



MARCIA HIROMI TANAKA

ANÁLISE DOS PARÂMETROS CLÍNICOS  
PERIODONTIAS E EXPRESSÃO  
GENÉTICA DE INTERFERONS ALFA,  
GAMA E GENES RELACIONADOS EM  
INDIVÍDUOS PORTADORES DE  
SÍNDROME DE DOWN COM DOENÇA  
PERIODONTAL

Orientadora:  
Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

Araraquara  
2010

SEJA DIFERENTE  
E NORMAL

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

*MARCIA HIROMI TANAKA*

ANÁLISE DOS PARÂMETROS CLÍNICOS  
PERIODONTAIS E EXPRESSÃO  
GENÉTICA DE INTERFERONS ALFA,  
GAMA E GENES RELACIONADOS EM  
INDIVÍDUOS PORTADORES DE  
SÍNDROME DE DOWN COM DOENÇA  
PERIODONTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas - Área de Odontopediatria, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista o título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Orientadora:  
Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

Araraquara

2010

*MARCIA HIROMI TANAKA*

ANÁLISE DOS PARÂMETROS CLÍNICOS PERIODONTIAS E  
EXPRESSÃO GENÉTICA DE INTERFERONS ALFA, GAMA E GENES  
RELACIONADOS EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE SÍNDROME DE  
DOWN COM DOENÇA PERIODONTAL

*COMISSÃO JULGADORA*

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

2º Examinador: Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro

3º Examinador: Profa. Dra. Paula Cristina Trevilatto

Araraquara, 12 de março de 2010.

## *DADOS CURRICULARES*

### **Marcia Hiromi Tanaka**

NASCIMENTO	09 de julho de 1978 – Mogi das Cruzes/SP
FILIAÇÃO	Yukiu Tanaka Alice Yoshiko Tanaka
1999-2002	Curso de graduação em Odontologia na Faculdade de Odontologia de Araraquara - Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP
2003-2004	Estágio de Atualização na disciplina de Odontopediatria Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2005-2005	Curso de Residência na Associação de Assistência à Criança Deficiente - AACD
2007-2008	Curso de Pós-Graduação em Periodontia. Nível de Especialização, Associação Paulista dos Cirurgiões Dentistas (APCD) - regional de Araraquara
2008-2010	Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de concentração Odontopediatria. Nível Mestrado, Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP



*Deficiências...*

“Deficiente” é aquele que não consegue modificar sua vida, aceitando as imposições de outras pessoas ou da sociedade em que vive, sem ter consciência de que é dono do seu destino.

“Louco” é quem não procura ser feliz com o que possui.

“Cego” é aquele que não vê seu próximo morrer de frio, de fome, de miséria, e só tem olhos para seus míseros problemas e pequenas dores.

“Surdo” é aquele que não tem tempo de ouvir um desabafo de um amigo, ou o apelo de um irmão. Pois está sempre apressado para o trabalho e quer garantir seus tostões no fim do mês.

“Mudo” é aquele que não consegue falar o que sente e se esconde por trás da máscara da hipocrisia.

“Paralítico” é quem não consegue andar na direção daqueles que precisam de sua ajuda.

“Diabético” é quem não consegue ser doce .

“Anão” é quem não sabe deixar o amor crescer.

*Renata Arantes Villela*



*Dedicatória*

## *Dedicatória*

---

A Deus,

Presente em todos os momentos da minha vida, me abençoando e atendendo minhas preces.

Aos meus pais Yuki e Alice,

Muito obrigada por sempre me apoiarem nas minhas decisões. Vocês são a minha fonte de energia, força e amor. Minha verdadeira inspiração. Amo muito vocês!

À minha querida avó Tokuko Tanaka (*in memoriam*)

Batiam, amo muito você. Sempre estará no meu coração!

Ao meu namorado Rogério,

Muito obrigada por fazer minha vida tão animada e feliz. Por estar sempre ao meu lado dividindo as alegrias e as dificuldades (principalmente nos momentos estressantes). Amo você!

## *Dedicatória*

---

Aos meus irmãos Yooiti e Yassushi,

Sempre me incentivando a buscar meus sonhos. Muito obrigada pelo apoio.

Aos meus sobrinhos Vítinho e Jun,

Meus tesouros que me trazem muita alegria!

A minha querida amiga-irmã Katinha

Mesmo à distância estava sempre presente e torcendo pelo meu sucesso. Amiga, obrigada pela amizade, pelo carinho, atenção e conselhos dados.

"O sorriso enriquece os recebedores sem empobrecer os doadores." (Mário Quintana)





*Agradecimentos  
Especiais*

## ***Agradecimentos especiais***

---

A Profa. Dra. Raquel M. Scarel Caminaga,

Agradeço por ter me acolhido com carinho em um momento tão decisivo da minha vida. Agradeço pela paciência na orientação desta dissertação e nos momentos de incertezas. Com você pude aprender o valor e o significado da humildade, da paciência e da força de vontade. Muito obrigada.

A Profa. Dra. Elisa Maria Ap. Giro,

Agradeço a Deus por ter conhecido uma pessoa tão especial com um coração do tamanho do mundo. Sempre disposta a me ajudar nos momentos de dúvida e por ter me mostrado a verdadeira essência no atendimento aos pacientes com necessidades especiais.

A Licia Bezerra Cavalcante,

Obrigada pela sua amizade. Só você sabe o que nós passamos nesta pesquisa, principalmente nas viagens da coleta. Sempre se preocupando comigo, me acalmando e ajudando no desenvolvimento desse trabalho. Sempre juntas enfrentando os momentos de incertezas, dúvidas e conquista. Muito obrigada!

A Profa Dra Juliana R. Pires e a Profa Dra Marisa V. Capela

Agradeço a ajuda de vocês no desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada.



*Agradecimientos*

## *Agradecimentos*

---

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, nas pessoas do Diretor Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla e vice-diretora Profa. Dra. Andréia Afonso Barretto Montandon.

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria Ângela Cristina Cilense Zuanon, Cyneu Aguiar Pansani, Elisa Maria Aparecida Giro, Fábio de Abreu-e-Lima, Josimeri Hebling, Lourdes Aparecida Martins dos Santos-Pinto e Rita de Cássia Loiola Cordeiro.

Às minhas queridas amigas Dulce, Cármen, Emi e Michele por todos os momentos compartilhados nas alegrias e nas dificuldades. Obrigada Frenéticas!!!!!!

“A amizade é um amor que nunca morre.”

(Mário Quintana)

Aos meus amigos de curso de mestrado Débora, Fabiano, Juliana, Cristiane e Marcela pelo apoio e ajuda durante todo o curso. Muito obrigada a todos.

Aos amigos da Pós-graduação Natália, Nancy, Ana Luísa, Hérica, Laine, Simone, Juliana Gondim, Amanda, Thalita, Maga pelo carinho e convivência compartilhados durante todo o curso.

## *Agradecimentos*

---

Às colegas Rita, Marilis e Paloma que ajudaram na coleta da amostra durante o estágio de pacientes com necessidades especiais. Rita seu apoio foi fundamental para conseguir finalizar esse trabalho.

Aos amigos do laboratório Yeon, Carina, Karen, Giovana, Lívia, Suzane e River pela ajuda fornecida sempre que precisei.

Aos professores Valfrido do departamento de Cirurgia e Juliane do departamento de Urgência que abriram as portas da clínica para que eu pudesse desenvolver essa pesquisa. E todos os profissionais que contribuíram de forma direto ou indireto para essa pesquisa.

Aos funcionários da Odontopediatria Dona Odete, Tânia, Cristina e Márcia pela convivência e ajuda durante as clínicas.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia Profa Dra Ana Maria, Prof. Dr. Paulo, Profa Dra Ticiania Capote, Marcelo Conte, Margareth e Ronaldo pela convivência e ajuda.

A secretária do Departamento de Clínica Infantil Soninha por sempre estar disponível a ajudar.

## *Agradecimentos*

---

Aos funcionários do laboratório do departamento de Clínica Infantil Pedrinho e Totó pelos aparelhos, alicates e moldeiras que eram fornecidos quando precisava.

A todos os funcionários da Pós-graduação, Mara Amaral, Rosângela dos Santos, José Alexandre Garcia e Flávia de Jesus por toda atenção, carinho e eficiência com que sempre me atenderam.

Aos funcionários da Biblioteca e da seção de Esterilização pela convivência agradável e contribuição para minha formação acadêmica, profissional e humana.

À todos os pacientes, pais e funcionários das APAEs que nos receberam de forma tão carinhosa e sempre acreditaram em nosso trabalho.

Ao Célio que nos ajudou na montagem das planilhas e dividindo seus conhecimentos sobre números.

À FAPESP pela credibilidade e auxílio para o desenvolvimento desta pesquisa e CAPES pela disponibilidade da bolsa de estudo durante o curso de mestrado e estágio.

**MUITO OBRIGADA!!!!**

## SUMÁRIO:

Lista de abreviaturas .....	16
Resumo .....	19
Abstract .....	23
1. Introdução .....	26
2. Revisão de literatura.....	30
3. Proposição .....	52
4. Material e Método .....	54
4.1 Delineamento do estudo e seleção da casuística .....	54
4.2 Exame clínico periodontal .....	56
4.3 Análise da Expressão Genética .....	57
4.3.1 Obtenção de tecido gengival .....	57
4.3.2 Obtenção de RNA Humano .....	57
4.3.3 Reações de Transcrição Reversa .....	59
4.3.4 Reações de PCR quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR) .....	60
4.4 Metodologia Estatística .....	64
5. Resultado .....	66
5.1 Características demográficas e clínicas da casuística .....	66
5.2 Obtenção do RNA e padronização do RT-qPCR .....	72
5.3 Análise da expressão gênica .....	73
5.3.1 Análise da expressão do gene <i>IFNG</i> .....	77

5.3.2	Análise da expressão do gene <i>IFNGR1</i> .....	77
5.3.3	Análise da expressão do gene <i>IFNGR2</i> .....	79
5.3.4	Análise da expressão do gene <i>IFNA</i> .....	80
5.3.5	Análise da expressão do gene <i>IFNAR1</i> .....	80
5.3.6	Análise da expressão do gene <i>IFNAR2</i> .....	80
5.3.7	Análise da expressão do gene <i>JAK1</i> .....	81
5.3.8	Análise da expressão do gene <i>STAT1</i> .....	81
5.3.9	Análise da expressão do gene <i>IRF1</i> .....	82
5.4	Comparação da expressão de diferentes genes em cada análise utilizando diferentes calibradores .....	82
6.	Discussão .....	88
7.	Conclusão .....	107
8.	Referências .....	110
9.	Anexo .....	131



## LISTA DE ABREVIATURAS

*β Actina*: gene beta actina

cDNA: Ácido Desoxirribonucléico complementar

COX-2: Ciclooxygenase 2

CuZnSOD1: enzima cobre-zinco-superóxido-dismutase 1

Cromossomo 6q23-24: braço longo do cromossomo 6 região 2 banda 3 –  
região 2 banda 4

DEPC: água tratada com Dietil Pirocarbonato, livre de RNAses, DNAses e resíduos  
de proteínas

DP: Doença Periodontal

*Ct*: *Threshold cycle*

*GAS*: gene *IFN-γ activation site*

HPLC: *high performance liquid chromatography*

*ICAM1*: gene *inter-cellular adhesion molecule 1*

*IFNA*: gene Interferon alfa

IFN- $\alpha$ : proteína Interferon alfa

*IFNAR1*: gene Interferon alfa receptor 1

IFNAR-1: proteína Interferon alfa receptor 1

*IFNAR2*: gene Interferon alfa receptor 2

IFNAR-2: proteína Interferon alfa receptor 2

*IFNB*: gene Interferon beta

*IFNG*: gene Interferon gama

IFN- $\gamma$ : proteína Interferon gama

*Ifng*: gene Interferon gamma em camundongo

*IFNGR1*: gene Interferon gama receptor 1

IFNGR-1: proteína Interferon gama receptor 1

*IFNGR2*: gene Interferon gama receptor 2

IFNGR-2: proteína Interferon gama receptor 2

IgG1: Imunoglobulina 1

IL-8: proteína Interleucina 8

IL-10: proteína Interleucina 10

*IL10RB*: gene Interleucina 10 receptor beta

IL-12: proteína Interleucina 12

*IRF1*: gene fator regulador 1 de Interferon

IRF-1: proteína fator regulador 1 de Interferon

*ISRE*: gene *Interferon stimulated response element*

*JAK1*: gene Janus-quinase 1

JAK-1: proteína Janus-quinase 1

*JAK2*: gene Janus-quinase 2

JAK-2: proteína Janus-quinase 2  
*LFA1*: gene *lymphocyte function associated antigen 1*  
LPS: lipopolissacarídeo  
MMPs: Metaloproteinases  
NI: nível de inserção  
OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man*  
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase  
PGE<sub>2</sub>: Prostaglandina E<sub>2</sub>  
PMN: Polimorfonucleares  
PS: profundidade de sondagem  
RNAm: Ácido Ribonucléico mensageiro  
RQ: *relative quantification*  
SD: Síndrome de Down  
*STAT1*: gene Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 1  
*Stat1*: gene Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 1 em camundongo  
STAT-1: Proteína Transdutora de Sinal e Ativador da Transcrição 1  
TCR/CD3: *T cell receptor/cluster of differentiation*  
T<sub>m</sub>: *melting temperature*  
Th1: Linfócito T auxiliar 1  
*TYK2*: gene Tirosina-quinase 2  
TYK-2: proteína Tirosina-quinase 2  
ZAP-70: proteína *zeta association protein kinase-70*



*Resumo*

Tanaka MH. Análise dos parâmetros clínicos periodontais e expressão genética de *Interferons alfa, gama* e genes relacionados em indivíduos portadores de Síndrome de Down com doença periodontal [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.

## Resumo

A doença periodontal (DP) em indivíduos com Síndrome de Down (SD) se desenvolve com alta prevalência, precocemente, de modo rápido e generalizado em comparação com indivíduos não-sindrômicos. Foi demonstrado que portadores da SD apresentam resposta imune diminuída em relação aos cromossomicamente normais. O objetivo desta pesquisa foi investigar diferenças nos parâmetros clínicos periodontais e níveis de expressão dos genes *Interferon-gama (IFNG)*, *Interferon-gama receptor 1 (IFNGR1)*, *Interferon-gama receptor 2 (IFNGR2)*, *Interferon-alfa (IFNA)*, *Interferon-alfa receptor 1 (IFNAR1)*, *Interferon-alfa receptor 2 (IFNAR2)*, *Janus-quinase 1 (JAK1)*, *Transdutor de sinal e ativador da transcrição 1 (STAT1)* e *Fator de regulação de interferon 1 (IRF1)* em indivíduos com SD que apresentam ou não DP e em indivíduos cromossomicamente normais. Fizeram parte deste estudo 80 indivíduos entre 7 e 57 anos de idade subdivididos em 4 grupos: SD com DP (A); indivíduos com SD sem DP (B); indivíduos não-sindrômicos (Controle) com DP (C) e indivíduos Controle sem DP (D). A expressão gênica foi investigada por meio de quantificação relativa utilizando a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real. Para o índice sangramento à sondagem (SS) não houve diferença entre os grupos A e

C. A periodontite crônica localizada foi o tipo prevalente tanto entre indivíduos com SD como Controle. Considerando os parâmetros clínicos, não foram encontradas diferenças na periodontite crônica localizada entre os indivíduos com SD e Controle, assim como para a periodontite crônica generalizada. Com relação à análise genética, observou-se que indivíduos dos grupos com SD em relação aos grupos cromossomicamente normais (A+B-C+D) tiveram uma expressão de *IFNG* semelhante ao observado entre indivíduos do grupo Controle com DP (C-D). No entanto, quando a DP acomete indivíduos com SD (A-B), o *IFNG* não apresenta uma resposta imune tão eficiente quanto para os indivíduos cromossomicamente normais (C-D). Na expressão do gene *IFNA*, indivíduos com SD (A+B-C+D) têm uma expressão consideravelmente menor que os indivíduos cromossomicamente normais com DP (C-D), indicando uma imunodeficiência em um importante mecanismo de controle da inflamação. Indivíduos com SD apresentaram expressão significativamente maior dos genes *IFNGR2* e *IFNAR1*, os quais residem no cromossomo 21. A expressão de *JAK1* nos indivíduos com SD independente de DP (A+B-C+D) foi acentuadamente menor, enquanto que a expressão do gene *IRF1* foi significativamente maior nesses indivíduos em comparação aos indivíduos cromossomicamente normais (C-D). Portanto, a SD provavelmente pode interferir na cascata da via de sinalização do *IFNG* e *IFNA* contribuindo para uma menor

eficiência do sistema imune de indivíduos frente à um estímulo inflamatório como a DP.

**Palavras-chave:** Síndrome de Down, Periodontite crônica, *Interferon alfa*, *Interferon gama*



*Abstract*

Tanaka MH. Periodontal clinical parameters analysis and genetics expression of *Interferon-alpha*, *Interferon-gamma* and genes related in individuals with Down Syndrome and periodontal disease [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.

## **Abstract**

Periodontal disease (PD) in individuals with Down Syndrome (DS) has an early, quickly and widespread onset and high prevalence when compared with individuals without the Syndrome. Only poor oral hygiene does not explain the severe periodontal destruction seen in DS patients. It has been shown that DS patients have a weaker immune response than people with normal number of chromosomes. The aim of this study was to investigate differences in periodontal clinical parameters and the expression levels of the genes *Interferon-gamma (IFNG)*, *Interferon-gamma receptor 1 (IFNGR1)*, *Interferon-gamma receptor 2 (IFNGR2)*, *interferon-alpha (IFNA)*, *interferon-alpha receptor 1 (IFNAR1)*, *Interferon-alpha receptor 2 (IFNAR2)*, *Janus-kinase 1 (JAK1)*, *Signal transducers and activators of transcription 1 (STAT1)* and *Interferon regulatory factor 1 (IRF1)* in DS patients with and without periodontal disease in comparison with chromossomically normal individuals. A total of 80 individuals aged 7 to 57 years participated in this study and were divided into 4 groups: DS with PD (A); DS without PD (B); individuals without DS (control) with PD (C) and individuals without DS (control) and without PD (D). A quantitative RT-qPCR was used to investigate gene expression. There was no difference between groups A and C regarding the bleeding on probing



(BOP) index. The most prevalent type of periodontitis seen in this study was the localized chronic periodontitis, both in individuals with and without DS. Considering the clinical parameters, localized and generalized chronic periodontitis did not differ between individuals with and without DS. Regarding genetic analysis, individuals of the groups with DS in relation to the groups without DS (A+B-C+D) showed an *IFNG* expression similar to that seen among the individuals of groups control with PD (C-D). However, individuals with DS (A+B-C+D), the *IFNG* immune response is not as efficient as that of individuals without DS (C-D). Individuals of groups with DS (A+B) have a considerably smaller expression of the *IFNA* gene than those of groups without DS (C+D), indicating an immune deficiency in an important inflammation control mechanism. Individuals with DS presented a significantly greater expression of the genes *IFNGR2* and *IFNAR1*, both located in chromosome 21. *JAK1* expression in individuals with DS regardless of PD (A+B-C+D) was markedly smaller, while the expression of the *IRF1* gene was significantly greater when compared with individuals without DS (C+D). Therefore, DS can probably interfere in the *IFNG* and *IFNA* signaling pathways, making the response of the immune system of individuals with DS to inflammatory stimuli, such as PD, less efficient.

**Keywords:** Down Syndrome, Chronic periodontitis, *Interferon-alpha*, *Interferon-gamma*



## *Introdução*

## 1 Introdução

A síndrome de Down (SD) é a mais freqüente desordem cromossômica que é caracterizada por um cromossomo 21 extra ou pela triplicação do braço longo do cromossomo 21<sup>14,37,90</sup>.

Existe uma correlação positiva entre idade materna e incidência de SD, sendo o material cromossômico adicional, em 80% dos casos, tem origem materna<sup>90</sup>. A explicação mais provável para o efeito da idade materna na maior predisposição a gerar um filho com SD é o envelhecimento do gameta feminino<sup>13</sup>. A freqüência da SD é de 1 para 600 a 1000 nascidos vivos<sup>25,30</sup>.

A SD é uma condição complexa com mais de 30 características clínicas que são bastante variáveis entre os afetados e estão relacionadas com a super expressão de genes específicos que se encontram no cromossomo 21<sup>18,26</sup>. Entre as características observadas nos indivíduos com SD, somente duas ocorrem em praticamente 100% dos casos: retardo mental e modificações neuropatológicas idênticas às observadas em indivíduos com a Doença de Alzheimer (em indivíduos com SD de mais de 35 anos)<sup>94</sup>.

A prevalência de DP em adolescentes com SD é de 30% a 40%, sendo que em indivíduos com aproximadamente 30 anos a prevalência aumentando para cerca de 60 a 100%<sup>63,103</sup>. Cichon et al.<sup>23</sup> (1998) sugeriram que a destruição periodontal severa que ocorre nos

indivíduos com SD é consistente com o padrão de periodontite agressiva. Mesmo que os indivíduos com comprometimento intelectual apresentem higienização bucal precária, isto não é capaz de isoladamente explicar a destruição periodontal severa que ocorre nos indivíduos com SD, pois foi observado que a prevalência de DP foi maior em crianças com SD do que em crianças com similar retardo mental<sup>118</sup>.

Foi observado que os indivíduos com SD apresentam alterações no sistema imune como funções diminuídas de quimiotaxia e fagocitose por neutrófilos e linfócitos<sup>6,12,68,117</sup>; e ativação defeituosa de linfócitos T<sup>26,113</sup>.

Apesar de tais estudos contribuírem muito para a elucidação da etiopatogênese da DP em indivíduos com SD, é importante também investigar qual o papel de citocinas, seus receptores e vias de sinalização intracelular na DP.

O papel de algumas citocinas reconhecidamente importantes na DP, como o Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )<sup>122</sup> e o Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) foram investigadas em células do sangue periférico de indivíduos com SD<sup>44-45</sup>, mas não em tecido gengival inflamado objetivando o estudo da DP.

Pelo fato de a resposta imune ocorrer mediante a ligação das citocinas aos seus receptores na superfície das células, é válido investigar também a expressão dos receptores do IFN- $\gamma$ . O IFN- $\gamma$  tem dois receptores: o *IFNGR1* (OMIM 107470) no 6q23-q24; e o *IFNGR2* (OMIM 147569) cujo gene está localizado no braço longo do cromossomo 21

(21q). Vale notar que no braço longo do cromossomo 21 existe um agrupamento de genes (*cluster*) composto pelos genes *IL10RB* e *IFNGR2* juntamente com os genes dos dois receptores do IFN- $\alpha$ , estando os quatro genes orientados um em seguida do outro (*tandem*)<sup>99</sup>.

Considerando que a citocina IFN- $\gamma$  liga-se a receptores do tipo II, os mecanismos pelos quais ocorre a transdução de sinais que despertam respostas celulares específicas são mediados por fosforilação de enzimas Janus-quinases (JAK) associadas aos receptores e por fatores de transcrição STAT (Transdutor de Sinais e Ativador da Transcrição)<sup>1</sup>.

O IRF (fator regulador de interferon) compõe-se de uma família de genes que codificam fatores de transcrição que atuam como mediadores dos efeitos de interferons (IFNs).

Até o momento não foi encontrada na literatura nenhuma pesquisa investigando expressão diferencial em indivíduos com SD em relação aos genes *IFNG* e *IFNA*, seus receptores e outros genes relacionados à resposta celular, em tecido gengival inflamado obtido de indivíduos com SD afetados pela DP. Desta forma, este trabalho poderá contribuir com valiosas informações sobre peculiaridades do sistema imune de indivíduos com SD, e também poderá ajudar a explicar a maior tendência à DP nos indivíduos com essa síndrome.



*Revisão da  
Literatura*

## 2 Revisão da literatura

### 2.1 Síndrome de Down

Com base no censo populacional de 2000, há no Brasil cerca de 300 mil indivíduos com Síndrome de Down (SD) e, anualmente cerca de 8 mil brasileiros nascem com a síndrome (Nascimento<sup>91</sup>, 2009; Vieira et al.<sup>125</sup>, 2005).

A SD é a mais freqüente desordem cromossômica caracterizada por um cromossomo 21 extra ou pela triplicação do braço longo do cromossomo 21 (Borges-Osorio, Robinson<sup>14</sup>, 2002; Franciotta et al.<sup>37</sup>, 2006; Mustacchi, Rozone<sup>90</sup>, 1990). O cromossomo 21 é o menor cromossomo existente no ser humano, contém aproximadamente 225 genes, o que corresponde a menos de 1% de todo genoma humano (Pennisi<sup>94</sup>, 2000). Este fato faz com que a trissomia do cromossomo 21 seja a condição aneuplóide mais comum compatível com a sobrevivência a termo (Nascimento<sup>90</sup>, 2009). Apesar disso, a taxa de aborto espontâneo de fetos com SD é de 25% em média, subindo para 33% quando a mãe tem idade mais avançada, até 45 anos (Savva et al.<sup>110</sup>, 2006). A expectativa de vida de uma criança com SD está relacionada ao alto risco de mortalidade nos primeiros anos de vida (principalmente de 0 a 5 anos) por infecções respiratórias (33,1%) e por malformações cardíacas congênitas (12,8%) (Bittles et al.<sup>13</sup>, 2007).

A SD caracterizada por um cromossomo 21 extra é conhecida como Trissomia Simples e ocorre em 95% dos casos. Um estudo evidenciou que 89,4% dos casos de indivíduos com SD têm como etiologia a não-disjunção cromossômica durante a meiose materna, 8,8% durante a meiose paterna e 1,8% dos casos têm origem na não-disjunção durante a mitose do zigoto (Mosaicismo) (Hassold, Sherman<sup>56</sup>, 2000).

O SD do tipo Mosaico são aqueles onde alguns indivíduos com SD possuem uma população de células com 46 cromossomos e outra com a Trissomia do 21 (Hassold, Sherman<sup>56</sup>, 2000). Isso ocorre por mecanismo de não-disjunção cromossômica nas primeiras mitoses após a formação do zigoto e pode originar diferentes percentuais de Mosaicismo. Quanto maior o percentual de células com trissomia do 21 maiores serão as manifestações clínicas da SD no indivíduo.

Quando ocorre a translocação geralmente entre o cromossomo 21 e o 14 ou 15, que são todos cromossomos acrocêntricos (Borges-Osorio, Robinson<sup>14</sup>, 2002), esse tipo de translocação é chamada Robertsoniana e é responsável por 2,2% dos casos de SD (Mustacchi, Rozone<sup>90</sup>, 1990). Para ocorrer a translocação, os cromossomos sofrem quebras nas regiões centroméricas; assim um novo cromossomo será constituído pelos braços longos do cromossomo 21 e do 14 (ou 15), tornando-se um cromossomo submetacêntrico. Os braços curtos dos cromossomos envolvidos na translocação tendem a se perder nas divisões subseqüentes. Em alguns casos (1%) a translocação ocorre



entre os dois cromossomos 21 ou entre o 21 e o 22 (Mustacchi, Peres<sup>89</sup>, 2000).

Há forte correlação entre a idade materna e a geração de filhos com SD, ou seja, numa mulher com 30 anos o risco é de 1:1000, e com 40 anos a chance de ter um filho afetado é de 9:1000 nascidos vivos (Hokk et al.<sup>58</sup>, 1983; Johnstone, Haluska<sup>65</sup>, 2001). O envelhecimento do gameta feminino é a explicação mais provável para o efeito da idade materna na maior predisposição em gerar um filho com SD, pois a gametogênese fica estacionada por muitos anos no fim da prófase I (Borges-Osorio, Robinson<sup>14</sup>, 2002).

Em famílias cujas mães são mais jovens, os casos de SD por translocação são mais comuns. Assim, recomenda-se analisar o cariótipo dos pais para investigar se há presença de translocações equilibradas, como a Robertsoniana, pois apesar do indivíduo ser fenotipicamente normal, ele pode transmitir o cromossomo alterado.

De forma geral, para mulheres que já tiveram um filho com SD, o risco de recorrência da SD é de 1% (seja por Trissomia Simples, por Translocação ou Mosaicismo) (Caron et al.<sup>17</sup>, 1999). Um estudo mais aprofundado baseado no risco de recorrência comparado ao risco associado à idade materna originou a “taxa de morbidade padrão” à SD, mostrando que a recorrência para SD foi de 2,4 vezes, e para qualquer outro tipo de trissomia foi 2,3 vezes, independente da idade materna na época de gestação do primeiro filho com SD (Warburton et al.<sup>127</sup>, 2004).

Para Sághy<sup>105</sup> (2008), a idade materna influencia na prevalência de serem geradas crianças com SD. Na Hungria, 60% dos indivíduos com SD são filhos de mães com idade acima de 35 anos. Isso é confirmado por outros dados mundiais. Dados americanos mostram que 80% dos indivíduos com SD nasceram de mães com idade acima dos 35 anos. Atualmente, a idade materna para essa incidência é de 32,5 anos e que pode chegar a ficar crítica aos 35 anos, após essa idade a incidência é significativamente maior.

Como uma condição complexa, a SD possui mais de 30 características clínicas que são bastante variáveis entre os afetados e estão relacionadas com a superexpressão de genes específicos que se encontram no cromossomo 21 (Carter et al.<sup>18</sup>, 1960). Entre as características clínicas importantes em indivíduos com SD estão: hipotonia (99%), microcefalia (85%), malformações cardíacas (50%) e gastrointestinais congênitas (3%), deficiências no sistema imune, instabilidade atlanto-axial, maior incidência de ataques convulsivos e de leucemia (15 a 20 vezes maior), perda auditiva, hipotireoidismo e anomalias oculares (Mustacchi, Rozzone<sup>90</sup>, 1990; Nizetic<sup>92</sup>, 2001). Existem outros sinais de menor comprometimento médico, mas que são úteis na caracterização da SD: baixa estatura, boca entreaberta (devido à macroglossia e/ou hipotonia), epicanto, mãos curtas e largas com uma única prega palmar transversa (linha simiesca – 40%), quinto dedo encurvado (clinodactilia) (Mustacchi, Rozzone<sup>90</sup>, 1990). Indivíduos com

SD também apresentam senilidade prematura, provavelmente relacionada a um dano aos lipídios de células nervosas (Brooksbank, Balazs<sup>15</sup>, 1983). Entre as características observadas nos indivíduos com SD, somente duas ocorrem em praticamente 100% dos casos: retardo mental e modificações neuropatológicas idênticas às observadas em indivíduos com a Doença de Alzheimer (em indivíduos com SD de mais de 35 anos) (Nizetic<sup>92</sup>, 2001).

Em relação à cavidade bucal observa-se palato ogival, macroglossia associada à hipotonia muscular, língua fissurada, prevalência reduzida de lesões de cárie e aumentada de doença periodontal (Mustacchi, Peres<sup>89</sup>, 2000). Também são observadas anomalias dentárias como a presença de dentes conóides, oligodontia e retardo na erupção dentária (Rey, Birman<sup>103</sup>, 1990), microdontia, hipocalcificação dos dentes, fusão e geminação dentária (Ciamponi, Guaré<sup>22</sup>, 2000).

Para que os procedimentos médicos e odontológicos a serem realizados não tragam danos à saúde do paciente, é necessário que a anamnese e o exame clínico nesses indivíduos sejam cuidadosos e detalhados pelo fato dos indivíduos com SD manifestarem várias complicações clínicas.

Os pacientes com alterações cardíacas devem ser encaminhados ao cardiologista antes do procedimento para que seja prescrita uma profilaxia antibiótica adequada para se evitar o risco de uma

complicação como a endocardite, especificamente quanto aos procedimentos odontológicos invasivos a serem realizados em indivíduos com SD (Barnett et al.<sup>7</sup>, 1988).

Apesar dos distúrbios clínicos importantes, indivíduos com SD podem ter um bom desenvolvimento neuromotor e capacidade de socialização quanto mais precocemente receberem os cuidados médicos e odontológicos adequados, além de educação que atenda às suas necessidades especiais, de forma que eles e seus familiares possam ter uma boa qualidade de vida.

## 2.2 Doença Periodontal

A Doença Periodontal (DP) é uma infecção de ordem multifatorial, causada por uma combinação de fatores genéticos e ambientais tendo como fator essencial para seu desenvolvimento a presença de bactérias específicas (Haffajee, Socransky<sup>49</sup>, 1994).

Algumas bactérias têm relação direta com a doença periodontal como o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a.), *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola*, entre outras. Essas bactérias iniciam e perpetuam a inflamação podendo causar destruição no periodonto (Tonetti, Mombelli<sup>121</sup>, 1999). Além das bactérias, a resposta imunoinflamatória é necessária para determinar o grau de destruição dos tecidos periodontais (Horewicz et al.<sup>59</sup>, 2006).

Além dos periodontopatógenos e da resposta do hospedeiro, o caráter multifatorial da DP sofre influência de fatores de risco como o fumo (Johnson, Slach<sup>64</sup>, 2001) e diabetes (Mealy<sup>82</sup>, 2000); além de indicadores de risco como stress (Linden et al.<sup>75</sup>, 1996) e osteoporose (Shen et al.<sup>115</sup>, 2004). Nas doenças de caráter multifatorial é difícil quantificar qual a influência de fatores ambientais e de fatores genéticos.

Alguns estudos têm investigado a relação de fatores genéticos com a DP. Polimorfismos em genes de citocinas como a Interleucina-4 (IL-4), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-10 (IL-10), Interleucina-18 (IL-18) e Fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) tiveram relação positiva ou negativa com a DP dependendo da população estudada (Folwaczny et al.<sup>36</sup>, 2005; Galbraith et al.<sup>39</sup>, 1998; Komatsu et al.<sup>69</sup>, 2001; Scarel-Caminaga et al.<sup>112</sup>, 2004; Shapira et al.<sup>114</sup>, 2001).

Portanto, dependendo do grau de predisposição genética à DP de um indivíduo, medidas de prevenção devem ser tomadas o mais precocemente possível, evitando assim a instalação ou progressão da doença.

### **2.3 Síndrome de Down e Doença Periodontal**

Indivíduos com comprometimento intelectual apresentam higienização bucal precária, e esse fator é importante para o surgimento da DP. Entretanto, a higienização bucal precária não é capaz de

isoladamente explicar a destruição periodontal severa que ocorre nos indivíduos com SD, pois foi observado que a prevalência de DP foi maior em crianças com SD do que em crianças com similar retardo mental (Cutress<sup>27</sup>, 1971; Swallow<sup>118</sup>, 1964).

A prevalência de DP em adolescentes com SD é de 30% a 40%, sendo que em indivíduos com idade próxima aos 30 anos a prevalência aumenta para cerca de 100% (Reuland-Bosma et al.<sup>101</sup>, 2001).

Cichon et al.<sup>23</sup> (1998) e Hanookai et al.<sup>52</sup> (2000) observaram que não há melhora nem da condição clínica bucal e nem dos parâmetros microbiológicos dos pacientes com SD após uma única sessão de raspagem e polimento dental e instrução de higiene bucal. Os autores atribuem esses resultados a uma inadequada remoção do biofilme bacteriano e a resposta imune deficiente desses pacientes. Entretanto, quando esse tratamento básico foi realizado em um programa de retorno em períodos de 3 em 3 meses, esses problemas foram sanados (Sakellari<sup>106</sup>, 2001).

Um relato de caso clínico realizado por Sasaki et al.<sup>109</sup> (2004) mostra um paciente com SD que foi acompanhado por um programa de cuidados odontológicos que incluía desde raspagens sub e supragengivais até instrução de higiene bucal. Eles puderam observar um sucesso na prevenção da progressão da doença periodontal após um período de 2,5 anos de acompanhamento.

Zigmond et al.<sup>130</sup> (2006) compararam 2 grupos: um com pacientes com SD e outro com pacientes cromossomicamente normais com higiene bucal similar e mesma condição gengival, e observaram que a severidade da DP foi significativamente maior no grupo com SD do que no grupo Controle. A prevalência, severidade e extensão da DP (medidos clinicamente e radiograficamente) foram maiores nos indivíduos com SD.

Grollmus et al.<sup>48</sup> (2007) observaram que como a SD está associada com retardo mental e alterações sistêmicas, a periodontite se mostra agressiva e generalizada com destruição subsequente dos tecidos de suporte e perda dental em idade precoce. Neste estudo, os achados sugerem que com a participação de pessoas orientadas e cooperação dos pais e/ou responsáveis e um esquema de freqüência ao cirurgião dentista, os pacientes com SD conseguem manter uma boa remoção do biofilme bacteriano e assim evitar a progressão da DP.

Cheng et al.<sup>21</sup> (2008) realizaram um estudo com 21 pacientes com SD com problemas de aprendizagem de baixa a moderada e que possuíam periodontite crônica. Eles realizaram tratamento periodontal não-cirúrgico (seguidos de retornos mensais), utilização de gel de clorexidina durante a escovação e bochechos com clorexidina 2 vezes ao dia. Os resultados após 12 meses de terapia periodontal não-cirúrgico foram: uma diminuição do biofilme bacteriano de 84,1% para 23,3%, diminuição do número de sítios com sangramento à sondagem de 82,1% para 29,5% e diminuição da média de profundidade de sondagem de 3,2

para 1,8mm. Os autores concluíram que o programa de tratamento periodontal não-cirúrgico com a utilização de clorexidina e retornos mensais foi adequado e benéfico para adultos com SD e periodontite crônica.

Cichon et al.<sup>23</sup> (1998) sugeriram que a destruição periodontal severa que ocorre nos indivíduos com SD é consistente com o padrão de periodontite agressiva. Vários periodontopatógenos podem colonizar muito precocemente a cavidade oral de indivíduos com SD. Foram detectados por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) 9 de 10 espécies de periodontopatógenos em placa subgengival de indivíduos portadores de SD de 2 a 4 anos de idade, com significativa diferença em relação ao Controle (sem SD). Vale acrescentar que *Tannerella forsythensis* (*T.forsythensis*), *Bacteroides forsythus* (*B.forsythus*) e *Treponema denticola* (*T.denticola*), considerados importantes na periodontite do adulto, foram encontrados em crianças com SD desde os 2 anos de idade, sendo que, em crianças não-sindrômicas, apenas o *B. forsythus* foi detectado a partir de 8 anos de idade. A ocorrência de todas as espécies testadas aumentou gradualmente com a idade (até 13 anos), mas manteve a prevalência significativamente maior no grupo SD (Amano et al.<sup>4</sup>, 2000). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a.*) está associado à periodontite agressiva e é considerado importante na periodontite de indivíduos SD (Barr-Agholme et al.<sup>8</sup>, 1998). Sakellari et al.<sup>107</sup> (2005) estudaram indivíduos com SD e observaram que em todos os subgrupos



com diferentes idades obteve-se uma alta significância estatística na detecção de *T. forsythensis* e *A. naeslundii*. Em particular, nos adolescentes com SD observou-se uma alta prevalência estatisticamente significativa de *A.a.*, *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, *C. rectus*, *P. intermédia*, *C. sputigena* e *A. naeslundii II*. Esses achados sugerem que a colonização com importantes patógenos periodontais ocorre freqüentemente nesses indivíduos, mesmo na adolescência. Essas diferenças persistem em adultos jovens com SD, com uma diferença estatisticamente significativa pela presença de *E. corrodens*, *P. nigrens* e *P. micros*. Com essa análise detalhada da presença dos periodontopatógenos pode-se observar que os indivíduos com SD têm uma configuração diferente da microbiota subgingival (presença de espécies periodontopátogenos), particularmente em relação ao aumento da idade.

Acredita-se que a progressão da DP em indivíduos com SD seja influenciada por fatores endógenos relacionados ao sistema imune. Indivíduos com SD apresentam imunodeficiências como:

- 1) Quimiotaxia deficiente de neutrófilos (Barkin et al.<sup>6</sup>, 1980; Khan et al.<sup>68</sup>, 1975; Scree devi, Munshi<sup>117</sup>, 1998), relacionada inclusive à perda de osso alveolar (Izumi et al.<sup>63</sup>, 1989);
- 2) Menor atividade de fagocitose de Staphylococci por leucócitos (Barroeta et al.<sup>12</sup>, 1983; Gregory et al.<sup>47</sup>, 1972);

- 3) Desbalanço nas subpopulações de linfócitos T, estando a proporção de CD8+ aumentada e a de CD4<sup>+</sup> (cluster of differentiation 4<sup>+</sup>) diminuída, inclusive a de CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> (cluster of differentiation 4<sup>+</sup> cluster of differentiation 45 receptor alpha<sup>+</sup>), o que pode indicar envelhecimento precoce do sistema imune de indivíduos com SD (Barrena et al.<sup>11</sup>, 1993). Aumento na proporção de CD8+ também foi observado em adolescentes com SD (12 a 16 anos), além de maior expressão de LFA1 (lymphocyte function association antigen 1) nos linfócitos T CD4+ e CD8+ de indivíduos com SD, embora tenha sido demonstrada menor adesão celular a ICAM1 (inter-cellular adhesion molecule 1) (Lin et al.<sup>74</sup>, 2001);
- 4) Ativação defeituosa de linfócitos T de indivíduos com SD caracterizada pela transdução de sinal parcial de complexo TCR/CD3 (T cell receptor/cluster differentiation) associada à falha de fosforilação de resíduos de tirosina da proteína ZAP-70 (zeta associated protein kinase) (Scotese et al.<sup>113</sup>, 1998);

Também foi observado que a proporção de imunoglobulina G1 (IgG1) em indivíduos com SD foi maior que em indivíduos normais (Barr-Agholme et al.<sup>10</sup>, 1997). Fibroblastos gengivais de portadores de SD estimulados com lipopolissacarídeos (LPS) de *A.a.* expressam mais ciclooxigenase 2 (COX-2) que induz à produção de prostaglandina E2 (PGE2), a qual é um potente estimulador de reabsorção óssea, e que esta se apresenta em níveis elevados no fluido gengival de portadores de SD

(Barr-Agholme et al.<sup>9</sup>, 1998; Otsuka et al.<sup>93</sup>, 2002). Outra característica peculiar do sistema imune dos indivíduos com SD é a superexpressão da enzima cobre-zinco-superóxido-dismutase 1 (CuZnSOD 1), cujo gene está localizado no cromossomo 21. Essa enzima converte rapidamente superóxidos em peróxido de hidrogênio. Devido à trissomia, encontram-se níveis dessa enzima de 50% a 150% mais elevados quando comparados ao controle. Esses altos níveis são capazes de provocar nos polimorfonucleares (PMN) drástica redução de superóxidos, diminuindo a capacidade dessas células agirem contra microrganismos que requeiram estritamente superóxidos para serem destruídos (Mustacchi, Rozzone<sup>90</sup>, 1990).

Considerando-se em conjunto tais peculiaridades do sistema imune de indivíduos com SD, isso pode contribuir para que esses manifestem um alto índice de DP quando comparados com indivíduos cromossomicamente normais ou com deficiência mental (Barkin et al.<sup>6</sup>, 1980; Barr-Agholme et al.<sup>10</sup>, 1997; Khan et al.<sup>68</sup>, 1975).

## **2.4 Imunogenética**

É crescente o número de publicações científicas que investigam o envolvimento imunogenético da DP em indivíduos cromossomicamente normais (Garlet et al.<sup>40</sup>, 2005; McGuire, Nunn<sup>81</sup>,

1999; Scarel-Caminaga et al.<sup>112</sup>, 2004; Shirodaria et al.<sup>116</sup>, 2000; Trevilatto et al.<sup>123</sup>, 2003). Em relação à DP que acomete indivíduos com SD, observa-se que as publicações científicas enfocam mais o papel de enzimas como as metaloproteinases (MMPs), que são as principais enzimas que atuam na degradação tecidual (Gerdes et al.<sup>45</sup>, 1993; Komatsu et al.<sup>69</sup>, 2001; Mian et al.<sup>84</sup>, 2003; Otsuka et al.<sup>93</sup>, 2002). Apesar de tais estudos contribuírem muito para a elucidação da etiopatogênese da DP em indivíduos com SD, é importante também investigar a participação de citocinas, seus receptores e vias de sinalização intracelular na DP.

O papel de algumas citocinas reconhecidamente importantes na DP, como o Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Torre et al.<sup>122</sup>, 1995) e o Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) foram investigadas em células do sangue periférico de indivíduos com SD (Gerdes et al.<sup>44</sup>, 1992; Gerdes et al.<sup>45</sup>, 1993), mas não em tecido gengival inflamado, objetivando o estudo da DP.

Em 1957, Issacs e Linderman<sup>60</sup> (1957) descreveram um fator com propriedade de interferência viral. Por mais de 40 anos, os interferons (IFNs) foram avaliados como adjuvantes na terapêutica de um amplo número de doenças. Pesquisadores revelaram diversos mecanismos de ação dos IFNs, incluindo atividade antiviral, citoestática e potencializador do sistema imune (Jonasch, Haluska<sup>66</sup>, 2001). Somente em 1978, os IFNs foram purificados em quantidade suficiente que permitiram sua caracterização química e física. Inicialmente, as

nomenclaturas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  foram utilizadas devido aos seus picos apresentados na coluna cromatográfica de alta pressão líquida (HPLC) (Pestka<sup>95</sup>, 1997). Em 1980, num encontro patrocinado pelo Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas e a Organização Mundial de Saúde, os IFNs foram formalmente classificados em três categorias baseadas em suas especificidades antigênicas, adotando-se a designação de: IFN leucocitário (IFN- $\alpha$ ), fibroblástico (IFN- $\beta$ ) e imune (IFN- $\gamma$ ) (Jonasch, Haluska<sup>66</sup>, 2001).

A proteína IFN- $\alpha$  é produzida por tipos celulares típicos, principalmente leucócitos. Sua indução normalmente é seguida de uma exposição à vírus, polipeptídeos e citocinas. A produção do IFN- $\gamma$  é tipicamente realizada por tipos celulares como as células T e as células matadoras naturais (*Natural Killer*). Sua indução é realizada diretamente pelas células que sofreram infecção viral, ou seja, após estímulos que incluem antígenos específicos de células T e interleucina-12 (IL-12) (Doly et al.<sup>31</sup>, 1998; Jonasch, Haluska<sup>66</sup>, 2001).

O IFN- $\alpha$  induz atividade anti-proliferativa e antitumoral enquanto que o IFN- $\gamma$  tem atividade antiviral mais fraca, porém possui propriedade imunomodulatória mais potente (Tonetti, Mombelli<sup>120</sup>, 1999).

Os IFNs são divididos em dois grandes subgrupos pela sua habilidade de ligação com os receptores (Aguet et al.<sup>3</sup>, 1984; Haque, Williams<sup>53</sup>, 1998; Jonasch, Haluska<sup>66</sup>, 2001; Merlin et al.<sup>83</sup>, 1985), como por exemplo, foram denominados IFNs do tipo I aqueles que se ligam aos

receptores do IFN do tipo I, que incluem o IFN- $\alpha$  e o IFN- $\beta$ . O IFN- $\gamma$  é o único IFN do tipo II, e sua ligação é somente com os receptores do tipo II (Jonasch, Haluska<sup>66</sup>, 2001; Pfeffer et al.<sup>96</sup>, 1998).

As informações sobre a atuação dos IFNs na DP mostram-se conflitantes. Em experimentos com cultura de fibroblastos gengivais submetidos à estimulação com LPS de *P. gingivalis* mostraram que os IFNs são capazes tanto de potencializar quanto inibir respostas inflamatórias através da regulação dupla da Interleucina-8 (IL-8) mediante estímulos diferentes (Sakuta et al.<sup>108</sup>, 1998). Experimentos que analisaram a expressão gênica apresentaram maior quantidade de RNAm de IFN- $\gamma$  em tecido gengival de indivíduos com periodontite agressiva em relação a indivíduos normais (Garlet et al.<sup>40</sup>, 2005). Sugere-se que o IFN- $\gamma$  seja importante na reabsorção óssea que ocorre na DP, uma vez que é um potente ativador de macrófagos, neutrófilos e pode estimular o desenvolvimento de células Th1 (Lehtonen et al.<sup>73</sup>, 1997).

Pelos dados que foram apresentados, compreende-se que cada componente do sistema imune é regulado por uma intrincada rede de comunicação entre citocinas (Fujihashi et al.<sup>38</sup>, 1993). O estudo da cinética da doença pode mostrar diferentes padrões de ativação e inibição de citocinas e enzimas durante a evolução da doença. Assim, ainda há muitas questões a serem elucidadas, principalmente no que se refere à DP em indivíduos com SD, os quais apresentam particularidades no seu sistema imune como já foi citado.

Pelo fato da resposta imune ocorrer mediante a ligação das citocinas aos seus receptores na superfície das células, é válido investigar também a expressão dos receptores do IFN- $\gamma$ .

O IFN- $\gamma$  tem dois receptores: o *IFNGR1* (OMIM 107470) no 6q23-q24; e o *IFNGR2* (OMIM 147569) cujo gene está localizado no braço longo do cromossomo 21 (21q). Vale notar que no braço longo do cromossomo 21 existe um agrupamento de genes (*cluster*) composto pelos genes *IL10RB* e *IFNGR2* juntamente com os genes dos dois receptores do IFN- $\alpha$ , estando os quatro genes orientados um em seguida do outro (*tandem*) (Reboul et al.<sup>99</sup>, 1999). Foi observado que essa região é altamente conservada entre humanos e camundongos, apresentando sintonia com o cromossomo 16 de camundongos (Reboul et al.<sup>99</sup>, 1999), o que indica a importância do papel biológico dessa organização genética.

Os mecanismos pelos quais decorre a transdução de sinais da ligação dos IFNs aos seus receptores, despertando respostas celulares específicas, são mediados por fosforilação de enzimas Janus-quinase (JAK) associadas aos receptores e por fatores de transcrição STAT (Transdutor de Sinais e Ativador da Transcrição), configurando a via de sinalização JAK/STAT (Abbas et al.<sup>1</sup>, 2003). O STAT-1 é o principal fator de transcrição que regula genes responsivos a IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Camundongos nocauteados para *STAT1* são completamente insensíveis a IFN- $\gamma$  (Abbas et al.<sup>1</sup>, 2003). A ligação do IFN- $\gamma$  aos receptores ativa o mecanismo em que a STAT-1 regula a síntese de substâncias

microbicidas (Figura 1). Darnell et al.<sup>28</sup> (1994) postulou que na transdução do sinal de IFN- $\alpha$  aos seus receptores há também a participação de *STAT2*, além de *STAT1*, os quais podem formar heterodímeros.

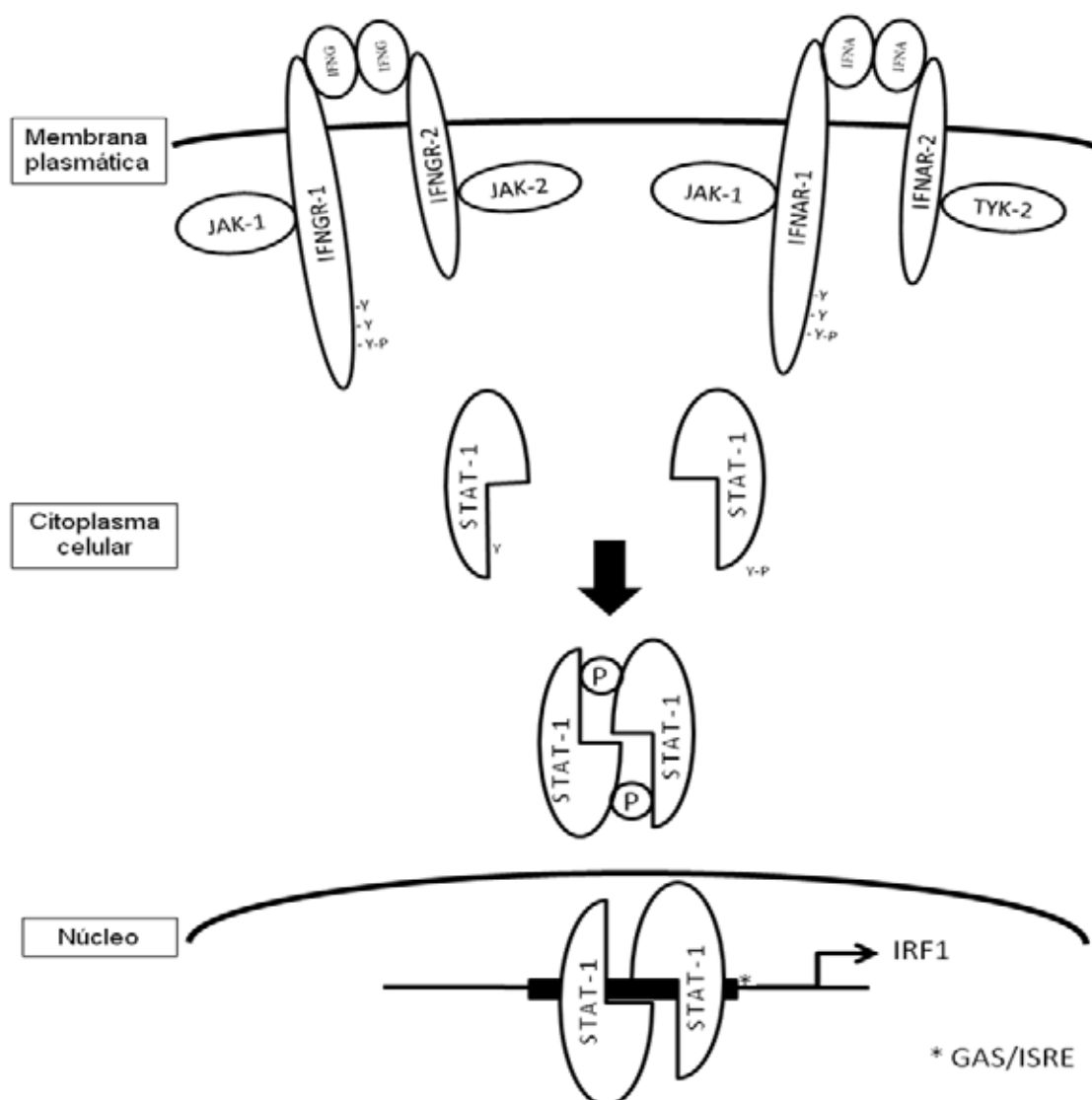


FIGURA 1. Sinalização do IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha$ . \*

\*Os sinais de IFN- $\gamma$  interagem por meio de receptores diméricos IFNGR-1 e IFNGR-2, enquanto IFN- $\alpha$  liga-se a seus receptores IFNAR-1 e IFNAR-2. Para ambos IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha$  há transdução do sinal por meio da JAK-1 que media a fosforilação dos resíduos de tirosina (Y) no receptor IFNGR-1 ou IFNAR-1, os quais servem como sítios de ancoragem para a STAT-1 que se torna ativada, se dissocia do receptor e forma dímeros. Os dímeros de STAT-1 migram para o núcleo da célula e se ligam às seqüências de DNA nas regiões promotoras (GAS para IFN- $\gamma$  e ISRE para IFN- $\alpha$ ). Dessa forma é ativada a transcrição de genes responsivos à IFNs. (figura baseada no artigo de Darnell et al.<sup>28</sup> [1994]).



A proteína IFN- $\gamma$  e a proteína IFN- $\alpha$  se ligam aos seus respectivos receptores heterodiméricos formando um complexo e promovem, por meio de uma série de interações protéicas, a fosforilação seqüencial de tirosina nas subunidades desses receptores, por meio de JAK-1 e JAK-2 para IFN- $\gamma$ , e JAK-1 e TYK-2 para IFN- $\alpha$  (proteínas tirosino-quinases). Uma vez fosforilados, esses resíduos de tirosina servem como sítios de ancoragem para o fator de transcrição STAT-1, que após ser fosforilado, torna-se ativado, dissocia-se dos receptores de IFN, e liga-se à outra molécula STAT-1. Na ativação de dímeros STAT-1 ocorre a fosforilação de um único resíduo de serina, e em seguida, o mesmo transloca-se para o núcleo da célula. O dímero *STAT-1* advindo de IFN- $\gamma$  liga-se a seqüências de DNA no núcleo chamadas de *GAS* (*IFN- $\gamma$  activation site*), enquanto os dímeros STAT-1 advindos da ativação de IFN- $\alpha$  ligam-se a seqüências *ISRE* (*Interferon stimulated response element*). Essas seqüências de DNA no núcleo são regiões promotoras de genes responsivos a IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha$ , e ativam a transcrição de tais genes (Darnell et al.<sup>28</sup>, 1994; Hamilton et al.<sup>51</sup>, 2002).

O IRF (fator regulador de interferon) compõe-se de uma família de genes que codificam fatores de transcrição que atuam como mediadores dos efeitos de interferons. IRF-1 é expresso em níveis basais baixos por células T, células matadoras naturais e macrófagos (Lohoff, Mak<sup>77</sup>, 2005; Miyamoto et al.<sup>85</sup>, 1988). Entretanto, a expressão do IRF-1 é fortemente induzido por diversos agentes como: vírus, lipopolissacarídeo

(LPS), Interleucina-1 (IL-1), Interleucina-12 (IL-12), IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  e fator de necrose tumoral (TNF) (Coccia et al.<sup>24</sup>, 2000; Harada et al.<sup>54</sup>, 1994; Lohoff, Mak<sup>77</sup>, 2005). A indução da expressão do IRF-1 é realizada tanto pelo Interferon do tipo I (IFN- $\alpha$ ) quanto pelo Interferon do tipo II (IFN- $\gamma$ ) que são mediados pelo fator de transcrição STAT-1 (Lohoff, Mak<sup>77</sup>, 2005; Pine et al.<sup>97</sup>, 1994; Prabhu et al.<sup>98</sup>, 1996).

IRFs desempenham um papel essencial na diferenciação de linfócitos Th1, tanto por modular as funções de células apresentadoras de antígenos quanto por ter efeito direto nas próprias células T auxiliares (*helper*). IRF-1 liga-se a elementos ativadores (*enhancers*) no promotor dos genes *IFNA* e *IFNG*. Seqüências de *enhancers* semelhantes foram encontradas no promotor de genes que são regulados por IFNs, com as seqüências *ISRE* e *GAS* (Lohoff, Mak<sup>77</sup>, 2005). No promotor do gene *IRF1* há seqüências funcionais *GAS* e NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) (Figura 1) (Harada et al.<sup>55</sup>, 1994). Sabe-se que IL-10 pode inibir a expressão de genes induzidos por IFNs por meio da inibição do complexo de transcrição (Issacs, Lindenman<sup>60</sup>, 1957). Porém em altas doses de IFN- $\alpha$  ou IFN- $\gamma$ , a ação inibitória de IL-10 é reduzida, mas isso estimula a expressão do gene *IRF1*. O IRF-1 é rapidamente induzido por IFN- $\gamma$  em monócitos, mas o mesmo não acontece quando o estímulo é realizado por IFN- $\alpha$  (Ito et al.<sup>61</sup>, 1999).

Até o momento não foi encontrada na literatura nenhuma pesquisa investigando expressão diferencial dos genes *IFNG* e *IFNA*,

seus receptores e outros genes dessa via de sinalização intracelular, em tecido gengival inflamado obtido de indivíduos com SD afetados pela DP. Desta forma, este trabalho poderá contribuir com valiosas informações sobre peculiaridades do sistema imune de indivíduos com SD, e também poderá ajudar a explicar a maior tendência à DP nos indivíduos com essa síndrome.



*Proposição*

### 3 Proposição

Investigar diferenças nos parâmetros clínicos periodontais e níveis de expressão dos genes *IFNG*, *IFNGR1*, *IFNGR2*, *IFNA*, *IFNAR1*, *IFNAR2*, *JAK1*, *STAT1* e *IRF1* em indivíduos com Síndrome de Down (SD) que apresentam ou não Doença Periodontal (DP).



## *Material e Método*

## 4 Material e Método

### 4.1 Delineamento do Estudo e Seleção da Casuística

Constituiu-se a casuística deste estudo o total de 80 indivíduos divididos nos seguintes grupos com 20 indivíduos cada:

- 1) Grupo Síndrome de Down com Doença Periodontal (SDcDP ou A)
- 2) Grupo Síndrome de Down sem Doença Periodontal (SDsDP ou B)
- 3) Grupo Controle (não-sindrômicos) com Doença Periodontal (CcDP ou C)
- 4) Grupo Controle (não-sindrômicos) sem Doença Periodontal (CsDP ou D)

Os indivíduos com SD e indivíduos não-sindrômicos selecionados foram de ambos os gêneros e qualquer etnia com idade entre 7 e 57 anos de idade.

Os indivíduos com SD foram selecionados na Clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP e na Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE) de Araraquara e região. Indivíduos não-sindrômicos foram selecionados nas Clínicas de Odontopediatria, Periodontia e Cirurgia da FOAr/UNESP. Todos os indivíduos selecionados para compor a casuística deste estudo tiveram seu histórico médico e odontológico avaliados.

Não foram incluídos no estudo, os indivíduos que se enquadraram em algum dos seguintes critérios:

- √ Indivíduos institucionalizados;
- √ Indivíduos com SD do tipo mosaico;
- √ Indivíduos com SD sem autorização do cardiologista para realização de procedimento odontológico mais invasivo (ex: exodontia, gengivectomia)
- √ Indivíduos com história de antibioticoterapia, uso de antiinflamatórios e/ ou de imunossupressores nos últimos 3 meses;
- √ Indivíduos com história de tratamento periodontal nos últimos 6 meses;
- √ Indivíduos com alteração sistêmica como diabetes ou alguma doença infecciosa.
- √ Indivíduos fumantes

Para participar do estudo, o indivíduo selecionado deveria apresentar uma área passível de coleta de tecido gengival, ou seja, deveria haver indicação clínica para realização de exodontia, gengivectomia ou outro procedimento clínico em que a coleta de um fragmento gengival não infringisse princípios éticos.

Após explicar os objetivos da pesquisa de maneira acessível aos indivíduos selecionados e seus responsáveis, e obter a colaboração dos mesmos, estes foram convidados a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) que foi aprovado pelo Comitê de Ética em



Pesquisa em Seres Humanos – CEP da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, protocolo n° 79/04 (Anexo I).

#### 4.2 Exame Clínico Periodontal

Cada sujeito participante desta pesquisa foi submetido a um exame periodontal realizado por meio de secagem prévia da região com jato de ar, e uso de uma sonda periodontal milimetrada tipo Williams, espelho plano e pinça clínica devidamente esterelizados.

Um examinador previamente treinado (LBC) realizou o exame periodontal em todos os pacientes, considerando todos os dentes presentes na cavidade bucal. Os parâmetros clínicos de profundidade de sondagem (PS) e nível de inserção (NI) foram examinados em seis sítios (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual e disto-lingual) de cada dente, além de sangramento à sondagem.

Os seguintes critérios clínicos periodontais<sup>75</sup> foram utilizados para classificar os indivíduos em:

- Grupo sem Doença Periodontal: indivíduos sem sinais clínicos de DP, tendo como características: ausência de sangramento à sondagem, PS e NI < 3mm.
- Grupo com Doença Periodontal: indivíduos com pelo menos 3 sítios não adjacentes apresentando sangramento à sondagem, PS e NI ≥ 3mm.

Os pacientes que apresentaram  $PS \geq 4\text{mm}$  em mais de 30% dos sítios, presença de sangramento à sondagem (SS) e  $NI \geq 3\text{mm}$ , foram caracterizados como portadores de DP crônica generalizada, enquanto os pacientes com menos de 30% dos sítios com  $PS \geq 4\text{mm}$ , presença de SS e  $NI \geq 3\text{mm}$ , como portador de DP crônica localizada. Os pacientes que não se enquadraram nas características de portadores de DP, foram enquadrados no grupo de pacientes sem DP<sup>5</sup>.

### 4.3 Análise da Expressão Genética

#### 4.3.1 Obtenção de tecido gengival

No caso de indivíduos (SD ou Controle) pertencentes aos grupos com DP foi coletado tecido gengival de área inflamada e do grupo sem DP o tecido gengival foi de área não inflamada.

Um pequeno fragmento de gengiva de aproximadamente 2 a 3 mm foi coletado durante o tratamento odontológico dos indivíduos selecionados e mergulhado imediatamente em Trizol gelado (Invitrogen, Auckland, Nova Zelândia) (1 ml/mg de tecido). O microtubo contendo o fragmento de gengiva em Trizol foi mantido em gelo até ser levado ao laboratório para ser armazenado no freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ <sup>41</sup>.

#### 4.3.2 Obtenção de RNA Humano

No momento de extrair o RNA do tecido gengival, o microtubo foi mantido em gelo para permitir o descongelamento do tecido

e do Trizol, o tecido foi macerado com pistilo de vidro no próprio microtubo com Trizol. Para cada 1 ml de Trizol foi acrescentado 0,2 ml de clorofórmio (J.T.Baker, Cidade do México, México) e após agitar em vortex por 15 segundos, o microtubo foi incubado por 5 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, foi centrifugado a 14.000 rpm a 4°C por 15 minutos. Após a centrifugação, o conteúdo do microtubo apresentou 3 fases: uma inferior rósea que contém o fenol/guanidina isotiocianato/clorofórmio; uma fase intermediária esbranquiçada e uma fase superior aquosa que contém o RNA. A fase aquosa foi transferida com micropipeta para um novo microtubo onde foi acrescentado 0,5 ml de isopropanol (Synth, Diadema, São Paulo) com o intuito de precipitar o RNA. A mistura no microtubo foi homogeneizada (levemente por inversão), incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugada a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação foi observado um *pellet* de RNA no fundo do microtubo com aparência branco-gelatinosa. Foi descartado o sobrenadante (isopropanol) de forma cuidadosa e acrescentado 1 ml de etanol 75% (Synth, Diadema, São Paulo). Após leve homogeneização do microtubo, este foi centrifugado a 7.500 rpm por 5 minutos a 4°C. Foi desprezado o sobrenadante (etanol) de forma cuidadosa e, com o microtubo aberto, foi permitido que resquícios de etanol evaporassem à temperatura ambiente, sem no entanto deixar o *pellet* secar completamente. O *pellet* de RNA foi

ressuspenso em 20 a 50  $\mu$ l de água ultrapura tratada com DEPC (BioAgency, São Paulo, São Paulo) e incubado a 55°C por 10 minutos.

Uma alíquota de RNA (2  $\mu$ l) foi dissolvida em 98  $\mu$ l de água-DEPC para realizar a quantificação do RNA em espectrofotômetro (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Germany). Também foi analisada a pureza do RNA de cada amostra, por meio da razão entre a absorbância a 260 nm (ácidos nucleicos) e 280 nm (proteínas), ou seja,  $A_{260/280}$ .

#### 4.3.3 Reações de Transcrição Reversa

Foi sintetizado o DNA complementar (cDNA) de todas as seqüências gênicas expressas no tecido gengival coletado por meio da transcrição reversa utilizando Oligo dT<sub>(20)</sub> e o kit *SuperScript III First-Strand Synthesis Super Mix* (Invitrogen, São Paulo, São Paulo).

Em um microtubo de 0,2 ml o volume de RNA correspondente à concentração de cerca de 350 ng foi acrescido de 1  $\mu$ l de Oligo dT, 1  $\mu$ l de *Annealing Buffer* e água-DEPC até o volume final de 8  $\mu$ l. A reação foi incubada a 65°C por 5 minutos. Em seguida, o microtubo foi mantido em gelo por 1 minuto, onde foi acrescentado 10  $\mu$ l do Mix da Reação *First-Strand* e 2  $\mu$ l do Mix das enzimas *SuperScript III/RNaseOUT*. A reação foi incubada a 50°C por 50 minutos, seguido por 85°C por 5 minutos. Assim foi obtido um volume final de 20  $\mu$ l de cDNA que ficou armazenado em freezer -80°C até sua utilização para as reações de amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase).

#### 4.3.4 Reações de PCR quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR)

As reações de PCR para amplificar o cDNA referente a cada gene a ser investigado foram realizadas utilizando um par de *primers* específico que foi desenhado com o programa *Primer Express 3* do termociclador SDS 7500 (Tabela 1) e o Kit Power Sybr® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, São Paulo, São Paulo) no aparelho Real Time PCR SDS 7500 (Applied Biosystems – obtido através do Projeto Multiusuários FINEP nº 5085/06).

A investigação da expressão genética foi realizada por meio da quantificação relativa pelo método de comparação de  $C_T$  (*Threshold cycle*) de cada gene alvo de investigação com o gene constitutivo  $\beta$ -actina como normalizador (controle endógeno) da reação. As reações de PCR foram realizadas em microplacas de maneira a amplificar em um poço um gene de cada vez, ou seja, foi realizado o método *singleplex*, em que se amplifica em um poço ou o gene alvo ou o gene da  $\beta$ -actina de acordo com a utilização dos primers específicos.

As reações de amplificação e detecção da expressão gênica foram realizadas por PCR em Tempo Real utilizando o sistema SYBR Green, por meio da fluorescência que é emitida quando o SYBR está intercalado à fita dupla de DNA recém-formada. A quantificação da expressão do gene alvo, objetivo desta pesquisa, é relativa à expressão do gene constitutivo, neste caso, o gene da  $\beta$ -actina. Em cada microplaca incluiu-se uma amostra de cada um dos quatro grupos investigadas neste

estudo (em duplicata) para cada um dos genes *IFNG*, *IFNGR1*, *IFNGR2*, *IFNA*, *IFNAR1*, *IFNAR2*, *JAK1*, *STAT1*, *IRF1* e *ACTB* ( $\beta$ -actina). Além disso, houve na placa o controle positivo da reação de amplificação e o controle negativo (água ao invés de cDNA).

As condições de reação de PCR para cada gene de interesse foram otimizadas com relação à concentração de *primers*, ausência da formação de dímeros (*primer-dimer*) e eficiência de amplificação do gene alvo. Inicialmente foi necessário verificar qual a concentração ideal de cada par de primers que será utilizado nas reações de qRT-PCR. Foram testadas as concentrações de 100, 300 e 500 nM. Em seguida, foi necessário determinar a eficiência de amplificação de cada gene. Para isso foi realizada a titulação de uma amostra de cDNA de tecido gengival nas seguintes concentrações: 50, 10, 2, 0,2 e 0,05 ng.

Tabela 1: *Primers* específicos para cada gene

Gene Alvo	Número de Acesso	Primer		Produto do Amplicon	Tm (°C)
		Tipo	Sequencia		
<i>β-Actina</i>	NM_001101.3	F	5' AAGCCACCCCACTTCTCTCTAA 3'	88	58
		R	5' AATTTACACGAAAGCAATGCTATCA 3'		
<i>IFNA</i>	NM_000619	F	5' GAAACGAGATGACTTCGAAAAGC 3'	113	58
		R	5' GCTGCTGGCGACAGTTCA 3'		
<i>IFNGR1</i>	NM_000416	F	5' GGTCTGTGAAGAGCCGTTGTC 3'	142	58
		R	5' CGGGACCACGTCAGGAATAT 3'		
<i>IFNGR2</i>	NM_005534	F	5' GGAAAAGGAGCAAGAAGATGTTCT 3'	93	58
		R	5' AGCTCCGATGGCTTGATCTC 3'		
<i>IFNA*</i>	NM_002169	F	5' GAAGAATCTCTCCTTTCTCCTGCC 3'	110	59
		R	5' ATGGAGGACAGAGATGGCTTG 3'		
<i>IFNAR1</i>	NM_000629	F	5' CACTTCTTCATGGTATGAGGTTGACT 3'	96	59
		R	5' ATTGCCTTATCTTCAGCTTCTAAATGT 3'		
<i>IFNAR2</i>	NM_207584	F	5' TCATATGATTGCGCTGATTACACA 3'	108	58
		R	5' TGGTACAATGGAGTGGTTTTTTAATT 3'		
<i>JAK1</i>	NM_002227	F	5' GTCACAACCTCTTTGCCCTGTAT 3'	91	58
		R	5' CGGAGGGACATCTTGTCATCA 3'		
<i>STAT1</i>	NM_139266	F	5' GTGTTATGGGACCGCACCTT 3'	107	58
		R	5' AAGACCAGCGGCCTCTGA 3'		
<i>IRF1</i>	NM_002198	F	5' GCATGGCTGGGACATCAAC 3'	97	58
		R	5' CTTGGGATCTGGCTCCTTTTC 3'		

\* Löseke et al., 2003<sup>78</sup>

A ciclagem térmica aplicada foi: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, e quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C. Um ciclo final com temperatura crescente de 60 a 95°C (2°C/min) teve a fluorescência do produto da PCR medida a cada 15 segundos e esses dados foram empregados para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação. Os resultados foram analisados com base no valor de  $C_T$ , que foi definido após o término da reação.

Para realizar as reações de qPCR de toda a casuística foram necessárias 20 microplacas. Ao final, foi necessário analisar os resultados de todas elas em conjunto. Para isso foi utilizado o programa *Microsoft Excell* (versão 2000) contendo os cálculos estatísticos (algoritmos) iguais aos presentes no programa *Relative Quantification (ddCt) Study* do termociclador em Tempo Real da *Applied Biosystems*, o SDS 7500, versão 1.3. De forma simplificada, a análise consistiu em, após normalizar os resultados, ou seja, descontar o  $C_T$  obtido do gene constitutivo do  $C_T$  de cada gene alvo de cada amostra ( $\Delta C_t$ ), foram realizadas comparações dos resultados entre os diferentes grupos ( $\Delta\Delta C_t$ ), pois a quantificação é relativa. O valor final da análise foi obtido da equação:  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .



#### 4.4 Metodologia Estatística

Os dados obtidos das variáveis tais como idade, gênero, parâmetros clínicos e expressão dos genes: *IFNG*, *IFNGR1*, *IFNGR2*, *IFNA*, *IFNAR1*, *IFNAR2*, *JAK1*, *STAT1* e *IRF1* foram avaliados quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilks) e homogeneidade (teste de Bartlett). Por não apresentarem aderência à curva de normalidade e nem serem homogêneos, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis associado ao método de Student-Newman-Keuls, por meio do programa BioEstat v.5.0 (UFPA, MCT,CNPq, Belém, PA, Brasil). Para identificar e/ou confirmar diferenças dos parâmetros clínicos e na expressão genética entre os grupos foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney (comparações 2 a 2).

Toda análise estatística foi realizada considerando um nível de 5% de significância ( $\alpha = 0,05$ ).



*Resultado*

## 5 Resultado

### 5.1 Características demográficas e clínicas da casuística

Os indivíduos incluídos neste estudo foram classificados quanto à presença ou ausência da SD e DP e subdivididos em quatro grupos. Características como gênero e parâmetros clínicos periodontais são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Casuística subdividida nos diferentes grupos especificada por gênero e índices clínicos periodontais

	Grupo			
	A (SDcDP) n=20	B (SDsDP) n=20	C (CcDP) n=20	D (CsDP) n=20
Gênero (M/F)	14/6	7/13	9/11	10/10
Nº dentes	23.00 (14-32)	24.00 (17-28)	24.50 (10-36)	27.00 (18-31)
Nº sítios	138.00 (90-192)	144.00 (102-168)	147.00 (60-192)	162.00 (108-186)
SS (%)	53.70 (25-100) <sup>a</sup>	5.00 (2-11) <sup>b</sup>	49.00 (24-100) <sup>a</sup>	5.00 (0-11) <sup>c</sup>
PS=1-2mm (%)	56.00 (33-71) <sup>a</sup>	93.00 (74-96) <sup>b</sup>	55.50 (22-61) <sup>a</sup>	90.00 (70-97) <sup>b</sup>
PS≥3mm (%)	43.00 (10-40) <sup>a</sup>	12.50 (4-19) <sup>b</sup>	45.50 (22-76) <sup>a</sup>	12.00(6-22) <sup>b</sup>
PS	2.30 (1-4) <sup>a</sup>	1.30 (0.8-1.7) <sup>b</sup>	8.70 (2-9) <sup>c</sup>	1.00 (1-1.4) <sup>b</sup>
NI=1-2mm (%)	56.00 (30-64) <sup>a</sup>	91.50 (74-96) <sup>b</sup>	45.00 (22-55) <sup>a</sup>	90.00 (70-97) <sup>b</sup>
NI ≥ 3mm (%)	52.50 (9-47) <sup>a</sup>	13.00 (4-15) <sup>b</sup>	57.50 (4-76) <sup>a</sup>	12.00 (6-22) <sup>b</sup>
NI	2.30 (1-5) <sup>a</sup>	1.30 (0.8-1.7) <sup>b</sup>	8.70 (3-9) <sup>c</sup>	1.00 (1-1.4) <sup>b</sup>

Mediana (mínimo-máximo). a, b, c... Letras diferentes nas linhas significam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (teste de Mann-Whitney)

Pelo fato das características presentes na Tabela 2 não terem se mostrado normais nem homogêneas, são apresentadas a mediana, o valor mínimo e máximo para cada uma delas, e as diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis complementado com Mann-Whitney. Considerando os quatro grupos, a porcentagem de indivíduos do gênero masculino (52,5%) foi

maior que a do gênero feminino (47,5%), sem diferença estatisticamente entre os grupos. A faixa etária dos indivíduos com SD incluídos neste estudo foi de 7 a 48 anos. Sendo um estudo transversal, essa amplitude é justificável pelo desenho experimental que incluiu dois grupos de indivíduos com SD de Araraquara e região (SDcDP [A] e SDsDP [B]). Entre os grupos com DP, a mediana para a idade no grupo C (CcDP) foi de 39,5 anos, e em comparação ao grupo A (SDcDP) (31 anos) não mostrou diferença estatisticamente significativa. Por outro lado, entre os grupos sem DP, a mediana para idade para o grupo B (SDsDP) foi de 13 anos o que diferiu estatisticamente do grupo D (CsDP) que foi de 23 anos de idade. Apesar de ter sido considerada a mediana para a análise estatística da idade entre os grupos, vale informar que a média de idade obtida para cada grupo foi A (SDcDP=32,2 anos), B (SDsDP= 14,2 anos), C (CcDP= 39,3 anos) e D (CsDP= 22,92 anos).

Para o índice sangramento à sondagem (SS) podemos observar na Tabela 2 que não houve diferença entre o grupo A (SDcDP) que foi de 53,70%, e o grupo C (CcDP) que foi de 49%. Os grupos B (SDsDP) e D (CsDP) apesar de terem apresentado mediana de 5%, após análise estatística, pode-se observar diferença significativa entre eles ( $p < 0,0001$ ). Também houve diferença desse índice entre os grupos A (SDcDP) e B (SDsDP), A (SDcDP) e D (CsDP), B (SDsDP) e C (CcDP), e C (CcDP) e D (CsDP).

A porcentagem PS=1-2mm foi similar entre os grupos A (56%) e C (55,50%), sendo que estes apresentaram resultados estatisticamente menores que os grupos B (93%) e D (90%) ( $p < 0,0001$ ). Os grupos B e D apresentaram resultados similares entre si. Assim, indivíduos com SD ou Controle mostraram níveis idênticos de PS=1-2mm quando apresentaram DP (A e C) e quando não apresentam DP (B e D).

Os grupos com DP (SDcDP [A] e CcDP [C]) apresentaram PS $\geq$ 3mm de 43% e 45,50%, respectivamente, sendo estatisticamente maiores que os outros grupos SDsDP (B) e CsDP (D), os quais apresentaram porcentagem de PS $\geq$ 3mm de 12,50% e 12%, respectivamente. Pode-se assim confirmar que os grupos com DP (A e C), independente da presença da SD têm índices maiores e estatisticamente diferentes em relação aos grupos sem DP (B e D) ( $p < 0,0006$ ).

A PS para o grupo A (SDcDP) apresentou a mediana de 2,3mm com uma diferença significativa estatisticamente maior comparando-se aos grupos B (SDsDP) (PS=1,3mm;  $p = 0,0008$ ) e D (CsDP) (PS=1,0mm;  $p < 0,0001$ ). O grupo C (CcDP) apresentou PS de 8,7mm que se mostrou estatisticamente maior que todos os grupos como o grupo A (SDcDP) ( $p = 0,0268$ ), B (SDsDP) e D (CsDP) ( $p < 0,0001$ ).

A porcentagem nível de inserção (NI)=1-2mm entre os grupos A e C foi similar, sendo respectivamente, 56% e 45%. Os grupos B

(91,50%) e D (90%) apresentaram porcentagem de NI similares entre si, e estatisticamente maiores que os grupos A e C ( $p < 0,0006$ ).

Para o  $NI \geq 3\text{mm}$ , o grupo A (SDcDP) foi de 52,50%, grupo C (CcDP) foi de 57,50%, SDsDP (B) foi de 13% e CsDP (D) foi de 12%. Semelhantemente ao observado para  $PS \geq 4\text{mm}$ , pode-se assim confirmar que os grupos com DP (A e C), independente SD, têm índices maiores e estatisticamente diferente em relação aos grupos sem DP (B e D) ( $p < 0,05$ ).

O NI para o grupo A (SDcDP) apresentou mediana de 2,3mm com uma diferença significamente maior em comparação aos grupos B (SDsDP) ( $NI = 1,3\text{mm}$ ;  $p = 0,0003$ ), e D (CsDP) ( $NI = 1,0\text{mm}$ ;  $p < 0,0001$ ). No grupo C (CcDP) o índice obtido foi de 8,7mm que se mostrou estatisticamente diferente de todos os grupos como o grupo A (SDcDP) ( $p = 0,0427$ ), e os grupos B (SDsDP) e D (CsDP) ( $p < 0,0001$ ).

Na intenção de averiguar qual o tipo de DP (localizada ou generalizada) que os indivíduos apresentavam, os pacientes com DP foram subdivididos de acordo com suas características clínicas periodontais conforme apresentado na Tabela 3.

**Tabela 3:** Distribuição dos parâmetros clínicos periodontais de acordo com o tipo de DP

	Grupo			
	A (SDcDP)		C (CcDP)	
	localizada n=14	generalizada n=6	localizada n=12	generalizada n=8
Idade	30,50(15-36) <sup>a</sup>	36,50(27-48) <sup>a,b</sup>	55(27-69) <sup>b</sup>	41(28-48) <sup>b</sup>
Ant NI $\geq$ 4mm (%)	2,50 (1-5) <sup>a</sup>	24 (15-25) <sup>b</sup>	4 (4-16) <sup>a,c</sup>	14 (11-26) <sup>b,c</sup>
Post NI $\geq$ 4mm (%)	13 (6-31) <sup>a</sup>	28 (18-40) <sup>b</sup>	17 (11-30) <sup>a</sup>	30,50 (10-39) <sup>b</sup>
Ant PS $\geq$ 4mm	4 (1-4) <sup>a</sup>	19,50 (11-24) <sup>b</sup>	4 (4-17) <sup>a,c</sup>	11 (10-27) <sup>b,c</sup>
Post PS $\geq$ 4mm	8 (3-20) <sup>a</sup>	20 (10-34) <sup>b</sup>	15,50 (3-23) <sup>a,b</sup>	19 (10-29) <sup>b</sup>
%dentes ant ausentes	25 (8,3-33) <sup>a</sup>	25 (17-58) <sup>a</sup>	25 (17-33) <sup>a</sup>	42(17-50) <sup>a</sup>
%dentes post ausentes	37,50 (12-50) <sup>a</sup>	56,25 (50-69) <sup>a</sup>	37,50 (25-62) <sup>a</sup>	50 (37-88) <sup>a</sup>

Mediana (mínimo-máximo). a, b, c... Letras diferentes, nas linhas, significam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (teste de Mann-Whitney). Ant= anterior. Post= posterior.

Nota-se maior freqüência da DP do tipo localizada tanto para indivíduos com SD quanto para indivíduos cromossomicamente normais.

De acordo com o tipo de DP, pode-se observar quanto à mediana de idade, que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos SDcDP do tipo localizada e generalizada. No entanto, houve diferença estatística para o grupo SDcDP do tipo localizada comparando com os dos grupos CcDP dos tipos localizada e generalizada.

Quanto a porcentagem de sítios da região anterior com NI $\geq$ 4mm, houve diferença estatística para o grupo SDcDP do tipo localizada comparando-se aos grupos SDcDP e CcDP do tipo generalizada, mas não para o grupo CcDP do tipo localizada.

Para a região posterior, as porcentagens  $NI \geq 4\text{mm}$  parecem ser mais elevadas do que na região anterior. Não houve diferença estatística para os grupos A e C do tipo localizada.

A porcentagem de  $PS \geq 4\text{mm}$  na região anterior foi estatisticamente semelhante à porcentagem de  $NI \geq 4\text{mm}$  na região anterior.

Para a região posterior com  $PS \geq 4\text{mm}$ , o grupo A do tipo localizada foi diferente estatisticamente dos grupos A do tipo generalizada e C do tipo generalizada, porém não houve diferença estatística do grupo C do tipo localizada em comparação aos grupos A do tipo localizada e generalizada, e C do tipo generalizada.

Pode-se observar que não houve diferença estatística para os grupos A e C tanto para o tipo localizada quanto generalizada em relação à porcentagem de dentes ausentes na região anterior e na região posterior.

A periodontite crônica localizada foi o tipo prevalente tanto entre indivíduos com SD como Controle. Considerando os parâmetros clínicos, não foram encontradas diferenças na periodontite crônica localizada entre os indivíduos com SD e Controle, assim como para a periodontite crônica generalizada.



## 5.2 Obtenção do RNA e padronização do RT-qPCR

De cada indivíduo selecionado para este estudo foi coletado um fragmento de gengiva de cerca de 2 mm de diâmetro. A partir desse material foi realizada a extração de RNA total seguida de leitura em espectrofotômetro da concentração de RNA total em ng/ $\mu$ l. Observou-se que o rendimento médio de RNA total foi de 43,07 ng por mg de tecido gengival, com pureza média de 1,88.

Na padronização de cada par de *primers* utilizado neste estudo obtiveram-se curvas de dissociação com somente um pico indicando a amplificação específica do respectivo gene alvo (Figuras 2 e 3).

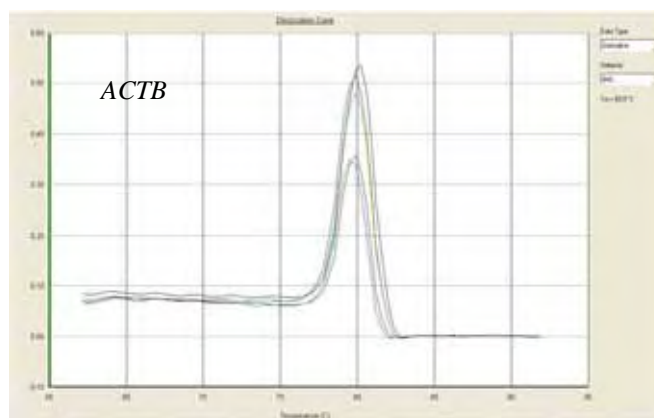


FIGURA 2 Curvas de dissociação do gene constitutivo *ACTB* ( $\beta$ -actina) mostrando um único pico referente ao  $T_m$  do respectivo amplicon, o que comprova a especificidade do par de *primers*.

Constatou-se que a concentração ideal dos primers foi de 500 nM e que a concentração de 10 ng de cDNA era a ideal para ser utilizada nas reações de qPCR, mediante a observação das curvas de eficiência (Figura 4). As eficiências de amplificação obtidas foram: 94%

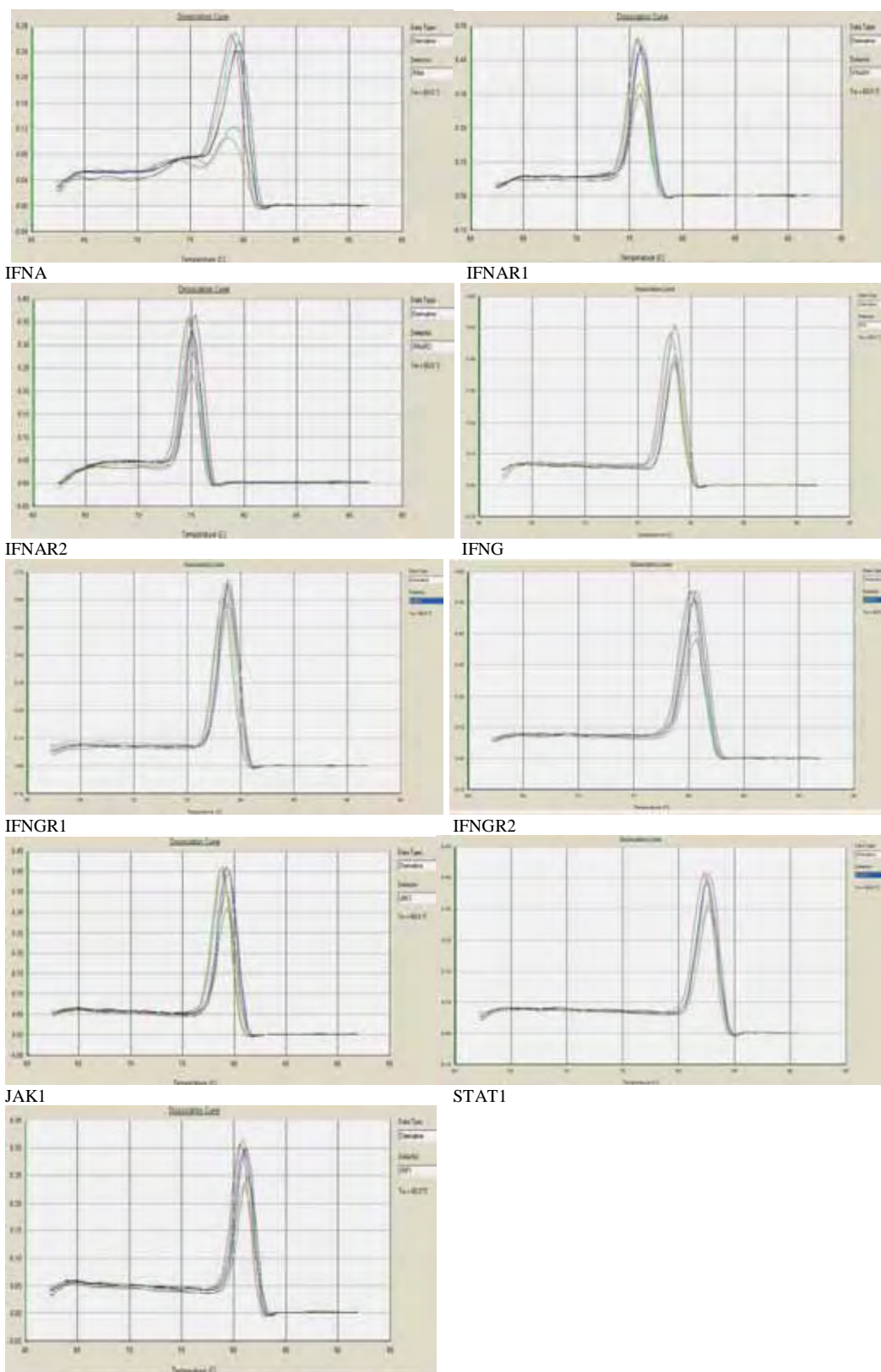
(gene *IRF1*), 97% (gene *IFNGR2*), 99% (genes *IFNG*, *IFNGR1*, *STAT1*, *JAK1*, *IFNAR2*), 100% (gene *IFNA*) e 103% (gene *IFNAR1*), permitindo a utilização da equação:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para análise dos resultados da expressão gênica nas amostras de gengiva dos pacientes.

### 5.3 Análise da expressão gênica

Para análise da expressão gênica pelo método de comparação de  $C_T$ , após a normalização dos resultados (descontar o  $C_T$  obtido do gene constitutivo do  $C_T$  de cada gene alvo de cada amostra) onde se obteve o  $\Delta Ct$ , foram realizadas comparações dos resultados entre os diferentes grupos (pois a quantificação é relativa), gerando o  $\Delta\Delta Ct$ . Por exemplo: Para saber a expressão do gene *IFNG* no grupo SDcDP ( $\Delta Ct=13,2$ ) em relação ao grupo SDsDP ( $\Delta Ct=11,8$ ), foi realizado o cálculo:

$$\Delta\Delta Ct (\text{SDcDP} - \text{SDsDP}) = 13,2 - 11,8$$

$$\Delta\Delta Ct (\text{SDcDP} - \text{SDsDP}) = 1,4$$



IRF1  
 FIGURA 3 Curvas de dissociação dos genes alvo mostrando um único pico referente ao Tm do respectivo amplicon, o que comprova a especificidade de cada par de *primers*.

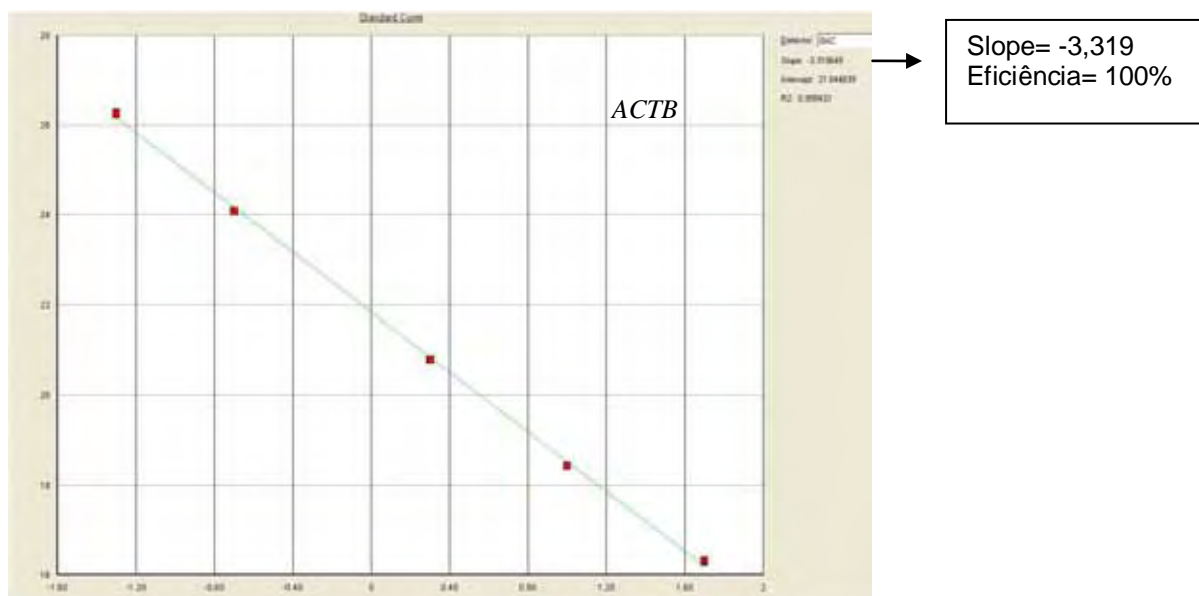


FIGURA 4 Curva padrão para verificação da eficiência de amplificação por PCR em Tempo Real utilizando o par de oligonucleotídeos do gene constitutivo *ACTB* ( $\beta$ -actina) e diferentes quantidades de cDNA (50, 10, 2, 0,2, 0,05 ng). A eficiência de amplificação é determinada pela função:  $Efic = 10^{(-1/slope)} - 1$ .

Nesse exemplo, o grupo SDsDP é chamado de calibrador, pois a expressão será relativa à obtida nesse grupo. No presente estudo, houve a possibilidade de determinarem-se calibradores diferentes dependendo da forma de se avaliar os dados. Isso foi feito como apresentado a seguir:

- a) Grupo A-B (SDcDP-SDsDP): neste grupo foi avaliado se a DP faz diferença na expressão gênica de indivíduos que apresentam SD;
- b) Grupo C-D (CcDP-CsDP): foi avaliado se a DP faz diferença na expressão gênica de indivíduos não-sindrômicos (pertencentes ao grupo Controle);

- c) Grupo A+B-C+D [(SDcDP+SDsDP)-(CcDP+CsDP)]: foi avaliado se a SD faz diferença na expressão gênica em comparação a indivíduos cromossomicamente normais, independente da presença de DP;
- d) Grupo A+C-B+D [(SDcDP+CcDP)-(SDsDP+CsDP)]: foi avaliado se a presença da DP faz diferença na expressão gênica dos indivíduos, independente de serem portadores ou não da SD.

Com os valores obtidos de  $\Delta\Delta Ct$  calculou-se a expressão relativa por meio da equação:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Seguindo o exemplo anterior onde  $\Delta\Delta Ct$  (SDcDP – SDsDP) = 1,4, a expressão relativa será:  $2^{-(1,4)} = 2^{-1,4} = 0,40$ . Isso significa que em relação ao calibrador (SDsDP) que é considerado como valor inteiro =1, indivíduos SDcDP expressam 2,5 vezes menos *IFNG* ( $1 \div 0,4 = 2,5$ ). Alternativamente, convencionando-se o calibrador com uma expressão de *IFNG* de 100%, o grupo SDcDP tem uma subexpressão de 60% em relação ao calibrador. Esse valor de 0,40 é chamado de RQ (*relative quantification*), e é o valor médio ponderado obtido para o grupo, levando-se em consideração o número de placas envolvido no estudo e a variabilidade estatística entre placas do mesmo grupo (teste t de Student) de acordo com os algoritmos do *RQ Study*<sup>6</sup>. Para cada valor de RQ obteve-se também o valor de RQ mínimo e RQ máximo, indicando os valores extremos de expressão relativa identificados em cada grupo.

### 5.3.1 Análise da expressão do gene *IFNG* (Figura 5A):

Analisando-se a expressão desse gene no grupo A em comparação ao grupo B (calibrador), ou seja, A-B pode-se observar uma subexpressão de 60%.

A expressão desse gene para os indivíduos cromossomicamente normais com DP (grupo C) foi uma superexpressão de 7% em relação à indivíduos cromossomicamente normais sem DP (grupo D), ou seja, C-D.

Independente da DP, a expressão gênica nos pacientes síndrômicos (grupos A+B) foi uma superexpressão de 23% em relação à indivíduos não-síndrômicos (grupos C+D). Independente da presença de SD, indivíduos com DP tem uma subexpressão de 14% (grupos A+C) em relação aos indivíduos sem DP (grupos B+D).

### 5.3.2 Análise da expressão do gene *IFNGR1* (Figura 5B):

A expressão gênica do receptor 1 do IFN- $\gamma$  para os grupos A-B foi uma subexpressão de 71%.

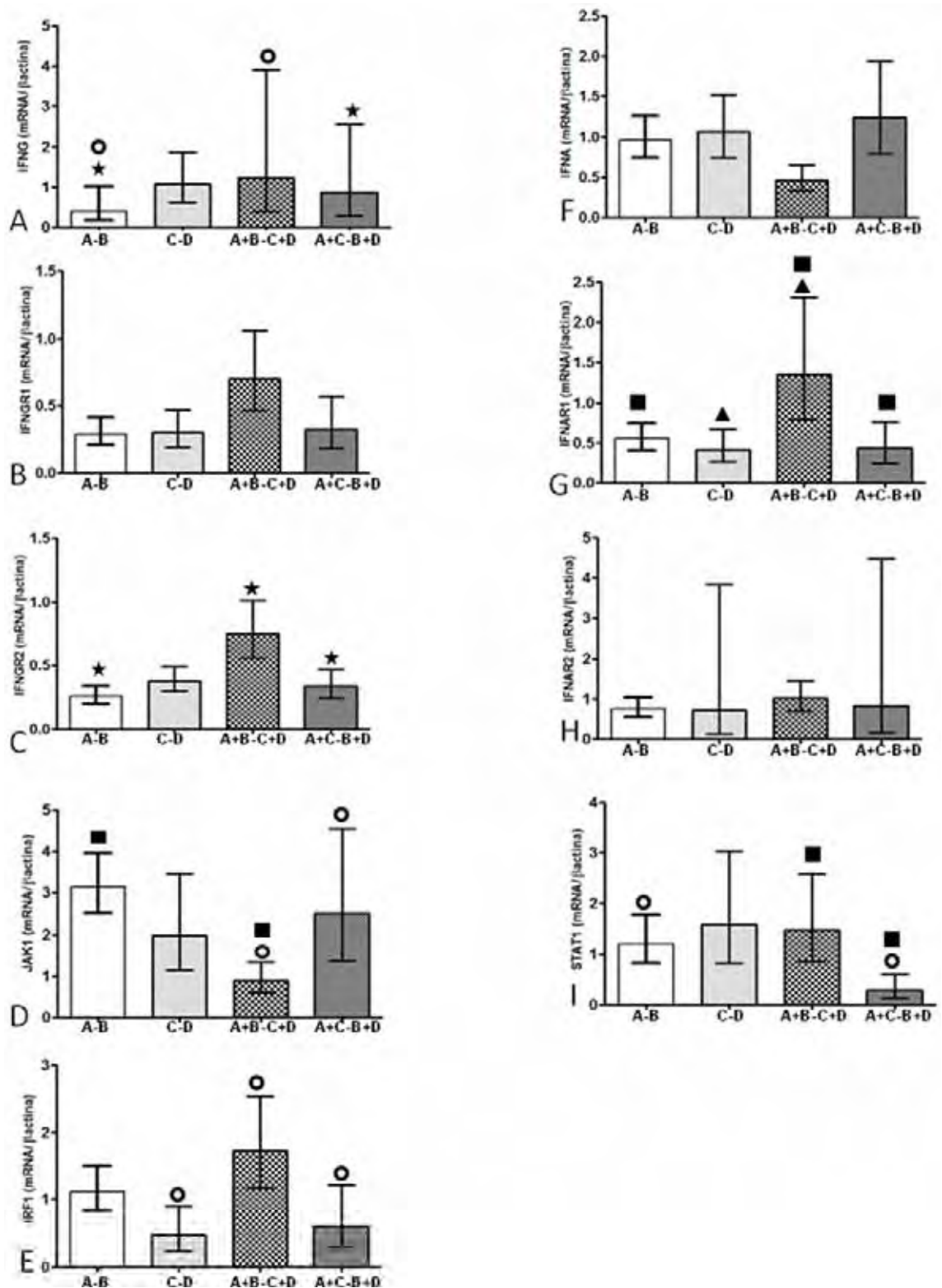


FIGURA 5 Expressão dos genes *IFNG*, *IFNGR1*, *IFNGR2*, *JAK1*, *IFNA*, *IFNAR1*, *IFNAR2*, *STAT1* e *IRF1* obtidas das comparações com os diferentes calibradores. Diferenças na expressão de cada gene entre as diferentes comparações foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis (★ $p < 0,05$ ; ○ $p < 0,02$ ; ▲ $p < 0,005$  e ■ $p < 0,0005$ ) Colunas: RQ. Barras: RQ máximo e RQ mínimo

Para o grupo controle com DP (grupo C), a expressão foi de 70% subexpresso em relação ao grupo controle sem DP (grupo D).

Independente da presença de DP, no grupo síndrômico (A+B) a expressão do gene foi de 30% subexpresso em relação ao calibrador que neste caso é o grupo controle (grupo C+D). No grupo com DP independente da presença de SD (grupo A+C) a subexpressão foi de 68% em relação ao grupo sem DP (grupo B+D).

### 5.3.3 Análise da expressão do gene *IFNGR2* (Figura 5C):

A expressão do gene *IFNGR2* para o grupo síndrômico com DP (grupo A) em relação ao grupo síndrômico sem DP (grupo B) foi de uma subexpressão de 74%.

Para o grupo controle com DP (grupo C), houve uma subexpressão de 62% em relação ao grupo controle sem DP (grupo D).

A expressão gênica para o grupo A+B (grupo síndrômico) em relação ao grupo C+D (grupo não-síndrômico) foi de uma subexpressão de 25%. Para o grupo com DP independente da SD (grupo A+C), a expressão gênica é de 66% subexpresso em relação ao grupo sem DP independente da SD.



#### 5.3.4 Análise da expressão do gene *IFNA* (Figura 5F):

Para o *IFNA* pode-se observar que a expressão gênica das comparações dos grupos foi: A-B (4% subexpresso), C-D (6% superexpresso), A+B-C+D (56% subexpresso) e A+C-B+D (24% superexpresso). O que se pode notar é que o IFN- $\alpha$  nos pacientes síndrômicos (A+B), a expressão gênica foi subexpressa em relação aos pacientes cromossomicamente normais (C+D).

#### 5.3.5 Análise da expressão do gene *IFNAR1* (Figura 5G):

Para o *IFNAR1* que está localizado no cromossomo 21 pode-se observar que a expressão do gene do grupo síndrômico com DP (grupo A) foi 45% subexpresso em relação ao grupo síndrômico sem DP (grupo B). A expressão gênica para o grupo controle com DP foi uma subexpressão de 49% em relação ao grupo controle sem DP (grupo D).

Para o grupo síndrômico (A+B), a expressão do gene foi 35% superexpresso em relação ao grupo controle (C+D).

A expressão gênica do grupo com DP independente da SD (A+C) foi uma subexpressão de 57% em relação ao grupo periodontalmente saudável (B+D).

#### 5.3.6 Análise da expressão do gene *IFNAR2* (Figura 5H):

A expressão gênica do grupo A (com SD com DP) foi uma subexpressão de 25% em relação ao grupo B (com SD sem DP). Para o

grupo C (controle com DP) foi uma subexpressão de 28% em relação ao grupo D (controle sem DP).

Para o grupo sindrômico (A+B), a expressão do gene foi de 1% de superexpressão em relação ao grupo controle (C+D). Quando a expressão gênica dos grupos com DP (A+C) foi comparado à dos grupos sem DP (B+D) pode-se observar uma subexpressão de 18%.

#### 5.3.7 Análise da expressão do gene *JAK1* (Figura 5D):

Para a via de sinalização JAK/STAT, com relação à expressão de *JAK1*, observou-se que a expressão gênica para os grupos comparados foram de: A-B (214% superexpresso), C-D (98% superexpresso), A+B-C+D (11% subexpresso) e A+C-B+D (150% superexpresso). Observou-se uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0.0005$ ) nos níveis de expressão de *JAK1* entre A-B e A+B-C+D (Figura 5D).

#### 5.3.8 Análise da expressão do gene *STAT1* (Figura 5I):

A expressão do gene *STAT1* nos grupos comparados foi de A-B (24% superexpresso), C-D (58% superexpresso), A+B-C+D (48% superexpresso) e A+C-B+D (72% subexpresso).

### 5.3.9 Análise da expressão do gene *IRF1* (Figura 5E):

A modulação da via de sinalização dos interferons é realizada pelo *IRF1*, cuja expressão observada foi: grupo A-B (12% superexpresso), C-D (53% subexpresso), A+B-C+D (72% superexpresso) e A+C-B+D (40% subexpresso).

### 5.4 Comparação da expressão de diferentes genes em cada análise utilizando diferentes calibradores

Para verificar se existiam diferenças estatisticamente significantes da expressão entre os diferentes genes do grupo SDcDP em relação ao grupo SDsDP, ou seja, comparação A-B, submeteram-se os valores obtidos de RQ (quantificação relativa =  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Obtiveram-se os seguintes resultados (Quadro 1):

**Quadro 1:** Significância das diferenças de expressão (valores RQ) entre os diferentes genes na análise SDcDP (A) em relação a SDsDP (B).

Genes	IFNG	IFNGR1	IFNGR2	IFNA	IFNAR1	IFNAR2	IRF1	STAT1	JAK1
IFNG	-	P=0,8323	P=0,5476	P= 0,1167	P=0,6105	P= 0,1850	P= 0,0699	P=0,4861	<b>P= 0,0002</b>
IFNGR1		-	P=0,6968	P= 0,0679	P=0,5792	P= 0,1636	<b>P= 0,0248</b>	P= 0,0,6278	<b>P&lt;0,00001</b>
IFNGR2			-	<b>P= 0,036</b>	P= 0,1895	P= 0,072	<b>P= 0,0102</b>	P= 0,9242	<b>P&lt;0,0001</b>
IFNA				-	P= 0,1806	P=0,5818	P= 0,8744	<b>P= 0,0239</b>	<b>P= 0,0407</b>
IFNAR1					-	P= 0,4094	P= 0,1046	P= 0,072	<b>P&lt;0,0001</b>
IFNAR2						-	P= 0,4989	P= 0,0565	<b>P= 0,0012</b>
IRF1							-	<b>P= 0,0128</b>	P= 0,1051
STAT1								-	<b>P&lt;0,0001</b>
JAK1									-

p>0,05 – não significativo. Em negrito estão os valores estatisticamente significantes (teste de Mann-Whitney)

Nota-se que para a comparação A-B, os níveis de expressão gênica dos receptores 1 e 2 do *IFNG* são estatisticamente diferentes de *IRF1* e *JAK1*. Para *IFNG* e *IFNA*, *JAK1* está significativamente diferente, assim como há diferença entre *IFNA* e *STAT1*. Para os receptores 1 e 2 do *IFNA*, a expressão de *JAK1* se mostrou estatisticamente diferente. Também se encontrou diferença na expressão entre *IRF1* e *STAT1* e entre *JAK1* e *STAT1*.

De forma semelhante, as diferenças encontradas dos níveis de expressão entre os genes para a comparação C-D são apresentadas no Quadro 2.

**Quadro 2** Significância das diferenças de expressão (valores RQ) entre os diferentes genes na análise CcDP (C) em relação a CsDP (D)

Genes	IFNG	IFNGR1	IFNGR2	IFNA	IFNAR1	IFNAR2	IRF1	STAT1	JAK1
IFNG	-	<b>P= 0,0287</b>	P= 0,1018	P= 0,8362	P= 0,0882	P=0,5266	P= 0,2015	P= 0,2931	P= 0,3526
IFNGR1		-	P= 0,5726	P= 0,0706	P= 0,5218	P= 0,2025	P= 0,3705	<b>P= 0,0034</b>	<b>P= 0,001</b>
IFNGR2			-	P= 0,163	P=0,9391	P= 0,3892	P= 0,7193	<b>P= 0,0109</b>	<b>P= 0,004</b>
IFNA				-	P= 0,1965	P=0,6698	P= 0,2704	P= 0,3768	P= 0,3073
IFNAR1					-	P= 0,3987	P= 0,7771	<b>P=0,0161</b>	<b>P= 0,0073</b>
IFNAR2						-	P= 0,529	P= 0,1276	P= 0,1655
IRF1							-	<b>P= 0,0459</b>	<b>P= 0,0271</b>
STAT1								-	P=0,9699
JAK1									-

p>0,05 – não significativo. Em negrito estão os valores estatisticamente significantes (teste de Mann-Whitney)

Pode-se observar que o nível de expressão do *IFNGR1* é estatisticamente diferente de *IFNG*, *STAT1* e *JAK1*. Pode-se também observar diferença estatística para *STAT1* e *JAK1* entre os genes *IFNGR2*, *IFNAR1* e *IRF1*.

As diferenças dos níveis de expressão entre os genes para a comparação A+B-C+D são apresentadas no Quadro 3.

**Quadro 3** Significância das diferenças de expressão (valores RQ) entre os diferentes genes na análise SDcDP + SDsDP (A+B) em relação a CcDP + CsDP (C+D)

Genes	IFNG	IFNGR1	IFNGR2	IFNA	IFNAR1	IFNAR2	IRF1	STAT1	JAK1
IFNG	-	P= 0,0884	P= 0,2793	<b>P= 0,0398</b>	P=0,6545	P= 0,6284	P= 0,2559	P= 0,4408	P= 0,2036
IFNGR1		-	P= 0,6555	P= 0,6921	<b>P= 0,0193</b>	P= 0,1333	<b>P= 0,0098</b>	<b>P=0,0398</b>	P=0,6479
IFNGR2			-	P= 0,525	P= 0,1298	P= 0,3577	<b>P=0,0294</b>	P= 0,0764	P= 0,9915
IFNA				-	<b>P=0,0074</b>	P= 0,0742	<b>P=0,0047</b>	<b>P=0,0084</b>	P=0,2184
IFNAR1					-	P= 0,1636	P= 0,553	P=0,6921	<b>P= 0,0385</b>
IFNAR2						-	P= 0,1017	P= 0,1167	P= 0,3648
IRF1							-	P=0,8436	<b>P= 0,0138</b>
STAT1								-	<b>P= 0,0411</b>
JAK1									-

p>0,05 – não significativo. Em negrito estão os valores estatisticamente significantes (teste de Mann-Whitney)

No Quadro 3, nota-se que a expressão do gene *IFNGR1* é estatisticamente diferente dos genes *IFNAR1*, *IRF1* e *STAT1*. Para o gene *IFNA* observa-se diferença estatística para os genes *IFNAR1*, *IRF1* e *STAT1*. Observa-se também diferença estatística do gene *IRF1* em comparação com o gene *JAK1*. Para o gene *JAK1* nota-se diferença estatística entre os genes *IFNAR1* e *STAT1*.

As diferenças dos níveis de expressão entre os genes para a comparação A+C-B+D são apresentadas no Quadro 4.

**Quadro 4** Significância das diferenças de expressão (valores RQ) entre os diferentes genes na análise SDcDP + CcDP (A+C) em relação a SDsDP + CsDP (B+D)

Genes	IFNG	IFNGR1	IFNGR2	IFNA	IFNAR1	IFNAR2	IRF1	STAT1	JAK1
IFNG	-	<b>P=0,0041</b>	<b>P=0,0047</b>	P= 0,2793	<b>P= 0,0349</b>	P=0,8472	P= 0,4171	<b>P=0,0074</b>	<b>P= 0,0094</b>
IFNGR1		-	P= 0,8627	<b>P= 0,0006</b>	P= 0,3577	<b>P=0,0045</b>	P= 0,1298	P= 0,9419	<b>P&lt;0,0001</b>
IFNGR2			-	<b>P=0,001</b>	P= 0,5581	<b>P=0,0063</b>	P= 0,1478	P=0,9202	<b>P&lt;0,0001</b>
IFNA				-	<b>P=0,008</b>	P= 0,4171	P= 0,0834	<b>P=0,0011</b>	P= 0,2733
IFNAR1					-	<b>P=0,0398</b>	P= 0,4488	P= 0,5338	<b>P&lt;0,0001</b>
IFNAR2						-	P= 0,372	<b>P=0,0056</b>	<b>P= 0,036</b>
IRF1							-	P= 0,1105	<b>P= 0,004</b>
STAT1								-	<b>P&lt;0,0001</b>
JAK1									-

p>0,05 – não significativo. Em negrito estão os valores estatisticamente significantes (teste de Mann-Whitney)

No Quadro 4, pode-se observar uma diferença estatística na expressão do gene *IFNG* em comparação aos genes *IFNGR1*, *IFNGR2*, *IFNAR1*, *STAT1* e *JAK1*. Os genes *IFNGR1* e *IFNGR2* mostram diferença estatística com os genes *IFNA*, *IFNAR2* e *JAK1*. Para o gene *IFNA* pode-se observar uma diferença estatística entre os genes *IFNAR1* e *STAT1*. A expressão do gene *IFNAR1* se mostra diferente de *IFNAR2* e *JAK1*. Notou-se também que a expressão do gene *IFNAR2* foi diferente de *JAK1* e *STAT1*. O gene *STAT1* possui uma diferença estatística do gene *JAK1*, o qual também está diferente de *IRF1*.



*Discussão*



## 6 Discussão

Pelo fato de crianças e adolescentes com SD terem alta prevalência de gengivite e que esta se manifesta de forma extensiva progredindo rapidamente para periodontite<sup>16,86,111</sup>, é de extrema necessidade o acompanhamento odontológico desses pacientes com medidas de motivação de higiene bucal (envolvendo inclusive os responsáveis e/ou cuidadores do paciente) e controle do biofilme, no intuito de prevenir e/ou conter o processo inflamatório da periodontite<sup>30,106</sup>. Neste estudo, verificamos que os indivíduos com SD independente da presença de DP apresentam uma faixa etária de 7 a 48 anos de idade. Considerando-se a DP dos indivíduos com SD, a mediana dessa faixa etária fica em 31 anos de idade. Este resultado concorda com os apresentados em estudos epidemiológicos, os quais demonstraram que 96% dos indivíduos com SD desenvolvem DP antes dos 30 anos de idade<sup>27,102</sup>.

Vários estudos foram realizados com indivíduos com SD em relação à DP, porém os parâmetros clínicos utilizados em cada estudo foram diferentes, o que dificulta a comparação de dados destas pesquisas com o presente estudo<sup>21,23,63,79,102,106-107</sup>.

Alguns estudos mostraram uma alta porcentagem de sangramento à sondagem (60 a 91%) nos indivíduos com SD<sup>20,21,79,102,106</sup>. De forma semelhante, esta porcentagem de sangramento à sondagem também foi observada neste presente estudo, sendo 53,7% para os

indivíduos com SD com DP (grupo A). Porém num estudo de Zigmond et al.<sup>130</sup> (2006) a percentagem de sangramento à sondagem foi de 35,7% para os indivíduos com SD com idades entre 19 a 27 anos e 23,8% para os indivíduos cromossomicamente normais com idades entre 18 a 28 anos. Num estudo realizado por Cheng et al.<sup>21</sup> (2008), os indivíduos cromossomicamente normais com idades entre 19 a 31 anos apresentaram um índice de sangramento à sondagem de 56%, de forma semelhante ao encontrado neste estudo para indivíduos cromossomicamente normais com DP (grupo C), que foi de 49% dos sítios. Para esse índice não foi observada nenhuma diferença estatística entre os dois grupos com DP (grupos A e C).

A PS=1-2mm observada num estudo de Sasaki et al.<sup>108</sup> (2004) para os indivíduos com SD com faixa etária entre 20 a 31 anos foi de 47,5% dos sítios. De forma semelhante, este presente estudo observou PS=1-2mm de 56% dos sítios em indivíduos com SDcDP (grupo A). Entretanto em um estudo realizado por Sakellari et al.<sup>107</sup> (2005), a percentagem de PS=1-2mm foi em torno de 98% dos sítios para indivíduos com SD na faixa etária dos 8 aos 13 anos de idade. O encontrado neste estudo para os indivíduos com SDsDP (grupo B) foi de 93% dos sítios.

Num estudo realizado por Loureiro et al.<sup>79</sup> (2007) investigando 93 indivíduos com SD na faixa etária dos 6 aos 20 anos de idade apresentando gengivite ou periodontite, foi observado que a  $PS \geq 4$

mm foi presente em 33% desses pacientes com SD do gênero feminino e 25% do gênero masculino. Neste presente estudo, a  $PS \geq 4\text{mm}$  foi observada em 17% dos indivíduos com SD com DP (grupo A), sem diferença estatística para o grupo C. Num estudo de Barr-Agholme et al.<sup>10</sup> (1998) onde a  $PS \geq 4\text{mm}$  encontrada foi em torno de 40% dos sítios em indivíduos com SD com faixa etária dos 13 aos 21 anos de idade, com diferença estatística maior em relação aos indivíduos cromossomicamente normais com a mesma faixa etária do grupo com SD estudado ( $p=0,027$ ). A mesma porcentagem de  $PS \geq 4\text{mm}$  foi encontrada num estudo de Agholme et al.<sup>2</sup> (1999) que foi de 41% dos sítios analisados em indivíduos com SD co faixa etária dos 13 aos 20 anos de idade, subindo para 65% após o acompanhamento de 7 anos.

Sakellari et al.<sup>106</sup> (2001) observou que indivíduos com SD na faixa etária dos 26 aos 37 anos de idade, tiveram uma média de profundidade à sondagem de 2,89mm. Sakellari et al.<sup>107</sup> (2005) analisaram indivíduos com SD dos 19 aos 28 anos de idade, e a PS média obtida foi de 2,09mm, sendo semelhante à obtida no presente estudo que foi de 2,3mm para os indivíduos com SD com DP (grupo A). No estudo realizado por Cheng et al.<sup>21</sup> (2008) e Izumi et al.<sup>63</sup> (1988), a PS média foi de 3,2mm para os indivíduos com SD. Porém, no estudo de Cheng et al.<sup>21</sup> (2008) quando os pacientes foram submetidos a tratamento periodontal, a média de PS diminuiu para 1,8mm. Essa PS se assemelha com o encontrado no presente estudo no grupo SDsDP (grupo B) que foi

de 1,3mm. Komatsu et al.<sup>69</sup> (2001) encontraram uma PS média de 2,54mm para pacientes com SD, com faixa etária dos 6 aos 41 anos de idade, enquanto que para pacientes com retardo mental (sem SD), com faixa etária dos 21 aos 31 anos de idade, essa mesma média de PS foi de 2,88mm. A mediana de PS encontrada por Reuland-Bosma et al.<sup>102</sup> (2001) para indivíduos com SD, com faixa etária dos 16 aos 65 anos de idade, foi de 6mm, e para o grupo Controle, com faixa etária semelhante ao grupo com SD, foi de 5mm ( $p < 0,05$ ). Porém, com relação ao encontrado neste presente estudo tal índice também mostrou diferença estatística entre os grupos SDcDP (grupo A) e CcDP (grupo C) ( $p < 0,05$ ).

Em estudos realizados por Sakellari et al.<sup>106</sup> (2001) e Zigmond et al.<sup>130</sup> (2006), o NI médio observado em indivíduos com SD foi de 3,24mm e 3,09mm, respectivamente. No entanto, Sakellari et al.<sup>107</sup> (2005) obtiveram NI médio de 2,3mm em indivíduos com SD dos 19 aos 28 anos de idade, sendo similar ao encontrado neste estudo em indivíduos com SD com DP (grupo A).

Neste estudo, os grupos formados por pacientes com DP tiveram os índices clínicos periodontais também analisados de acordo com o tipo de DP: localizada e generalizada (Tabela 3). Observou-se que o número de indivíduos com periodontite crônica localizada foi maior nos grupos A (SDcDP) e C (CcDP) em relação à periodontite crônica do tipo generalizada, porém sem diferença estatisticamente significante. Vários estudos considerando-se indivíduos com SD e com periodontite agressiva

localizada foram realizados<sup>2,27,86,111,130</sup>. Porém, considerando os critérios clínicos para a classificação da periodontite agressiva que são: afeta preferencialmente indivíduos jovens até cerca de 35 anos sistemicamente (e cromossomicamente) normais, perda de inserção óssea interproximal generalizada afetando pelo menos 3 dentes permanentes como primeiro molares e incisivos e acentuado episódio natural de perda de inserção e destruição de osso alveolar<sup>71,121</sup>. Constatou-se que os pacientes incluídos neste estudo não apresentaram periodontite agressiva, mas apresentaram o tipo crônica localizada e generalizada, segundo a classificação de Armitage et al.<sup>5</sup> (1999). Não foram observadas profundas diferenças da DP localizada (assim como da generalizada) entre os pacientes com SD e os cromossomicamente normais (Tabela 3).

Vários estudos mostram a alta suscetibilidade e prevalência da DP em indivíduos com SD<sup>3,23,30,109,130</sup>. Porém os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento e progressão dessa DP em SD, entretanto, ainda não são bem compreendidos<sup>50</sup>.

Está comprovado que a DP é causada por fatores etiológicos locais, especialmente o biofilme, mas distúrbios sistêmicos podem reduzir ou alterar a resistência ou a resposta do hospedeiro e então predispor a alterações periodontais<sup>35</sup>. Em vista disto, o fator etiológico e a reação tecidual não podem ser equacionados como uma simples reação de causa e efeito, além disso, não se pode atribuir aos fatores locais (com sua intensidade, frequência e duração) toda a

responsabilidade do processo, pois as reações teciduais são influenciadas pelo estado de saúde geral do paciente<sup>71</sup>.

A higiene oral precária dos indivíduos com SD por si só não é o fator determinante da DP, pois foi observado que a prevalência de DP é maior em crianças com SD do que em crianças com retardo mental<sup>27,118</sup>. Em outro estudo semelhante onde foram analisados pacientes com SD, pareados por idade com pacientes com retardo mental, mas sem SD, observou-se que os indivíduos com SD também apresentavam prevalência maior de DP<sup>109</sup>. Agholme et al.<sup>2</sup> (1999) observaram que indivíduos com SD apresentaram uma perda óssea alveolar de 74% em um estudo longitudinal de 7 anos de acompanhamento, mostrando assim a rápida evolução da DP nesses indivíduos com idade média de 23,5 anos. Essa rápida evolução da DP nos indivíduos com SD pode ser explicada por deficiências no sistema imunológico<sup>101</sup>.

Alterações do sistema imune são consideradas como uma das características patológicas presentes na SD, exemplificada principalmente pela alta suscetibilidade à infecções virais ou bacterianas e maior prevalência à leucemia<sup>37</sup>. Foram observadas em pacientes com SD, funções diminuídas de quimiotaxia e fagocitose por neutrófilos e linfócitos<sup>6,12,68,117</sup> e ativação defeituosa de linfócitos T<sup>26,113</sup>. Também foi observado que a proporção de imunoglobulina G1 (IgG1) no fluido gengival de indivíduos com SD é maior que em indivíduos cromossomicamente normais<sup>10</sup>. Fibroblastos gengivais de portadores de

SD estimulados com lipopolissacarídeos (LPS) de *A.a.* expressam mais ciclooxigenase 2 (COX-2) que induz a produção de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), a qual é um potente estimulador de reabsorção óssea<sup>9,93</sup>. Além disso, os níveis de PGE<sub>2</sub> em sítios não inflamados apresentaram-se elevados no fluido gengival de portadores de SD em relação aos pacientes cromossomicamente normais<sup>9,10,93</sup>.

O presente estudo focou a expressão de genes que fazem parte da cascata de sinais do IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha$  em indivíduos com e sem SD frente à DP. É válido salientar que o papel dessas citocinas reconhecidamente importantes na DP foram previamente investigadas em células do sangue periférico, em linhagens de células derivadas de indivíduos com SD<sup>44,45</sup> mas não em tecido gengival inflamado de pacientes com SD, como originalmente investigado neste estudo.

Em 1980, Maroun<sup>80</sup> sugeriu que o agravamento das conseqüências fenotípicas da trissomia do cromossomo 21 está relacionado com a cascata de sinais dos interferons. Após o mapeamento do cromossomo 21 observou-se uma grande implicação da ação dos interferons em pacientes com SD, pois alguns genes que envolvem as vias de sinalização dos interferons foram localizados na região distal do braço longo do cromossomo 21, chamada de região Síndrome de Down (DSR)<sup>80</sup>. Estes genes estão seqüencialmente agrupados (em *tandem*) da seguinte forma: receptores do IFN- $\alpha$  (*IFNAR1* e *IFNAR2*), o receptor 2 do IFN- $\gamma$  (*IFNGR2*) e o receptor B da IL-10 (*IL10RB*)<sup>99</sup>.

Sem considerar a SD, a importância do IFN- $\gamma$  na DP tem sido bastante documentada. Quando camundongos foram submetidos ao desenvolvimento de DP pela inoculação oral de *A.a*, foi observada a expressão de *IFNG* nos tecidos periodontais desde os estágios iniciais da infecção e durante todo o curso da doença<sup>42</sup>. Gorska et al.<sup>46</sup> (2003) observaram que nas biópsias de tecidos gengivais e nas amostras de sangue de pacientes cromossomicamente normais com periodontite crônica, existia uma concentração significativamente alta da proteína IFN- $\gamma$  quando comparado ao grupo saudável. No sangue e no tecido gengival dos pacientes com periodontite crônica, a proteína IFN- $\gamma$  teve uma concentração quatro vezes maior do que em pacientes saudáveis. Com essa mesma comparação, Yamazaki et al.<sup>129</sup> (1997) observaram a expressão de RNAm *IFNG* em pacientes adultos com periodontite, e mostraram que esta foi maior no sangue do que no tecido gengival de pacientes cromossomicamente normais com periodontite. Já no estudo realizado por Ukai et al.<sup>124</sup> (2001), a concentração de proteína IFN- $\gamma$  foi 5 vezes maior no tecido gengival com inflamação severa em relação ao tecido gengival pouco inflamado. No entanto, num estudo realizado por Honda et al.<sup>57</sup> (2006), a expressão de RNAm *IFNG* em pacientes com periodontite foi o dobro em relação aos pacientes com gengivite. Dutzan et al.<sup>32</sup> (2009) realizaram um estudo com pacientes com periodontite crônica e analisaram os sítios com DP ativa e inativa. Observaram que nos tecidos gengivais houve uma expressão de *IFNG* nos sítios com



doença ativa de 7,8 vezes maior do que a expressão encontrada nos sítios inativos (sem DP). Por outro lado, Roberts et al.<sup>104</sup> (1997) não observaram diferença de expressão RNAm *IFNG* nos tecidos gengivais de indivíduos com periodontite crônica em relação aos indivíduos saudáveis periodontalmente. Garlet et al.<sup>40</sup> (2003) estudaram a expressão de RNAm *IFNG* em tecido gengival de pacientes saudáveis, pacientes com periodontite crônica e pacientes com periodontite agressiva. Observaram que 10% dos pacientes saudáveis expressavam *IFNG*, sendo tal expressão de *IFNG*, em 70% dos pacientes com periodontite crônica e 81% dos pacientes com periodontite agressiva ( $p < 0,05$ ). Tais resultados praticamente foram confirmados pelo mesmo grupo de pesquisadores um ano depois, ou seja, 10% dos pacientes saudáveis expressavam *IFNG*, 75% dos pacientes com periodontite crônica e 87% dos pacientes com periodontite agressiva<sup>41</sup>. Em 2006, Garlet et al.<sup>43</sup> estudaram a expressão de RNAm *Ifn*g no tecido gengival de camundongos nos períodos de 0 hora, 24 horas, 7 dias, 15 dias, 30 dias e 60 dias, submetidos a infecção por *A.a*. Observou-se que após 24 horas, a expressão desse gene dobrou em relação ao momento da infecção, e após 7 dias tal expressão dobrou novamente. No 15º dia, foi observado uma estabilização na expressão de *IFNG*. Já no 30º dia, essa expressão caiu pela metade e se estabilizou no 60º dia. Isso mostra que o padrão de expressão do *IFNG* produzida pelo estímulo da DP está associada à sua progressão e severidade na DP experimental.

Com relação à investigação do IFN- $\gamma$  em indivíduos com SD, Murphy et al.<sup>88</sup> (1992) observaram que a expressão do RNAm do *IFNG* foi de 2,4 vezes mais abundante no timo desses pacientes do que nos indivíduos cromossomicamente normais.

Neste presente estudo, observou-se que para os pacientes com SD (A-B), a DP influenciou muito os níveis de expressão de *IFNG*, chegando ao patamar de 60% de subexpressão; o que foi significativamente diferente da expressão observada nos indivíduos com SD independentemente da presença de DP (A+B) em relação aos pacientes cromossomicamente normais (C+D) (Figura 5A). Esses resultados sugerem que em indivíduos com SD (A+B), sem considerar o estímulo da DP, a expressão de *IFNG* não é significativamente depreciada se comparado aos indivíduos cromossomicamente normais (C+D), mas quando a DP acomete indivíduos com SD, estes não apresentam uma resposta imune tão eficiente (A-B) quanto àquela observada em indivíduos cromossomicamente normais (C-D) (Figura 5A). Esse achado contribui com observações prévias que mostram uma resposta imune deficiente em indivíduos com SD, como funções diminuídas de fagocitose e quimiotaxia por linfócitos e neutrófilos<sup>6,12,47,68,88,93,113</sup>.

Com relação à expressão gênica do receptor 1 e 2 do IFN- $\gamma$ , destacam-se os resultados dos grupos sindrômicos (grupo A+B) em relação ao calibrador, os grupos sem SD (grupo C+D) que mostraram uma subexpressão de 30% (*IFNGR1*) e 25% (*IFNGR2*), sendo que esta

ainda foi maior que a observada nas outras comparações A-B e A+C-B+D para (Figuras 5B e 5C). Tais resultados sugerem que, por exemplo, independentemente da presença da DP, os pacientes com SD têm maior expressão de receptores de *IFNG* do que os pacientes cromossomicamente normais. Em concordância com este achado, Epstein e Epstein<sup>33</sup> (1983) observaram que os fibroblastos dos pacientes com SD são mais sensíveis ao *INFG*. Isso poderia ser explicado pela presença do gene *IFNGR2* no cromossomo 21, de forma que nos indivíduos com trissomia do 21, esse gene mostra-se mais expresso.

Quanto ao *IFNA*, sem considerar a SD, sua relação com a DP também tem sido documentada. Prabhu et al.<sup>98</sup> (1996) encontraram níveis de expressão RNAm *IFNA* significativamente maiores em tecido gengival de pacientes cromossomicamente normais com periodontite em relação aos pacientes saudáveis. O mesmo foi encontrado por Wright et al.<sup>128</sup> (2008) que estudaram a proteína IFN- $\alpha$  nos neutrófilos de sangue periférico de pacientes com periodontite. Observaram que os níveis de IFN- $\alpha$  no plasma de pacientes com periodontite eram 2 vezes maiores em relação aos pacientes saudáveis ( $p=0,0045$ ). Após o tratamento periodontal, a concentração de IFN- $\alpha$  dos pacientes com periodontite reduziu para níveis semelhantes aos pacientes saudáveis sem diferença significativa ( $p=0,603$ ). O mesmo foi encontrado num estudo realizado por Kajita et al.<sup>67</sup> (2007) que analisaram a expressão de RNAm *IFNA* em pacientes com periodontite crônica e comparou com pacientes com

gingivite. Verificaram que a expressão RNAm *IFNA* foi maior em pacientes com periodontite crônica em relação aos pacientes com gengivite ( $p=0,033$ ), mas os níveis de expressão em ambos os grupos foi baixo (0,2 para o grupo com gengivite e 0,4 para o grupo com periodontite crônica).

No presente estudo, assim como Kajita et al.<sup>67</sup> (2007), também notou-se baixa expressão de *IFNA* nos indivíduos com SD (A+B) em relação aos cromossomicamente normais (C+D) independentemente da presença de DP (Figura 5F). Assim, pode-se notar que o estímulo da presença da DP entre indivíduos com SD (A+B) produz uma resposta imune depreciada (56% subexpresso) quando comparado aos indivíduos cromossomicamente normais (C+D). Considerando que o *IFNA* é um gene responsável pela imunidade natural contra vírus e bactérias, e indivíduos com SD sofrem maior prevalência de infecções<sup>62</sup>; a presente observação de subexpressão do *IFNA* em indivíduos com SD pode contribuir para explicar tal fato. Por outro lado, entre indivíduos com SD (A-B), a presença da DP atua como forte fator que elicita a resposta imune do indivíduo produzindo *IFNA* em níveis comparáveis aos observados entre indivíduos cromossomicamente normais (C-D) (Figura 5F).

Observou-se que para o *IFNAR1* houve uma superexpressão de 35% nos pacientes com SD (A+B) em relação aos pacientes cromossomicamente normais (C+D) (Figura 5G). Tal expressão

foi significativamente maior que a observada nas comparações realizadas para os outros grupos (Figura 5G). A presença do gene *IFNAR1* no cromossomo 21 é a provável justificativa para esse resultado. Em concordância com o presente estudo, Iwamoto et al.<sup>62</sup> (2009) observaram nos fibroblastos de pacientes com SD um maior número de receptores do tipo 1 de IFN- $\alpha$ . No entanto, para o *IFNAR2*, cujo gene também está localizado no cromossomo 21; a expressão gênica também é maior em pacientes com SD (A+B) em relação ao controle (C+D) (Figura 5H), mas em uma proporção bem menos acentuada do que a observada para o gene *IFNAR1* (Figura 5G). A maior expressão dos receptores *IFNAR1* e *IFNAR2* nos pacientes com SD, condiz com o estudo de deWeerd et al.<sup>29</sup> (2007), que demonstrou que as células leucocitárias derivadas dos pacientes com SD são mais sensíveis ao tratamento com IFN- $\alpha$ . Fibroblastos de pacientes com SD em cultura mostraram 1,5 vezes mais moléculas receptoras de IFN- $\alpha$  funcionais do que fibroblastos de indivíduos cromossomicamente normais<sup>34</sup>. Em concordância, Gerdes et al.<sup>44</sup> (1992) observaram um aumento de 1,69 vezes de receptores de IFN- $\alpha$  no sangue periférico de pacientes com SD em relação à pacientes cromossomicamente normais. Também Morgensen et al.<sup>87</sup> (1982) observaram que linfócitos de indivíduos com SD tiveram 3 vezes mais receptores de IFN- $\alpha$ , comparados com os linfócitos de indivíduos cromossomicamente normais.

Quanto à via de sinalização JAK/STAT, investigou-se neste estudo a expressão da *JAK1* e *STAT1*, sabendo-se que apesar da participação de outras moléculas da família *JAK*, como *JAK2* e *TYK2*, no processo de fosforilação do resíduo de tirosina, *JAK1* é essencial na cascata de sinalização intracelular pela ligação tanto de IFN- $\gamma$  quanto IFN- $\alpha$ <sup>28</sup>. *STAT1* também é essencial para a via de sinalização tanto do IFN- $\gamma$  quanto do IFN- $\alpha$ . Assim, sua expressão gênica aumenta muito em resposta da estimulação das células sanguíneas tanto com IFN- $\gamma$  quanto com IFN- $\alpha$ <sup>74</sup>. Com relação à expressão de *JAK1*, nota-se que indivíduos com SD (A+B-C+D) independente da presença de DP expressam níveis significativamente menores ( $p < 0,0005$ ) que aqueles com SD frente à DP (A-B) (Figura 5D), ou seja, sem considerar o estímulo da DP, indivíduos com SD têm sub expressão de *JAK1*, o que também pode contribuir para a resposta imune menos eficiente nesses indivíduos pois prejudica a cascata de sinalização intracelular dos IFNs; mas frente à DP os indivíduos com SD (A-B) têm uma forte expressão de *JAK1*, o que contribui para a resposta hipersensível ao *IFNG*<sup>35</sup> e ao *IFNA*<sup>63</sup>. Em outras palavras, diferentemente dos altos níveis de expressão dos receptores 1 e 2 de IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha$  nos indivíduos com SD (A+B) em relação aos cromossomicamente normais (C+D), independentemente da DP, nota-se que os níveis de expressão de *JAK1* são baixos nesses pacientes; o que pode ser comprovado pela diferença estatística entre *IFNAR1* e *JAK1* ( $p = 0,03$  – Quadro 3). Assim, apesar da hipersensibilidade aos IFN- $\gamma$  e

*IFN- $\alpha$*  observada nos indivíduos com SD pelo fato de serem trissômicos (levando à maior expressão desses receptores), isso não se traduz em uma resposta imune mais eficiente nesses pacientes, já que apresentam maior susceptibilidade à infecções virais ou bacterianas<sup>38</sup>, inclusive a DP<sup>63</sup>. Um fato que pode contribuir para explicar isso é que para que a resposta imune desencadeada pela ligação dos IFNs aos seus respectivos receptores se concretize, é necessária a transdução do sinal ao núcleo, o que ocorre com a participação de *JAK1*; só que sua expressão, como visto originalmente neste estudo, não acompanha a alta expressão dos receptores dos IFNs nos pacientes com SD de maneira geral (A+B-C+D). Nestes mesmos pacientes (A+B-C+D), nota-se que a expressão de *STAT1* (Figura 5I) não foi significativamente diferente da observada para pacientes cromossomicamente normais frente à DP (C-D). Assim, apesar da menor expressão de *JAK1* nos indivíduos com SD (A+B) em relação ao controle (C+D), a expressão de *STAT1* parece tentar compensar a dinâmica de sinalização intracelular para promover a resposta imune. Considerando somente os indivíduos com SD frente à DP (A-B), tal estímulo inflamatório induz eficientemente a expressão de *JAK1* para que a sinalização intracelular ocorra levando à resposta imune. Já a expressão de *STAT1* nesses pacientes (A-B – 24% superexpressão) se mostra menos da metade da observada entre os pacientes cromossomicamente normais (C-D) sob o mesmo estímulo inflamatório da DP (58% superexpressão). Dessa forma, na comparação (A-B) nota-se

que os pacientes com SD com DP apesar de terem maior expressão de *JAK1* têm a dinâmica da sinalização intracelular diminuída pela menor expressão de *STAT1*. A diferença dos níveis de expressão de *JAK1* e *STAT1* na comparação (A-B) pode ser observada no Quadro 1 ( $p < 0,0001$ ).

Vale notar que entre os pacientes cromossomicamente normais, frente à DP (C-D), os níveis de *JAK1* (Figura 5D) e *STAT1* (Figura 5I) são equivalentes entre si ( $p = 0,96$  – Quadro 2), mostrando que o número euplóide de cromossomos 21 contribui para o equilíbrio dessas moléculas que participam da sinalização JAK/STAT. É importante considerar que, apesar de no presente estudo ter-se investigado a expressão de moléculas chave da via de sinalização JAK/STAT, essa via é muito mais complexa, da qual fazem parte outras moléculas que interagem na cascata de sinalização intracelular<sup>119</sup>.

Na modulação dessa via de sinalização, este presente estudo analisou o gene *IRF1*, onde se observou que com a presença de DP em indivíduos com SD (A-B) houve superexpressão de 12%, enquanto que entre indivíduos cromossomicamente normais (C-D) houve subexpressão de 53% (Figura 5E). Observando-se a expressão de *IFNG* (Figura 5A), nota-se que a expressão desse gene nas comparações (A-B) e (C-D) mostraram níveis de expressão opostos aos vistos para *IRF1*, como comentado acima. Esses resultados podem ser explicados pela constatação que mesmo baixos níveis de IFN- $\gamma$  estimularam a expressão



de *IRF1* em células tumorais esofágicas<sup>126</sup>. Alternativamente, os mesmos autores pesquisaram também o *IRF2* (não incluído no presente estudo) que é antagonista ao *IRF1*, e observaram que o *STAT1* induz a transcrição de *IRF1*, o qual induz a transcrição de *IRF2*, mas que o *IRF2* inibe a transcrição de *IFNGR1*, o que se reflete na menor resposta ao *IFNG*. Dessa forma, pode-se explicar biologicamente os níveis opostos de *IRF1* e *IFNG*. Considerando o papel funcional do *IRF1*, que é de regulação da expressão gênica do *IFNA*, mas que sua produção é realizada pelo *IFNG* por meio de *STAT1*<sup>85</sup>, sugere-se que a resposta do gene *IRF1* ocorre rapidamente quando estimulado com IFNs. Lehtonen et al.<sup>73</sup> (1997) observaram que em macrófagos humanos, a expressão de *IRF1* foi 10 vezes maior após 1 hora de estímulo com IFN- $\alpha$ , e quando estimuladas com IFN- $\gamma$  a expressão de *IRF1* foi 25 vezes maior em comparação aos níveis basais. Podemos observar a regulação do *IRF1* (Figura 5E) no grupo com SD (A+B) em relação ao grupo controle (C+D) que foi de superexpressão (72%), enquanto que para *IFNA* (Figura 5F) nessa mesma comparação de grupos houve subexpressão de 56%, sugerindo a regulação do *IFNA* pelo *IRF1*. Em concordância, pode-se observar que nessa comparação (A+B-C+D) os níveis de expressão gênica de *IFNA* e *IRF1* são estatisticamente diferentes ( $p=0,004$  – Quadro 3).

De maneira geral, os resultados do presente estudo e os apresentados pela literatura científica, parecem indicar que os indivíduos

com SD têm uma resposta imune menos eficiente contra vírus e bactérias, mas demonstram uma característica inflamatória mais persistente pelo fato de que mesmo baixas doses de *IFNG* levam à produção exacerbada de IL-6 (citocina pró-inflamatória) em células com trissomia do 21<sup>62</sup>; além disso, foi verificada expressão diminuída de IL-10 (citocina anti-inflamatória) em indivíduos com SD<sup>19</sup>.

Acredita-se que os achados dessa pesquisa contribuem com a compreensão mais aprofundada do comportamento do sistema imune de indivíduos com SD frente à DP, ou independente dela, revelando aspectos da resposta imune que se apresentam diferentes nesses indivíduos em comparação com aqueles cromossomicamente normais. Isso pode estimular outros grupos de pesquisadores na busca de terapias mais direcionadas e eficientes para indivíduos com SD, que poderiam proporcionar melhoria da sua saúde, bem como ganhos inestimáveis à sua qualidade de vida e dos seus responsáveis.



*Conclusão*

## 7 Conclusão

Dentre os resultados obtidos com o presente estudo foi possível obter conclusões advindas da análise dos parâmetros clínicos periodontais e da análise da expressão genética.

As diferenças dos parâmetros clínicos periodontais dos indivíduos incluídos neste estudo foram:

- Os indivíduos com DP independente da presença de SD apresentaram os parâmetros clínicos de SS, PS e NI maiores que os periodontalmente saudáveis;
- Nos indivíduos com DP, o tipo mais prevalente foi a periodontite crônica localizada, independente da presença de SD.

Em tecido gengival, da análise da expressão dos genes investigados em indivíduos com SD frente à DP, comparando-se a indivíduos cromossomicamente normais com e sem DP observou-se que:

- Indivíduos com SD sem considerar o estímulo inflamatório da DP (A+B-C+D), tiveram uma expressão de *IFNG* semelhante ao observado entre indivíduos cromossomicamente normais (C-D), mas quando a DP acomete indivíduos com SD (A-B), estes não apresentam uma resposta imune tão eficiente quanto os indivíduos cromossomicamente normais (C-D);
- Indivíduos com SD independente da presença de DP (A+B-C+D), têm expressão consideravelmente menor do gene *IFNA* que indivíduos cromossomicamente normais com DP (C-D), indicando

uma imunodeficiência em um importante mecanismo de controle da inflamação que parece ser inerente à SD;

- Indivíduos com SD (A+B-C+D) apresentaram uma expressão significativamente maior dos genes *IFNGR2* e *IFNAR1*, os quais residem no cromossomo 21;



*Referências*

## 8 Referências\*

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia celular e molecular*. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Mecanismos das respostas imunes*. Rio de Janeiro: Revinter; 2003. p. 235-67.
2. Agholme MB, Dahllof G, Modder T. Changes of the periodontal status in patients with Down syndrome during a 7-years period. *Eur J Oral Sci*. 1999; 2: 82-8.
3. Aguet M, Grobke M, Dreiding P. Various human interferon-alpha subclasses cross-react with common receptors: their binding affinities correlate with their specific biological activities. *Virology* 1984; 132: 211-6.
4. Amano A, Kishima T, Kimura S, Takiguchi M, Ooshima T, Hamada S, et al. Periodontopathic bacteria in children with Down Syndrome. *J Periodontol*. 2000; 71: 249-55.
5. *Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Ann Periodontol. 1999; 4: 1-6.*
6. Barkin RM, Weston WL, Humbert JR, Sunada K. Phagocytic function in Down syndrome- Bactericidal activity and phagocytosis. *J Ment Defic Res*. 1980; 24: 251-6.
7. Barnett ML, Friedman D, Kastner T. The prevalence of mitral valve prolapse in patients with Down's syndrome: implications for dental management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1988; 66: 445-7.

---

\* De acordo com estilo Vancouver. Disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

8. Barr-Agholme M, Dahllöf G, Linder L, Modéer T. Actinobacillus actinomycetencomitans, Capnocytophaga and Porphyromonas gingivalis in subgingival plaque of adolescents with Down's syndrome. Oral Microbiol Immunol. 1992; 7: 244-5.
9. Barr-Agholme M, Dahllöf G, Modéer T, Engström PE, Engström GN. Periodontal conditions and salivary immunoglobulins in individuals with Down syndrome. J Periodontol. 1998; 69: 1119-23.
10. Barr-Agholme M, Krekmanova L, Yucel-Lindberg T, Shinoda K, Modéer T. Prostaglandin E2 level in gingival crevicular fluid from patients with Down syndrome. Acta Odontol Scand. 1997; 55: 101-5.
11. Barrena MJ, Echaniz P, Garcia-Serrano C, Cuadrado E. Imbalance of the CD4+ subpopulations expressing CD45RA and CD29 antigens in the peripheral blood of adults and children with Down syndrome. Scand J Immunol. 1993; 38: 323-6.
12. Barroeta O, Nungaray L, López-Osuna M, Armendares S, Salamanca F, Kretschmer RR. Defective monocyte chemotaxis in children with Down's syndrome. Pediatric Res. 1983; 17: 292-5
13. Bittles AH, Bower C, Hussain R, Glasson EJ. The four ages of Down syndrome. Eur J Public Health. 2007; 17: 221-5.
14. Borges-Osorio MR, Robinson WM. As bases cromossômicas da hereditariedade: alterações cromossômicas. Genética humana. 2. ed. Porto Alegre: Artmed; 2002. p. 68-115.



15. Brooksbank BW, Balazs R. Superoxide dismutase and lipoperoxidation in Down's syndrome fetal brain. *Lancet* .1983; 1: 881-2.
16. Brown RH. A longitudinal study of periodontal disease in Down's syndrome. *NZ Dent J*. 1978; 74: 137-44.
17. Caron L, Tihy F, Dallaire L. Frequencies of chromosomal abnormalities at amniocentesis: over 20 years of cytogenetic analyses in one laboratory. *Am J Med Genet*. 1999; 82: 149-54.
18. Carter CO, Hamerton JL, Polani PE, Gunalp E, Weller SD. Chromosome translocation as a cause of familial mongolism. *Lancet* 2. 1960; 2: 278-80.
19. Cavalcante LB. Expressão de genes envolvidos na resposta imune de indivíduos com Síndrome de Down frente à Doença Periodontal [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.
20. Cheng RH, Leung WK, Corbet EF Non-cirurgical periodontal therapy with adjunctive chlorexidine use in adults with down syndrome: a prospective case series. *J Periodontol* 2008; 79: 379-385.

21. Cheng RH, Leung WK, Corbet EF, King NM. Oral health status of adults with Down syndrome in Hong Kong. *Spec Care Dentist*. 2007; 27: 134-8.
22. Ciamponi AL, Guaré RO. A criança com trissomia do cromossomo 21 (síndrome de Down). *Odontopediatria: resoluções clínicas*. Curitiba:Maio; 2000. p. 301-12.
23. Cichon P, Crawford L, Grimm WD. Early-onset periodontitis associated with Down's syndrome – clinical interventional study. *Ann Periodontol*. 1998; 3: 370-80.
24. Coccia EM, Stellacci E, Marziali G, Weiss G, Battistini A. IFN-gamma and IL-4 differently regulate inducible NO synthase gene expression through IRF-1 modulation. *Int Immunol*. 2000; 12: 977-85.
25. Cogulu D, Sabah E, Uzel A, Ozkinay F. Genotyping of *Streptococcus mutans* by using arbitrarily primed polymerase chain reaction in children with Down Syndrome. *Arch Oral Biology*. 2006; 5: 177-82.
26. Cuadrado E, Barrena MJ. Immune dysfunction in Down's syndrome: primary immune deficiency or early senescence of the immune system? *Clin Immunol Immunopathol*. 1996; 78: 209-14.
27. Cutress TW. Periodontal disease and oral hygiene in trisomy 21. *Arch Oral Biol*. 1971; 16: 1345-55.

28. Darnell Jr JE, Kerr IM, Stark GR. Jak-Stat pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*. 1994; 264: 1415-21.
29. De Weerd NA, Sarajiwa SA, Hertzog PJ. Type I interferon receptors: Biochemistry and biological functions. *J Biol Chem*. 2007; 282: 20053-7.
30. Desai, SS. Down syndrome: a review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1997; 3: 279-85.
31. Doly J, Civas A, Navarro S, Uze G. Type I interferons: expression and signalization – Review. *Cell. Mol. Life Sci*. 1998; 54: 1109-21.
32. Dutzan N, Gamonal J, Silva A, Sanz M, Vernal R. Over-expression of forkhead Box P3 and its association with receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, interleukin (IL)-17, IL-10 and transforming growth factor- $\beta$  during the progression of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2009; 36: 396-403.
33. Epstein CJ, McManus NH, Epstein LB, Branca AA, D'Alessandro SB, Baglioni C. Direct evidence that the gene product of the human chromosome 21 locus, IFRC, is the interferon- $\alpha$  receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1982; 107: 1060-6.
34. Epstein LB, Epstein CJ. Localization of the gene AVG for the antiviral expression of immune and classical interferon to the distal portion of the long arm of chromosome 21. *J Infect Dis*. 1976; 133: 56-62.

35. Fedi Jr PF, Vernino AR. Fundamentos da periodontia. 3. ed. São Paulo: Premier; 1998.
36. Folwaczny M, Glas J, Török HP, Tonenchi L, Paschos E, Bauer B, et al. Polymorphisms of the interleukin-18 in periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 2005; 32: 530-4.
37. Franciotta D, Verri A, Zardini E, Andreoni L, Amici M, Moratti R et al. Interferon gamma and interleukin 4 producing T cells in Down's síndrome. *Neurosci Lett.* 2006; 395: 67-70.
38. Fujihashi K, Kono Y, Beagley KW, Yamamoto M, McGhee JR, Mestecky J, et al. Cytokines and periodontal disease: immunopathological role of interleukins for B cell responses in chronic inflamed gingival tissues. *J Periodontol.* 1993; 64: 400-6.
39. Galbraith GM, Steed RB, Sanders JJ, Pandey JP. Tumor necrosis factor alpha production by oral leukocytes: influence of tumor necrosis factor genotype. *J Periodontol.* 1998; 69: 428-33.
40. Garlet GP, Avila-Campos MJ, Milanezi CM, Ferreira BR, Silva JS. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced periodontal disease in mice: patterns of cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression and leukocyte migration. *Microbes Infect.* 2005; 7: 738-47.

41. Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Ávila-Campos MJ, Cunha FQ et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actionobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21: 12-20.
42. Garlet GP, Martins W Jr, Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontal Res.* 2003; 38: 210-7.
43. Garlet GP, Martins W Jr, Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2004; 31: 671-9.
44. Gerdes AM, Hørder M, Bonnevie-Nielsen V. Gene dosage and down-regulation of the alpha-interferon receptor. *Scand J Clin Lab Invest.* 1992; 52: 189-92.
45. Gerdes AM, Hørder M, Petersen PH, Bonnevie-Nielsen V. Effect of increased gene dosage expression on the alpha-interferon receptors in Down's syndrome. *Biochim Biophys Acta.* 1993; 1181: 135-40.

46. Górska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madalinski K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 1046-52.
47. Gregory L, Williams R, Thompson E. Leucocyte function in Down's syndrome and acute leukaemia. *Lancet*. 1972; 1: 1359-61.
48. Grollmus ZCN, Chávez MCM, Donat FJS. Periodontal disease associated to systemic genetic disorders. *Med Oral Patol Cir Bucal* 2007; 12: E211-5.
49. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal disease. *Periodontol*. 1994; 5: 78-111.
50. Halinen S, Sorsa T, Ding Y, Ingman T, Salo T, Konttinen YT, et al. Characterization of matrix metalloproteinase (MMP-8 and -9) activities in the saliva and in gingival crevicular fluid of children with Down's syndrome. *J Periodontol*. 1996; 67: 748-54.
51. Hamilton TA, Ohmori Y, Tebo J. Regulation of chemokine expression by anti-inflammatory cytokines. *Immunol Res*. 2002; 25: 229-45.
52. Hanookai D, Nowzari H, Contreras A, Morrison JL, Slots J. Herpesvirus and periodontopathic bacteria in Trisomy 21 periodontitis. *Journal of Periodontology* 2000; 376-84.

53. Haque SJ, Williams BR. Signal transduction in the interferon system. *Semin Oncol.* 1998; 25: 14-22.
54. Harada H, Fujita T, Miyamoto M, Kimura Y, Maruyama M, Furia A et al. Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. *Cell.* 1989; 58: 729-39.
55. Harada H, Takahashi E, Itoh S, Harada K, Hori TA, Taniguchi T. Structure and regulation of the human interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 genes: implications for a gene network in the interferon system. *Mol Cell Biol.* 1994;14: 1500-9.
56. Hassold T, Sherman S. Down syndrome: genetic recombination and the origin of the extra chromosome 21. *Clin Genet.* 2000; 57: 95-100.
57. Honda T, Domon H, Okui T, Kajita K, Amanuma R, Yamazaki K. Balance of inflammatory response in stable gingivitis and progressive periodontitis lesions. *Clin Exp Immunol.* 2006; 144: 35-40.
58. Hook EB, Cross PK, Schreinemachers DM. Chromosomal abnormality rates at amniocentesis and in live-born infants. *J Am Med Assoc.* 1983; 249: 2034-8.
59. Horewicz VV, Furuse C, Araújo VC, Cury PR. Susceptibilidade genética à periodontite crônica. *Rev Periodontia.* 2006; 16: 96-110.

60. Issacs A, Lindenman J. Virus Interference I. The Interferon. Proc R Soc. 1957; 147: 258-67.
61. Ito S, Ansari P, Sakatsume M, Dickensheets H, Vazquez N, Donnelly RP, et al. Interleukin-10 inhibits expression of both Interferon alpha-and interferon gamma-induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. Blood. 1999; 93: 1456-63.
62. Iwamoto T, Yamada A, Yuasa K, Fukumoto E, Nakamura T, Fujiwara T et al. Influences of interferon-gamma on cell proliferation and interleukin-6 production in Down syndrome derived fibroblasts. Arch Oral Biol. 2009; 54: 963-9.
63. Izumi Y, Sugiyama S, Shinozuka O, Yamazaki T, Ohyama T, Ishikawa I. Defective neutrophil chemotaxis in Down's syndrome patients and its relationship to periodontal destruction. J Periodontol. 1989; 60: 238-42.
64. Johnson GK, Slach NA. Impact of tobacco use on periodontal status. J Dent Educ. 2001; 65: 313-21.
65. Johnstone SC, Barnard KM, Harrison VE. Recognizing and caring for the medically compromised child: children with other chronic medical conditions. Dent Update. 1999; 26:21-6.
66. Jonasch E, Haluska FG. Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. The Oncologist. 2001; 6: 34-55.



67. Kajita K, Honda T, Amanuma R, Domon H, Okui T, Ito H et al. Quantitative Messenger RNA expression of Toll-like receptors and interferon- $\alpha$ 1 in gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.* 2007; 22: 398-402.
68. Khan AJ, Evans HE, Glass L, Skin YH, Almonte D. Defective neutrophil chemotaxis in patients with Down syndrome. *J Pediatr.* 1975; 87: 87-9.
69. Komatsu T, Kubota E, Sakai N. Enhancement of matrix metalloproteinase (MMP)-2 activity in gingival tissue and cultured fibroblasts from Down's syndrome patients. *Oral Dis.* 2001; 7: 47-55.
70. Lang N, Bartold PM, Cullinan M, Jeffcoat M, Mombelli A, Murakami S, et al. Consensus report: aggressive periodontitis. *Ann Periodontol.* 1999; 4: 53.
71. Lascala NT, Moussalli NH. *Periodontia clínica: especialidades afins.* São Paulo: Artes Médicas; 1980.
72. Lee SH, Kim KK, Choi BK. Upregulation of intercellular adhesion molecule 1 and proinflammatory cytokines by the major surface proteins of *Treponema maltophilum* and *Treponema lecithinolyticum*, the phylogenetic group IV oral spirochetes associates with periodontitis and endodontic infections. *Infect Immun.* 2005; 73: 268-76.

73. Lehtonen A, Matikainen S, Julkunen I. Interferons up-regulate *STAT1*, *STAT2*, and *IRF* family transcription factor gene expression in human peripheral blood mononuclear cells and macrophages. *J Immunol.* 1997; 159: 794-803.
74. Lin SJ, Wang JY, Klickstein LB, Chuang KP, Chen JY, Lee JF. Lack of age-associated LFA-1 up-regulation and impaired ICAM-1 binding in lymphocytes from patients with down syndrome. *Clin Exp Immunol.* 2001; 126: 54-63.
75. Linden GJ, Mullally BH, Freeman R. Stress and the progression of periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1996; 23: 675-80.
76. Lindhe J. Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral. In: Nyman S, Lindhe J. Exame de pacientes com doença periodontal. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005; p. 391-403.
77. Lohoff M, Mak TW. Roles of interferon- regulatory factors in T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5: 125-35.
78. Löseke S, Grage-Griebenow E, Wagner A, Gehlhar K, Bufe A. Differential expression of IFN-alpha subtypes in human PBMC: evaluation of novel real-time PCR assays. *J Immunol Methods.* 2003; 276: 207-22.
79. Loureiro ACA, Costa FO, Costa JE. The impact of periodontal disease on the quality of life of individuals with Down syndrome. *Downs Syndr Res Pract.* 2007; 12: 50-4.

80. Maroun LE. Interferon action and chromosome 21 trisomy (Down Syndrome): 15 years later. *J Theor Biol.* 1996; 181: 41-6.
81. McGuire NK, Nunn ME. Prognosis versus actual outcome. IV. The effectiveness of clinical parameters and IL-1 genotype in accurately predicting prognoses and tooth survival. *J Periodontol.* 1999; 70: 49-56.
82. Mealy BL. Diabetes and periodontal disease: two sides of a coin. *Compend Contin Educ Dent.* 2000; 21: 943-6.
83. Merlin G, Falcoff E, Aguet M. 125I-labelled human interferons-alpha, beta and gamma: comparative receptor-binding data. *J Gen Virol.* 1985; 66: 1149-52.
84. Mian BM, Dinney CP, Bermejo CE, Sweeney P, Tellez C, Yang XD, Gudas JM, McConkey DJ, Bar-Eli M. Fully human anti-interleukin 8 antibody inhibits tumor growth in orthotopic bladder cancer xenografts via down-regulation of matrix metalloproteases and nuclear factor-kappaB. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 3167-75.
85. Miyamoto M, Fujita T, Kimura Y, Maruyama M, Harada H, Sudo Y, Miyata T, Taniguchi T. Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. *Cell.* 1988; 54: 903-13.
86. Modeer T, Barr M, Dahllof G. Periodontal disease in children with Down's syndrome. *Scand J Dent Res.* 1990; 98: 228-34.

87. Mogensen KE, Vignaux F, Gresser I. Enhanced expression of cellular receptors for human interferon- $\alpha$  on peripheral lymphocytes from patients with Down's syndrome. *FEBS Lett.* 1982; 140: 285-7.
88. Murphy M, Friend DS, Pike-Nobile L, Epstein LB. Tumor necrosis factor-alpha and IFN-gamma expression in human thymus. Localization and overexpression in Down syndrome (trisomy 21). *J Immunol.* 1992; 149: 2506-12.
89. Mustacchi Z, Peres S. *Genética baseada em evidências.* São Paulo: CID; 2000.
90. Mustacchi Z, Rozone G. *Síndrome de Down. Aspectos clínicos e odontológicos.* São Paulo: CID; 1990.
91. Nascimento AN. Nascem cerca de 8 mil bebês com Síndrome de Down por ano [citado 2009 Dez 12]. Disponível em: <http://www.ufv.br/dbg/BIO240/DG111.htm>
92. Nizetic D. Function Genomics of the Down Syndrome. *Croat Med J.* 2001; 42: 421-7.
93. Otsuka Y, Ito M, Yamaguchi M, Saito S, Uesu K, Kasai K et al. Enhancement of lipopolysaccharide-stimulated cyclooxygenase-2 mRNA expression and prostaglandin E2 production in gingival fibroblasts from individuals with Down syndrome. *Mech Ageing Dev.* 2002; 123: 663-74.
94. Pennisi E. And the gene number is...?. *Science.* 2000; 288: 1146-7.

95. Pestka S. The human interferon-alpha species and hybrid proteins. *Semin Oncol.* 1997; 24: 4-17.
96. Pfeffer LM, Dinarello CA, Herberman RB et al. Biological properties of recombinant alpha-interferons: 40<sup>th</sup> anniversary of the discovery of interferons. *Cancer Res.* 1998; 58: 2489-99.
97. Pine R, Canova A, Schindler C. Tyrosine phosphorylated p91 binds to a single element in the ISGF2/IRF-1 promoter to mediate induction by IFN alpha and IFN gamma, and is likely to autoregulate the p91 gene. *EMBO J.* 1994; 13: 158-67.
98. Prabhu A, Michalowicz BS, Mathur A. Detection of local systemic cytokines in adult periodontitis. *J. Periodontol.* 1996; 67: 515-22.
99. Reboul J, Gardiner K, Monneron D, Uzé G, Lutfalla G. Comparative genomic analysis of the interferon/interleukin-10 receptor gene cluster. *Genome Res.* 1999; 9: 242-50.
100. Remoli ME, Giacomini E, Lutfalla G, Dondi E, Orefici G, Battistini A et al. Selective expression of type I IFN genes in human dendritic cells infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 2002; 169: 366-74.
101. Reuland-Bosma W, van der Reijden WA, van Winkelhoff AJ. Absence of a specific subgingival microflora in adults with Down's syndrome. *J Clin Periodontol.* 2001, 28: 1004-9.

102. Reuland-Bosma W, van Dijk J, van der Weele. Experimental gingivitis around deciduous teeth in children with down's syndrome. *J Clin Periodontol.* 1986; 13: 294-300.
103. Rey SC, Birman EG. Odontologia e síndrome de Down: aspectos crânio-faciais. In: Mustacchi Z, Rozone G. Síndrome de Down: aspectos clínicos e odontológicos. São Paulo: CID; 1990. p. 198-217.
104. Roberts FA, McCaffery KA, Michalek SM. Profile of cytokine mRNA expression in chronic adult periodontitis. *J Dent Res.* 1997; 76: 1833-39.
105. Sághy T The periodontal alterations in Down syndrome. A literature review. *Fogorv Sz.* 2008; 101: 113-118.
106. Sakellari D, Arapostathis KN, Konstantinidis A. Periodontal conditions and subgingival microflora in Down syndrome patients. A case-control study. *J Clin Periodontol.* 2005; 32: 684-90.
107. Sakellari D, Belibasakis G, Chadjipadelis T, Arapostathis K, Konstantinidis A. Supragingival and subgingival microbiota of adult patients with Down's syndrome. Changes after periodontal treatment. *Oral Microbiol Immunol.* 2001; 16: 376-82.

108. Sakuta T, Tokuda M, Tamura M, Jimi E, Ikebe T, Koba T et al. Dual regulatory effects of interferon-alpha, -beta, and -gamma on interleukin-8 gene expression by human gingival fibroblasts in culture upon stimulation with lipopolysaccharide from *Prevotella intermedia*, interleukin-1alpha, or tumor necrosis factor-alpha. *J Dent Res.* 1998; 77: 1597-605.
109. Sasaki Y, Sumi Y, Miyazaki Y, Hamachi T, Nakata M. Periodontal management of an adolescent with Down's syndrome – a case report. *Int J Paediatr Dent.* 2004; 14: 127-35.
110. Savva GM, Morris JK, Mutton DE, Alberman E. Maternal age-specific fetal loss rates in Down syndrome pregnancies. *Prenat Diagn.* 2006; 26: 499-504.
111. Saxen L, Aula S. Periodontal bone loss in patients with Down's syndrome. A follow-up study. *J Periodontol.* 1982; 53: 158-62.
112. Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB, Camargo LE, Line SR. Interleukin 10 gene promoter polymorphisms are associated with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2004; 31: 443-8.
113. Scotese I, Gaetaniello L, Matarese G, Lecora M, Racioppi L, Pignata C. T cell activation deficiency associated with an aberrant pattern of protein tyrosine phosphorylation after CD3 perturbation in Down's syndrome. *Pediatr Res.* 1998; 44: 252-8.

114. Shapira L, Stabholz A, Rieckmann P, Kruse N. Genetic polymorphism of the tumor necrosis factor (TNF)-alpha promoter region in families with localized early-onset periodontitis. *J Periodontol Res.* 2001; 36: 183-6.
115. Shen EC, Gau CH, Hsieh YD, Fu E. Periodontal status in postmenopausal osteoporosis: a preliminary clinical study in Taiwanese women. *J Chin Med Assoc.* 2004; 67: 389-93.
116. Shirodaria S, Smith J, McKay IJ, Kennett CN, Hughes FJ. Polymorphisms in the IL1-A gene are correlated with levels of interleukin-1alpha protein in gingival crevicular fluid of teeth with severe periodontal disease. *J Dent Res.* 2000; 79: 1864-9.
117. Sreedevi H, Munshi AK. Neutrophil chemotaxis in down syndrome and normal children to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Pediatr Dent.* 1998; 22: 141-6.
118. Swallow NJ. Dental disease in children with Down's syndrome. *J Ment Defic Res.* 1964; 8: 102-18.
119. Takaoka A, Yanai H. Interferon signalling network in innate defence. *Cell Microbiol.* 2006; 8: 907-22.
120. Tayal V, Kalra BS. Cytokines and anti-cytokines as therapeutics – An update. *Eur J Pharmacol.* 2008; 579: 1-12.
121. Tonetti, MS, Mombelli A. Early onset periodontitis. *Ann Periodontol.* 1999; 4: 39-53.



122. Torre D, Broggin M, Zeroli C, Agrifoglio L, Bottà V, Casalone R et al. Serum levels of gamma interferon in patients with Down's syndrome. *Infection*. 1995; 23: 66-7.
123. Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, de Brito RB Jr, de Souza AP, Line SR. Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. *J Clin Periodontol*. 2003; 30: 438-42.
124. Ukai T, Mori Y, Onoyama M, Hara Y. Immunohistological study of interferon- $\gamma$  and interleukin-4 bearing cells in human periodontitis gingival. *Arch Oral Biol*. 2001, 46: 901-8.
125. Vieira JD, Ribeiro EL, Campos Cde C, Pimenta FC, Toledo OA, Nagato GM et al. *Candida albicans* isolated from buccal cavity of children with Down's syndrome: occurrence and growth inhibition by *Streptomyces* sp *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005; 38: 383-6.
126. Wang Y, Liu D, Chen P, Koeffler HP, Tong X, Xie D. Negative feedback regulation of IFN-gamma pathway by IFN regulatory factor 2 in esophageal cancers. *Cancer Res*. 2008; 68: 1136-43.
127. Warburton D, Dallaire L, Thangavelu M, Ross L, Levin B, Kline J. Trisomy recurrence: a reconsideration based on North American data. *Am J Hum Genet*. 2004; 75: 376-85.
128. Wright HJ, Matthews JB, Chapple ILC, Ling-Mountford N, Copper PR. Periodontitis associates with a type 1 IFN signature in peripheral blood neutrophils. *J. Immunol*. 2008; 181: 5575-84.

129. Yamazaki K, Nakajima T, Kubota Y, Gemmell E, Seymour GJ, Hara K. Cytokine Messenger RNA expression in chronic inflammatory periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol.* 1997; 12: 281-7.
130. Zigmond M, Stabholz A, Shapira J, Bachrach G, Chaushu G, Becker A et al. The outcome of a preventive dental care on the prevalence of localized aggressive periodontitis in Down'n syndrome individuals. *J Intellect Disabil Res.* 2006; 50: 492-500.



*Anexo*

## 9 Anexo

### I – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa para análise in vivo



Autorizo a reprodução deste trabalho.  
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 12 de março de 2010

MARCIA HIROMI TANAKA