio podrán ser analizados en el empeño de contribuir a una mayor comprensión sobre la participación del estrés oxidativo en el complejo espectro de rasgos clínicos del síndrome, sumado al hecho de que hasta el momento no ha sido descrito el comportamiento de estos marcadores en niños cubanos con SD menores de 5 años.

Métodos

Se realizó un estudio observacional analítico de casos y controles, en pacientes con Síndrome Down, atendidos en la consulta de Genética Clínica del Hospital Juan Manuel Márquez, en el período comprendido entre noviembre del 2007 y marzo del 2008. La muestra estuvo conformada por 12 pacientes con diagnóstico clínico y cromosómico de SD, menores de 5 años de edad y de ambos sexos. El grupo control estuvo integrado por 24 niños, aparentemente sanos, menores de 5 años y de ambos sexos. Todos los individuos procedieron de los municipios Playa, Marianao y La Lisa.

A los niños que participaron en el estudio se les realizó un examen físico y estudios de laboratorio clínico para descartar la presencia de otras enfermedades que pudieran relacionarse con el estrés oxidativo. Además, se constató la no utilización de suplementos antioxidantes en el momento de la realización de la investigación. Los padres de los niños con SD y controles decidieron voluntariamente la inclusión de su hijo en el estudio, luego de emitir su consentimiento,

siguiendo los principios éticos de la Declaración de Helsinki de 1975, modificada en el 2008. El protocolo de investigación fue revisado por el Comité de Ética del Centro Nacional de Genética Médica.

En este estudio se utilizó como muestra biológica sangre venosa periférica. La extracción se realizó en ayunas, mediante punción venosa en el laboratorio clínico del Hospital Juan Manuel Márquez.

Para las determinaciones de Estrés Oxidativo se trajeron 4 ml de sangre en un tubo con EDTA. El plasma se separó por centrifugación (250 G durante 5 minutos a 4°C) y se lavaron los eritrocitos 3 veces con solución de NaCl 0,9% fría. Posteriormente se procedió a la lisis de un volumen conocido de eritrocitos con agua destilada fría (1:4) y se colocaron en hielo durante 10 min. Una vez obtenido el lisado de eritrocitos se determinó la concentración de hemoglobina y todas las muestras se almacenaron a -20°C hasta la determinación de los marcadores que no superó los 10 días.

Marcadores de daño oxidativo

1. Determinación de la concentración de Malonildialdehído.

La concentración plasmática de Malonildialdehído (MDA) se determinó a partir del método descrito en el estuche reactivo BIOXYTECH® LPO-586™ (OXIS Research, Portland, USA). Este método se basa en la reacción del reactivo cromógeno N-metil-2-fenilindol con el MDA a 45°C en medio ácido. Como producto de la reacción se obtuvo un cromóforo que absorbe a 586 nm. La densidad óptica se midió en un espectrofotómetro SUMA VS-850 (TECNOSUMA, Cuba). La concentración se determinó a partir de la curva de calibración, la cual se construyó utilizando como patrón tetrametoxipropano (TMOP) a diferentes concentraciones (0–5 µM). Las unidades de concentración se expresaron en µmol/L.

2. Determinación de la concentración de los productos avanzados de la oxidación de proteínas.

La determinación en plasma de los productos avanzados de la oxidación de proteínas (PAOP) se realizó mediante la técnica espectrofotométrica descrita por Witko Sarsat.²⁰ Este método se basa en el hecho de que los PAOP reaccionan de la misma manera que la cloramina T (patrón) con el yoduro de potasio en medio ácido. Esta reacción produce un compuesto coloreado que se detecta a 340 nm. La lectura de la absorbancia se realizó en un espectrofotómetro UV-VIS Genesys 8 (SPECTRONIC UNICAM, UK). La concentración se calculó mediante la ecuación obtenida de una curva de calibración, la cual se construyó utilizando distintas concentraciones de cloramina T (0–100 µM). Los resultados fueron expresados como

equivalentes del patrón (µmol/L de cloramina T).

Niveles de defensa antioxidante

1. Actividad de la enzima Cu-Zn Superóxido Dismutasa intraeritrocitaria.

La actividad intraeritrocitaria de la enzima Cu-Zn Superóxido Dismutasa (SOD1) se determinó mediante la técnica espectrofotométrica descrita por Marklund S y Marklund G.²¹ Este es un método cinético indirecto, que se basa en la capacidad de esta enzima para inhibir la reacción de autoxidación del pirogalol. En dicha reacción se forma la purpurogalina, compuesto amarillo marrón, por el cual se estima la magnitud de la reacción a 420 nm. Para el cálculo de la actividad se tiene en cuenta que 1 unidad de actividad enzimática (UAE) es capaz de inhibir el 50% de la autoxidación del pirogalol. La medición de la variación de la absorbancia se llevó a cabo durante 1 minuto en un espectrofotómetro SUMA VS-850 (TECNOSUMA, Cuba). Las unidades de actividad enzimática se expresaron en U/ml.

2. Actividad de la enzima Catalasa.

La determinación de la actividad enzimática de la Catalasa intraeritrocitaria (CAT) se realizó mediante la técnica referida por Aebi H.²² Este ensayo cinético directo se basa en la medición de la variación de la densidad óptica que tiene lugar como resultado de la descomposición del sustrato (H_2O_2) por la enzima presente en la muestra biológica. La reacción enzimática transcurre en las condiciones óptimas de pH y temperatura. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro UV-VIS Genesys 8 (SPECTRONIC UNICAM, UK). Las unidades de actividad enzimática se expresaron en U/ml.

3. Actividad enzimática de Glutatión Reductasa.

La determinación de la actividad enzimática intraeritrocitaria de la Glutatión Reductasa se realizó mediante la técnica referida por Carlberg I y Mannervik B.²³ Este ensayo se basó en la oxidación de NADPH a NADP⁺ catalizada por la enzima presente en la muestra. Definiéndose como 1 UAE la cantidad de enzima que es capaz de catalizar la reducción de un µmol de GSSG por minuto a pH 7,2 y 25°C, teniendo en cuenta la disminución de la densidad óptica a 340 nm en función del tiempo del NADPH. La lectura se realizó durante 3 minutos en un espectrofotómetro UV-VIS Genesys 8 (SPECTRONIC UNICAM, UK). Las unidades de actividad enzimática específica se expresaron en µU/g de Hb.

4. Determinación de la concentración de tioles libres (GSH).

La determinación de las concentraciones plasmáticas de tioles proteicos referidos como Glutatión Reducido (GSH) se realizó mediante la técnica referida

por Sedlak J y Lidsay RH.²⁴ El GSH presente en la muestra desproteinizada reacciona con el reactivo de Ellman para rendir un compuesto coloreado que absorbe la luz a 412 nm. La lectura se realizó en un espectrofotómetro UV-VIS Genesys 8 (SPECTRONIC UNICAM, UK). La concentración de GSH se cuantificó utilizando una curva patrón de GSH (0-400 µmol/L). Las unidades de concentración se expresaron en µmol/L.

Análisis estadístico.

En este estudio se determinaron los estadísticos descriptivos de tendencia central para todas las variables en los grupos de pacientes y controles. Se compararon las medias aritméticas, de cada una de las variables de respuesta para ambos grupos, mediante la prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes. Como criterio de significación estadística se tomó $p < 0,05$. Para el análisis estadístico se utilizó el programa STATISTICA versión 6.1 para Windows.

Resultados

La edad promedio de los niños incluidos en el estudio fue de 3 años. El grupo de niños con SD estuvo conformado por 10 varones y 2 hembras, de manera similar para el caso de los controles con 18 varones y 6 hembras.

Diez de los 12 niños con SD, tuvieron cariotipo de trisomía 21 por aneuploidía precigótica y los dos restantes presentaron cariotipo: 46, XY, i(21q) y mosaicismo 47XY +21(18)/ 46XY(12), respectivamente. El análisis cualitativo de los marcadores estudiados, mostró que no existían diferencias entre los pacientes con SD, atendiendo al cariotipo presente.

Los resultados obtenidos para cada una de las variables de respuesta antioxidant se muestran en la Tabla 1. No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de los marcadores de daño oxidativo a los lípidos y proteínas, MDA ($0,62 \pm 0,33$ vs $0,51 \pm 0,23$) y PAOP ($26,1 \pm 23,8$ vs $18,5 \pm 12,9$) entre los niños con Síndrome Down y los controles, sin embargo

Tabla 1. Marcadores de estrés oxidativo en pacientes con Síndrome Down y controles.

Marcadores	Pacientes n=12	Controles n=24	p
MDA (µmol/l)	$0,62 \pm 0,33$	$0,51 \pm 0,23$	0,22
PAOP (µmol/l)	$26,1 \pm 23,8$	$18,5 \pm 12,9$	0,52
SOD1 (U/ml)	$184,3 \pm 7,15$	$174,6 \pm 13,8$	0,024
CAT (U/ml)	$93,5 \pm 22,4$	$82,1 \pm 11,5$	0,026
SOD1/CAT	$2,2 \pm 0,4$	$2,1 \pm 0,7$	0,27
GR (U/g Hb)	$92,6 \pm 52,3$	$86,1 \pm 58,2$	0,63
GSH (µmol/l)	$59,5 \pm 31,6$	$27,9 \pm 22,0$	0,005

go, observamos una tendencia al incremento de ambos indicadores en el grupo de niños con SD.

Las actividades intraeritrocitarias de las enzimas antioxidantes SOD1 y CAT mostraron un incremento significativo en el grupo con SD en comparación con los controles. El aumento en las actividades catalíticas fue de 5 % en la SOD1 y de 13 % en el caso de la CAT. No se encontraron diferencias en la relación que se establece entre estas enzimas (SOD1/CAT) ($2,2 \pm 0,4$ vs. $2,1 \pm 0,7$) así como en la actividad intraeritrocitaria de la Glutatión Reductasa ($92,6 \pm 52,26$ vs. $86,5 \pm 58,2$ U/g Hb) en los grupos estudiados.

Por otra parte, se observaron marcadas diferencias en las concentraciones plasmáticas de los grupos tioles, referidos como Glutatión Reducido, entre los grupos ($59,5 \pm 31,6$ vs $27,8 \pm 22,0$ µmol/L).

Discusión

Varios autores han sugerido que la presencia en triple

copia del gen SOD1, contribuye a varias de las manifestaciones fenotípicas reportadas para el SD, y de manera particular, a las alteraciones neurodegenerativas: el retraso mental, el envejecimiento temprano y el desarrollo prematuro de la enfermedad de Alzheimer.^{7,9-11,14,25}

Los resultados muestran que la actividad enzimática de la SOD1 eritrocitaria, está incrementada en los pacientes, lo que pudiera ser explicado por dos hechos fundamentalmente; el primero, debido a una elevada generación de especies reactivas del oxígeno y el segundo, a un incremento en la expresión de dicha enzima debido a la copia extra de este gen. De acuerdo al comportamiento de los marcadores que reflejan el daño oxidativo, sugerimos que el aumento de la actividad pudiera responder esencialmente a un incremento en la expresión de esta enzima. En concordancia con estos hallazgos, varios autores reportan la sobreexpresión de esta enzima e incrementos sig-

nificativos en su actividad en fibroblastos y en sangre periférica de pacientes con SD así como, en el líquido amniótico de mujeres portadoras de fetos afectados con la trisomía 21.^{14, 25}

Los resultados muestran un aumento concomitante en la actividad de la Catalasa en el grupo en estudio, lo que podría constituir una respuesta adaptativa ante la generación de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno mediado por la acción de la SOD1. Resultados similares fueron obtenidos por Pastor y cols, los que reportaron incrementos de la CAT en pacientes con SD.¹⁴

Adicionalmente, la ausencia de diferencias en la relación SOD1/CAT entre pacientes y controles podría ser indicativo de que el aumento en la actividad de la SOD1 provoca la subsiguiente elevación en la actividad de la CAT, como un mecanismo compensatorio, con el objetivo de mantener un equilibrio adecuado de estos sistemas enzimáticos a nivel del eritrocito.

Por otra parte, en la actividad de la Glutatión Reductasa (GR) no se observaron cambios significativos entre los grupos. Otros autores si han encontrado diferencias en este indicador entre los pacientes con SD y los individuos sanos, planteando una relación entre las bajas concentraciones de Glutatión reducido (GSH) halladas y el incremento de la actividad de esta enzima.¹⁴

Los grupos tioles desempeñan funciones esenciales en el mantenimiento de diversas funciones celulares.²⁶ En los niños con SD se detectó un marcado incremento a nivel plasmático en la concentración de estos compuestos. En tal sentido se ha descrito que en condiciones oxidativas moderadas o leves, las concentraciones en sangre de los compuestos con grupos tioles, tales como el Glutatión reducido y las cisteínas, se encuentran incrementadas. Esto tiene lugar porque se

produce la activación de enzimas que participan en la síntesis del Glutatión (γ -Glutamilcisteína sintasa y la Cistationina- β -sintasa), lo que provoca un aumento en su concentración así como su transporte hacia la sangre. Además se sugiere que las concentraciones sanguíneas de estos compuestos no necesariamente reflejan el contenido intracelular de estos metabolitos.²⁷ Es importante señalar que los niños con SD incluidos en el estudio no presentaban las complicaciones más comunes asociadas a la trisomía 21, tales como las cardiopatías o alteraciones digestivas, aspectos que pudieran modificar el estado redox celular.

Finalmente concluimos que en los pacientes con Síndrome Down estudiados, la actividad enzimática de la SOD1 se encuentra elevada, lo que pudiera ser el resultado de la presencia en triple copia del gen que codifica esta enzima. Además existen alteraciones en la actividad de la CAT, lo que probablemente constituya un mecanismo compensatorio que incremente la eficiencia de la barrera antioxidante a nivel intraeritrocitario. Por otra parte, el incremento de las concentraciones de los grupos tioles y los bajos niveles de productos oxidados encontrados, nos sugieren la existencia de condiciones oxidativas leves en los niños con SD, sin otras patologías asociadas.

Consideramos que serán necesarios otros estudios donde se evalúe el nivel de expresión de la proteína SOD1, marcadores de daño oxidativo al ADN y de defensa antioxidante, en un mayor número de pacientes, relacionándolos con los hallazgos del cariotipo. Esto permitirá aumentar la comprensión de los mecanismos involucrados en la patogénesis de este síndrome, así como la aplicación en un futuro de terapéuticas basadas en antioxidantes, en estos pacientes, de manera que se pueda incidir en una posible mejoría en la calidad de vida de los mismos.

Referencias Bibliográficas

1. Gardiner KJ. Molecular basis of pharmacotherapies for cognition in Down syndrome. Trends Pharmacol Sci. 2010 Feb;31(2):66-73.
2. Tianoa L, Padellab L, Carnevalib P, Gabriellib O, Bruega F, Principia F, Littarrua GP. Coenzyme Q10 and oxidative imbalance in Down syndrome: Biochemical and clinical aspects. BioFactors. 2008;32(1-4):161-7.
3. Slonima DK, Koidec K, Johnson KL, Tantravahid U, Cowanc JM, Jarrahc Z and Bianchic DW. Functional genomic analysis of amniotic fluid cell-free mRNA suggests that oxidative stress is significant in Down syndrome fetuses. Proc. Natl Acad Sci USA. 2009;June 9;106(23):9425-9.
4. Wiseman FK, Alford KA, Tybulewicz VL and M.C. Fisher E. Down syndrome—recent progress and future prospects. Hum Mol Genet. 2009;18(R1):R75–R83.
5. Antonarakis SE, Lyle R, Dermitzakis ET. Chromosome 21 and Down syndrome: from genomics to pathophysiology. Nat Rev Genet. 2004;5:725-38.
6. Dierssen M, Herault Y, Estivill X. Aneuploidy: From a Physiological Mechanism of Variance to Down syndrome. Physiol Rev. 2009;89:887-920.
7. Patterson D. Molecular genetic analysis of Down syndrome. Hum Genet. 2009; 126:195–214.

8. Moncaster JA, Pineda R, Moir RD. Alzheimer's Disease Amyloid- β Links Lens and Brain Pathology in Down Syndrome. *PLoS One*. 2010;5(5):1-13.
9. Aït Yahia-Graison E, Aubert J, Dauphinot L, Rivals I , Prieur M , Golfier G, Rossier J, Personnaz L. Classification of Human Chromosome 21 Gene-Expression Variations in Down syndrome: Impact on Disease Phenotypes. *Am J Hum Genet*. 2007;81(3):475-91.
10. Lyle R, Béna F, Gagó S, Gehrig C, Lopez G, Schinzel A, et al. Genotype–phenotype correlations in Down syndrome identified by array CGH in 30 cases of partial trisomy and partial monosomy chromosome 21. *Eur J Hum Genet*. 2009;17:454–66.
11. Lopes Pereira P, Magnol L, Sahún I. A new mouse model for the trisomy of the Abcg1–U2af1 region reveals the complexity of the combinatorial genetic code of Down syndrome. *Hum Mol Genet*. 2009;18(24):4756–69.
12. Korenberg JR, Chen X, Schipper N, Sun R, Gonsky ZR. Down syndrome phenotypes: The consequences of chromosomal imbalance. *Proc Nat Acad Sci*. 1994;91:4997-5001.
13. Roper RJ, Reeves RH. Understanding the Basis for Down syndrome Phenotypes. *PLoS Genetics*. 2006;2(3):0231-6.
14. Pastor MC, Sierra C, Dolade M, Navarro E, Brandi N, Cabré' E, Mira A, Sere's A. Antioxidant enzymes and fatty acid status in erythrocytes of Down syndrome patients. *Clin Chem*. 1998;44(5):924–9.
15. Perrone S, Longini M, Bellieni CV, Centini G, Kenanidis A, De Marco L, Petraglia F, Buonocore G. Early oxidative stress in amniotic fluid of pregnancies with Down syndrome. *Clin Biochem*. 2007;40:177–80.
16. Strydom A, Dickinson MJ, Shende S, Pratico D, Walker Z. Oxidative stress and cognitive ability in adults with Down syndrome. *Prog Neu-Psychopharmac Biolog Psychiatr*. 2009;33(1):76–80.
17. Rozovski U, Jonish-Grossman A, Bar-Shira A, Ochshorn Y, Goldstein M, Yaron Y. Genome-wide expression analysis of cultured trophoblast with trisomy 21 karyotype. *Hum Reprod*. 2007 Sep;22(9):2538-45.
18. Rong Mao, Xiaowen Wang, Edward L Spitznagel Jr, Laurence P Frelin, Jason C Ting, Huashi Ding et al. Primary and secondary transcriptional effects in the developing human Down syndrome brain and heart. *Genome Biol*. 2005;6(13):R107.
19. Gerich FJ, Funke F, Hildebrandt B, Faßhauer M, Müller M. H₂O₂-mediated modulation of cytosolic signaling and organelle function in rat hippocampus. *Eur J Physiol*. 2009 Sep;458(5):937-52.
20. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen KT, Capeille`re-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocytes activation in chronic renal failure. *J Immunol*. 1998 Sep 1;161(5):2524-32.
21. Marklund S, Marklund G. Involvement of superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*. 1974;47:469-74.
22. Aebi H. Catalase in vitro. *Meth Enzymol*. 1984;105:121-6.
23. Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Meth Enzymol*. 1985;113:484-90.
24. Sedlak J, Lidsay RH. Estimation of total protein bound and non-protein sulphhydryl group in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*. 1968;25:192-205.
25. Hirano M, Hung WY, Cole N, Azim AC, Deng HX and Siddique T. Multiple Transcripts of the Human Cu,Zn Superoxide Dismutase Gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Sep 16;276(1):52-6.
26. Netto CB, Siqueira IR, Fochesatto C, Portela LV, Purificação MT, Souza DO, Giugliani R, Gonçalves CA. S100B content and SOD activity in amniotic fluid of pregnancies with Down syndrome. *Clin Biochem*. 2004 Feb;37(2):134-7.
27. Haugaard N. Reflections on the Role of the Thiol Group in Biology. *Ann New York Academy of Sciences*. 2000;899:148-58.
28. Reed MC, Thomas RL, Pavicic J, James SJ, Ulrich CM, Nijhout HF. A mathematical model of glutathione metabolism. *Theor Biol Med Model*. 2008 Apr;28(5):8.