

LÍCIA BEZERRA CAVALCANTE

EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA
RESPOSTA IMUNE DE INDIVÍDUOS COM
SÍNDROME DE DOWN FRENTE À DOENÇA
PERIODONTAL

Orientadora:

Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

Araraquara

2008

**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA**

LÍCIA BEZERRA CAVALCANTE

**EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA
RESPOSTA IMUNE DE INDIVÍDUOS COM SÍNDROME
DE DOWN FRENTE À 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 para obtenção do título de Mestre em Odontopediatria.

Orientadora:

Profa. Dra. Raquel M. Scarel Caminaga

Araraquara

2008

LÍCIA BEZERRA CAVALCANTE

**EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA IMUNE
DE INDIVÍDUOS COM SÍNDROME DE DOWN FRENTE À
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: Prof. Dr. Sergio Roberto Peres Line

Araraquara, 29 de julho de 2008.

DADOS CURRICULARES

Lícia Bezerra Cavalcante

NASCIMENTO	18 de Setembro de 1981 – Maceió/AL
FILIAÇÃO	José Carlos Cavalcante Maria Líbia Bezerra Filha
2000/2005	Curso de graduação em Odontologia Universidade Federal de Alagoas
2005/2006	Estágio de Atualização na disciplina de Odontopediatria Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2007/2008	Curso de Pós-Graduação em Pacientes com Necessidades Especiais. Nível de Especialização, Faculdade São Leopoldo Mandic
2007/2008	Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de concentração Odontopediatria. Nível Mestrado, Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Dedicatória

A Deus,

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

À minha mãe Líbia,

Minha fonte de energia, força e amor. Sempre ao meu lado em todos os momentos. Minha verdadeira inspiração.

Ao meu pai Carlos,

Que sempre me apoiou nas minhas decisões.

Ao meu namorado Bruno,

Mesmo com todo esse tempo de namoro a distância, sempre estive muito presente em todas as etapas vividas. Obrigada por todas as viagens feitas para Araraquara, pelo incentivo e por toda a compreensão.

Aos meus irmãos Lula e Caê,

Por fazerem minha vida tão animada e feliz. Sempre me incentivando a buscar meus sonhos.

Dedicatória

Às minhas Primas-irmãs Aninha, Mari, Cris e Lalita,

Que mesmo distantes conseguem confortar a saudade com palavras de carinho e amor.

Às minhas segunda mãe (Rita e Fátima)

Amores da minha vida que sempre me ajudaram a confortar a distância. Faziam questão de ir me visitar mesmo quando eu passava tão pouco tempo em Maceió.

A Reje, Lara e Tuka,

Por conseguirem amenizar minhas ansiedades com atos e palavras.

Agradecimentos especiais

A Profa. Dra. Raquel M. Scarel Caminaga,

Agradeço pelo convite de trabalhar com você em um momento tão decisivo da minha vida. Agradeço pela orientação desta dissertação e os momentos de ensinamento no laboratório. Obrigada por ter me ajudado nas situações de incertezas.

A Profa. Dra. Elisa Maria Ap. Giro,

Muito obrigada por todo ensinamento transmitido, pela ajuda na coleta das amostras, pelas palavras de tranquilidade e por ter me mostrado a verdadeira essência no atendimento aos pacientes com necessidades especiais.

A Márcia Tanaka,

Minha amiga e companheira em TODOS os momentos da pesquisa. Sempre me acalmando e ajudando no desenvolvimento desse trabalho. Amiga só você sabe todos os momentos de incertezas, dúvidas e conquista que passamos sempre juntas. Muito obrigada.

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, Josimere Hebling, Lourdes Aparecida Martins dos Santos-Pinto e Rita de Cássia Loiola Cordeiro, pela recepção e convivência agradável. Obrigada pela oportunidade.

Às minhas queridas amigas Fernanda Lessa, Lalita, Andreza, Yeon, Aline, Fer Bello e Carol por todos os momentos compartilhados nas dificuldades e alegrias. Obrigada amigas por fazerem minha temporada em Araraquara mais feliz.

Às amigas de curso de mestrado Ana Luiza, Camila, Elcilaine, Hérica e Indri pelo apoio e ajuda durante todo o curso. Ana obrigada por sempre ter sido tão sincera e espontânea, Ca valeu pela ajuda durante o atendimento aos pacientes, Laine (senhora e-mail) obrigada por nos ajudar a organizar as clínicas e emergências, Heriquete obrigada pelos papos e pela bondade sempre disposta a ajudar a quem precisa. A querida amiga Indri por compartilhar os almoços, trabalhos e alegrias. Muito obrigada a todas.

Agradecimentos

Aos amigos da Pós-graduação Andreza, Cármen, Emi, Érika, Fernanda, Hermes, Jonas, Juliana, Luciana, Michele, Murilo, Nancy e Simone pelo carinho e convivência compartilhados durante todo o curso.

Pelas 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 colegas de laboratório Carina, Karen e River pela ajuda fornecida sempre que precisei.

Aos professores Valfrido (cirurgia) e Juliane (emergência) 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 Pediatria Dona Odete, Dulce, Tânia e Cristina pela convivência e ajuda durante as clínicas.

As secretárias do Departamento da Clínica Infantil Celinha e Soninha por sempre estarem disponíveis a ajudar.

Agradecimentos

Aos funcionários do laboratório de ortodontia Pedrinho e Totó pelas aparelhos, alicates e moldeiras que eram fornecidos quando precisava.

A todos os funcionários da Pós-graduação por toda atenção e eficiência.

Aos funcionários da biblioteca pela convivência agradável e ajuda durante as pesquisas bibliográficas.

À todos os funcionários das APAEs que nos recebeu de forma tão carinhosa e sempre acreditou em nosso trabalho.

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

Aos mestres Eneida e Amaro que me apoiaram desde o início da vida acadêmica, despertando o interesse e curiosidade nesse meio.

A 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.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	12
Resumo	13
Abstract	16
1 Introdução	19
2 Revisão da literatura	23
2.1 Síndrome de Down	24
2.2 Doença Periodontal	28
2.3 Síndrome de Down e Doença Periodontal	29
2.4 Imunogenética	33
3 Proposição	40
4 Material e método	42
4.1 Delineamento do Estudo e Seleção da Casuística	43
4.2 Exame Clínico Periodontal	45
4.3 Análise da Expressão Genética	46
4.3.1 Obtenção de Tecido Gengival	46
4.3.2 Obtenção de RNA Humano	46
4.3.3 Reações de Transcrição Reversa	48
4.3.4 Reações de PCR quantitativo em Tempo Real	49
4.4 Análise Estatística dos Resultados	52
5 Resultado	54

6 Discussão	74
7 Conclusão	87
8 Referências	89
9 Anexos	104

LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA: Ácido Desoxirribonucléico complementar
 CD4+: glicoproteína presente na superfície do linfócito T
 CD8+: glicoproteína transmembrana do linfócito T
 CD4+CD45RA+: sub divisão da glicoproteína de superfície do linfócito T
 COX-2: Ciclooxigenase 2
 CuZnSOD 1: Enzima cobre-zinco-superóxido-dismutase 1
 DEPC: água tratada com Dietil Pirocarbonato, livre de RNAses, DNAses e resíduos de proteínas
 DP: Doença Periodontal
ICAM1: gene Molécula de Adesão Intercelular 1
 ICAM -1: Proteína da Molécula de Adesão Intercelular 1
 IFN- γ : Interferon- γ
 IgG1: Imunoglobulina 1
IL10: gene Interleucina 10
 IL-10: Proteína Interleucina 10
 IL-6: Proteína Interleucina 6
 IL-12: Proteína Interleucina 12
 IL-13: Proteína Interleucina 13
IL10RA: gene Interleucina 10 receptor alfa
 IL-10RA: Proteína Interleucina 10 receptor alfa
IL10RB: gene Interleucina 10 receptor beta
 IL-10RB: Proteína Interleucina 10 receptor beta
IP10: gene da Proteína 10 Induzível por Interferon Gama
 IP-10: Proteína 10 Induzível por Interferon Gama
JAK1: gene Janus-quinase 1
 JAK-1: Proteína Janus-quinase 1
 LFA-1: Antígeno 1 associado à Função de Linfócitos
 LPS: lipopolissacarídeo
 MMPs: Metaloproteinases
 PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
 PGE₂: Prostaglandina E₂
 PMN: Polimorfonucleares
 qRT-PCR: Reação de PCR quantitativo em tempo real
 RNA: Ácido Ribonucléico
 SBE: Elemento Ligador da proteína STAT
 SD: Síndrome de Down
SOCS3: gene Supressor de Sinalização da Citocina 3
Socs 3: gene Supressor de Sinalização da Citocina 3 em camudongo
STAT3: gene Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 3
 STAT-3: Proteína Transdutora de Sinal e Ativador da Transcrição 3
 TCR/CD3: receptor celular de linfócito T/ glicoproteína de linfócito T
 Th1: Linfócito T auxiliar 1
 Th2: Linfócito T auxiliar 2
 TNF: Fator de Necrose Tumoral
 ZAP-70: cadeia ZETA associada a proteína quinase

Resumo

Cavalcante LB. Expressão de genes envolvidos na resposta imune de indivíduos com Síndrome de Down frente à doença periodontal. [dissertação mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

Resumo

Vários periodontopatógenos podem colonizar muito precocemente a cavidade bucal de indivíduos com Síndrome de Down (SD). Isso reflete a alta prevalência (40%) de Doença Periodontal (DP) em adolescentes com SD, que evolui para cerca de 100% em indivíduos com idade próxima aos 30 anos. A higienização oral deficiente dos indivíduos com SD não é capaz de isoladamente explicar a destruição periodontal severa nesses indivíduos. Esta pesquisa investigou a expressão dos genes *IL10* (interleucina 10), *IL10RA*, *IL10RB* (receptores Alfa e Beta da IL-10), *JAK1* (janus-quinase 1), *STAT3* (transdutor de sinal e ativador da transcrição 3), *SOCS3* (supressor de sinalização de citocina 3), *IP10* (proteína 10 induzível por interferon gama) e *ICAM1* (molécula de adesão intercelular 1) em indivíduos com Síndrome de Down com Doença Periodontal e sem DP em relação a indivíduos sem SD com e sem DP. Fizeram parte deste estudo 80 indivíduos entre 6 e 61 anos de idade subdivididos em 4 grupos: Síndrome de Down com Doença Periodontal (SDcDP); indivíduos com SD sem DP (SDsDP); indivíduos não-sindrômicos com DP (CcDP) e indivíduos não-sindrômico sem DP (CsDP). A expressão gênica foi investigada por meio de quantificação relativa utilizando a técnica da

reação em cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real com o sistema *Sybr Green*. Obteve-se como resultado uma superexpressão do gene IL10 em indivíduos não-sindrômico com DP e uma menor expressão em indivíduos com SD. Nos indivíduos com SD houve uma superexpressão do IL10RB. Observou-se que os genes SOCS3, IP10 e ICAM1 foram responsivos à IL10. Portanto, a SD interfere na sinalização da IL10, causando assim uma imunodeficiência nesses indivíduos e a DP proporciona uma maior sinalização da IL10 gerando um processo antiinflamatório.

Palavras-chave: Síndrome de Down; doenças periodontais; Interleucina - 10.

Abstract

Cavalcante LB. Expression of the genes involved in the immune response of individuals with Down syndrome and periodontal disease [dissertação mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

Abstract

Many periodontopathogens can colonize the oral cavity early in individuals with Down syndrome (DS). This reflects the high prevalence (40%) of periodontal disease (PD) in adolescents with DS and affects nearly 100% of these individuals when they are around 30 years old. The severe periodontal destruction that occurs in these individuals cannot be explained by poor oral hygiene alone. This study investigated individuals with DS and PD and individuals with DS without PD regarding the expression of the genes *IL10* (interleukin 10), *IL10RA*, *IL10RB* (IL-10 alpha and beta receptors), *JAK1* (janus kinase), *STAT3* (signal transducer and activator of transcription 3), *SOCS3* (suppressor of cytokine signaling 3), IP10 (gamma interferon-induced protein) and *ICAM1* (intercellular adhesion molecule-1). Eighty individuals aging from 6 to 61 years of age participated in this study and were divided into 4 groups: Down syndrome with periodontal disease (DSwPD); Down syndrome without periodontal disease (DSoPD); individuals without Down syndrome (control) with PD (CwPD) and control without PD (CoPD). Gene expression was investigated by relative quantification using the real-time polymerase chain reaction technique (Real-time PCR) with the system Sybr Green. A superexpression of the gene *IL10* was found in individuals with PD and a

smaller expression in individuals with DS. A superexpression of IL10RB was found in individuals with DS. The genes SOCS3 and ICAM1 were responsive to IL10. Therefore, DS interferes in IL10 signaling thus causing an immune deficiency in these individuals and PD promotes greater IL10 signaling, generating an anti-inflammatory process.

Keywords: Down Syndrome; periodontal diseases; Interleukin - 10.

Introdução

1 Introdução

Um grupo de indivíduos com comprometimento intelectual e algumas características fenotípicas marcantes foi descrito em 1866 por John Langdon Down, vindo a ser denominada “Síndrome de Down” (SD)²⁴. Em 1959 foi identificado que a SD é causada pela Trissomia do cromossomo 21⁵⁴. Atualmente, sabe-se que a trissomia do cromossomo 21 ocorre devido a mecanismo de não disjunção. Além disso, a SD também pode ser causada por translocação geralmente entre o cromossomo 21 e o cromossomo 15 ou 14 em cerca de 2% dos afetados. Essa mesma freqüência dos indivíduos com SD são do tipo mosaicos, ou seja, possuem uma população de células com 46 cromossomos e outra com a Trissomia do cromossomo 21. Existe forte correlação entre idade materna e incidência de SD³⁵, sendo que o material cromossômico adicional tem origem materna em 89,4% dos casos³⁶.

Apesar de existirem características clínicas bem marcantes na SD, a presença delas é bastante variável entre os afetados. Como características clínicas mais freqüentes entre os indivíduos com SD estão: comprometimento intelectual (100%), hipotonia (99%), microcefalia (85%), epicanto e prega única transversa (40%), clinodactilia do 5º dedo e malformações cardíacas (50%), entre outras. As principais manifestações orais da SD são: palato ogival, macroglossia, língua fissurada, prevalência reduzida de cárie e aumentada de doença periodontal⁶⁷. Crianças com SD exibem menor número de *Streptococcus* do grupo *mutans* na saliva e

maior pH salivar⁹⁴. A prevalência de Doença Periodontal em adolescentes com SD é de 30% a 40%, sendo que em indivíduos com idade próxima aos 30 anos a prevalência sobe para cerca de 100%⁷⁵.

Indivíduos com comprometimento intelectual apresentam higienização bucal precária, e esse fator é importante para o surgimento da DP. Entretanto, a higienização oral 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 semelhante retardo mental^{21,95}.

Os indivíduos com SD apresentam algumas alterações no sistema imune. Foram observadas funções diminuídas de quimiotaxia e fagocitose por neutrófilos e leucócitos^{4,45}; além do desbalanço nas subpopulações de linfócitos T⁹ e ativação defeituosa dos mesmos⁸⁵. Alguns pesquisadores acreditam que tais características podem contribuir para o alto índice de DP nesses indivíduos quando comparados com indivíduos normais ou com deficiência mental^{7,75}.

Tem crescido o número de publicações científicas que investigam o envolvimento imunogenético da DP em indivíduos normais^{30,62,84,90,97}. Apesar de tais estudos contribuírem muito para a elucidação da etiopatogênese da DP, é importante também investigar qual o papel de citocinas e seus receptores na DP frente à SD. O papel de algumas citocinas reconhecidamente importantes na DP, como a

Interleucina 10 (IL10) ainda não foi investigado em indivíduos com SD. Desta forma, mostra-se importante conhecer a resposta imunogenética de indivíduos com SD que apresentam DP.

Revisão de literatura

2 Revisão de literatura

2.1 Síndrome de Down

Segundo o Censo de 2000 do IBGE há no Brasil cerca de 300 mil indivíduos com Síndrome de Down e, anualmente nascem cerca de 8 mil brasileiros com a síndrome⁷³.

O cromossomo 21 contém aproximadamente 225 genes, o que corresponde a menos de 1% de todo genoma humano, sendo assim, o menor cromossomo existente no ser humano⁷². Este fato faz com que a trissomia do cromossomo 21 seja a condição aneuplóide mais comum compatível com a sobrevivência a termo⁶⁷. Apesar disso, a taxa de aborto espontâneo de fetos com SD é de 25% em média, subindo para 33% para mães com idade mais avançada, até 45 anos⁸⁰. 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%)¹¹.

A SD causada por um cromossomo 21 extra é chamada Trissomia Simples e ocorre em 95% dos casos. Estudos recentes evidenciaram que 89,4% dos casos de indivíduos com SD tem como etiologia a não-disjunção cromossômica durante a meiose materna, 8,8% durante a meiose paterna e 1,8% dos casos tem origem na não disjunção durante a mitose do zigoto (Mosaicismo)³⁶.

A SD também pode ser causada por translocação geralmente entre o cromossomo 21 e o 14 ou 15, que são todos cromossomos acrocêntricos¹². Para ocorrer a translocação os cromossomos sofrem quebras nas regiões centroméricas, de forma que 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. Esse tipo de translocação é chamada Robertsoniana e é responsável por 2,2% dos casos de SD⁶⁷. Em alguns casos (1%) a translocação ocorre entre o cromossomo 21 e o 21 ou 22⁶⁸.

Alguns indivíduos com SD possuem uma população de células com 46 cromossomos e outra com a Trissomia do 21, ou seja, são do tipo Mosaico (1,8%)³⁶. 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.

Há forte correlação entre a idade materna e a geração de filhos com SD, ou seja, numa mulher com 30 anos o risco é 1:1000, e com 40 anos a chance de ter um filho afetado é de 9:1000 nascidos vivos^{39,44}. 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, pois a gametogênese fica estacionada por muitos anos no fim da prófase I¹².

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

De forma geral, o risco de recorrência da SD é de 1%, ou seja, mulheres que já tiveram um filho com SD (seja por Trissomia Simples, por Translocação ou Mosaicismo) têm 1% de chance de ter outro filho com a mesma síndrome¹⁵. 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 SD⁹⁹.

A SD é uma condição complexa com 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 21¹⁶. 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^{67,69}. Existem outros sinais de menor comprometimento médico, mas que são úteis na caracterização da SD: baixa estatura, boca entreaberta (devido a macroglossia e/ou hipotonia), epicanto, mãos curtas e largas com uma única prega palmar transversa (linha simiesca – 40%), quinto dedo encurvado (clinodactilia)⁶⁷. Indivíduos com SD também apresentam senilidade prematura, provavelmente relacionada a um dano aos lipídios de células nervosas¹³. 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)⁶⁹.

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 periodontal⁶⁸. Também são observadas anomalias dentárias como a presença de dentes conóides, oligodontia e retardo na erupção dentária⁷⁷, microdontia, hipocalcificação dos dentes, fusão e geminação dentária¹⁸.

Pelo fato de indivíduos com SD manifestarem várias complicações clínicas, é necessário que a anamnese e o exame clínico nesses indivíduos sejam cuidadosos e detalhados para que os

procedimentos médicos e odontológicos a serem realizados não tragam danos à saúde do paciente.

Especificamente quanto aos procedimentos odontológicos invasivos a serem realizados em indivíduos com SD, 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 endocardite⁵.

Apesar da maior freqüência de distúrbios clínicos importantes, indivíduos com SD que recebam o mais precocemente possível cuidados médicos e odontológicos adequados, além de educação que atenda às suas necessidades especiais, podem ter um bom desenvolvimento neuromotor e da capacidade de socialização, de forma que eles e seus familiares podem possuir 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 específicas³³.

Algumas bactérias têm relação direta com a doença periodontal como o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*,

Porphyromonas gingivalis, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola*, entre outras. Essas bactérias iniciam e perpetuam a inflamação podendo causar destruição no periodonto⁹⁶. Além das bactérias, a resposta imunoinflamatória é necessária para determinar o grau de destruição dos tecidos periodontais⁴⁰.

Além dos periodontopatógenos e da resposta do hospedeiro o caráter multifatorial da DP sofre influência de fatores de risco como o fumo⁴³ e diabetes⁶³, além de indicadores de risco como stress⁵⁷ e osteoporose⁸⁸. 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 Doença Periodontal. Citocinas como a IL-4, IL-6, IL-10, IL-18 e TNF- α tiveram relação positiva ou negativa com a DP dependendo da população estudada^{27,29,47,84,87}.

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 oral 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^{21,95}.

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%⁷⁵. Cichon et al.¹⁹ (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 SD³. *Aggregatibacter*

actinomycetemcomitans (A.a.) está associado a Periodontite Agressiva e é considerado importante na periodontite de indivíduos SD⁶.

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^{4,45,93}, relacionada inclusive à perda de osso alveolar⁴²;
- 2) Menor atividade de fagocitose de Staphylococci por leucócitos^{32,49};
- 3) Desbalanço nas subpopulações de linfócitos T, estando a proporção de CD8+ aumentada e a de CD4+ diminuída, inclusive a de CD4+CD45RA+, o que pode indicar envelhecimento precoce do sistema imune de indivíduos com SD⁹. Aumento na proporção de CD8+ também foi observado em adolescentes com SD (12 a 16 anos), além de maior expressão de LFA1 nos linfócitos T CD4+ e CD8+ de indivíduos com SD, embora tenha sido demonstrada menor adesão celular a ICAM1⁵⁶ (Figura 1);

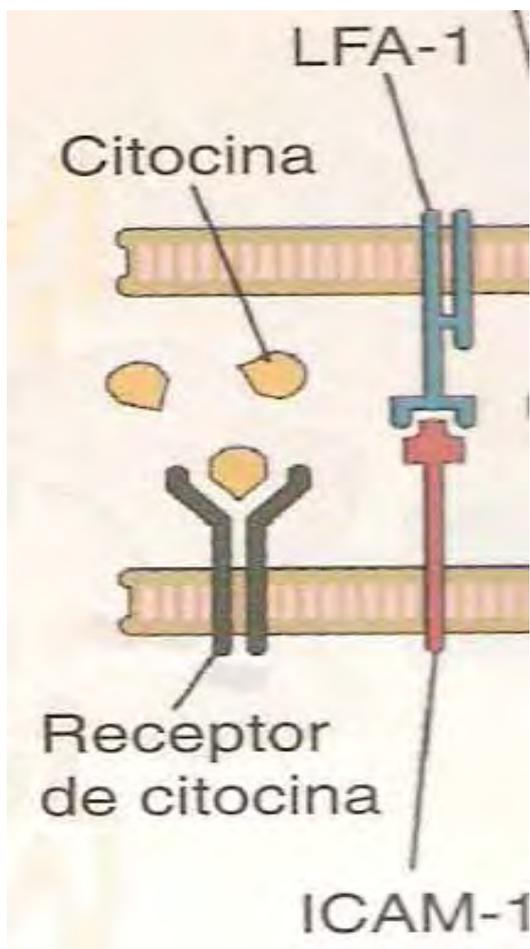


FIGURA 1 - A figura mostra a relação de adesão entre LFA-1 e ICAM-1 e a relação entre uma citocina (ex. IL-10) e seu receptor (Adaptado de Abbas et al.¹, 2003).

- 4) Ativação defeituosa de linfócitos T de indivíduos com SD caracterizada pela transdução de sinal parcial de complexo TCR/CD3 associada à falha de fosforilação de resíduos de tirosina da proteína ZAP-70⁸⁵;

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 comparado com indivíduos cromossomicamente normais ou com deficiência

mental^{4,7,45}. 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 a 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 destruídos⁶⁷.

2.4 Imunogenética

É crescente o número de publicações científicas que investigam o envolvimento imunogenético da DP em indivíduos normais^{30,62,84,90,97}. 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^{34,47}. Apesar de tais estudos contribuírem muito para a elucidação da etiopatogênese da DP, é importante também investigar o papel de citocinas, seus receptores e vias de sinalização intracelular na DP.

O papel de algumas citocinas reconhecidamente importantes na DP, como a Interleucina 10 (IL-10), ainda não foi investigado em indivíduos com SD. O mesmo se aplica a outros genes envolvidos no mecanismo efetor da IL-10, como receptores e moléculas de transdução do sinal ao núcleo celular que atuam na expressão de outros genes, que também participam do intrincado mecanismo de resposta imune.

A IL-10 é produzida principalmente por macrófagos e atua como um potente inibidor de macrófagos ativos, sendo assim um excelente regulador de *feedback* negativo. Os macrófagos secretam citocinas como a IL-12 e TNF que aumentam a ativação de células T e da imunidade mediada por células. Como a IL-10 inibe a função dos macrófagos ativados, ela colabora para o retorno do sistema imune ao estado de repouso à medida que a infecção bacteriana vai sendo erradicada¹. A IL-10 também atua como ativadora de linfócitos B, estimulando tanto a proliferação quanto a diferenciação dos mesmos. Yamamoto et al.¹⁰² (1997) analisaram a produção de citocinas em tecidos gengivais inflamados e observaram a expressão de RNA mensageiro (RNAm) da IL-10, juntamente com interferon- γ (IFN- γ), interleucina 6 e 13 (IL-6 e IL-13). Como havia predominância das citocinas derivadas de células Th2, os autores sugeriram que estas poderiam contribuir na indução de respostas mediadas por células do tipo B nos sítios doentes. Acredita-se que em uma condição inflamatória ocorra um desbalanço

entre a resposta Th1 e Th2, mas ainda não se sabe precisar o real papel de cada uma na DP³¹.

Cada molécula que compõe o sistema imune é regulada por uma intrincada rede de comunicação entre citocinas²⁸. 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.

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 da IL-10. Os receptores da IL-10 pertencem ao tipo II, caracterizados por possuírem dois domínios extracelulares com cisteínas conservadas¹. A IL-10 tem dois receptores: IL10R- α (OMIM 146933) cujo gene está localizado no cromossomo 11q23.3; e IL10R- β (OMIM 123889) cujo gene está localizado no braço longo do cromossomo 21 (21q)⁷⁴.

Considerando que a citocina IL-10 liga-se a receptores do tipo II, o mecanismo pelo qual ocorre a transdução do sinal que desperta respostas específicas nas células-alvo é mediado pela via JAK/STAT, ou seja, envolve uma enzima chamada Janus-quinase 1 (JAK-

1) e o fator de transcrição STAT-3 (Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição)¹.

Quando a citocina IL-10 se liga ao domínio extracelular do receptor IL10R- α (ou IL10R1) forma-se uma associação do IL10R2 com o IL10R1 gerando um complexo entre esses receptores da IL-10 (Figura 2). Isso dá início à cascata de eventos de transdução de sinal que inclui a fosforilação de JAK-1 (associada ao IL10R1 no domínio citoplasmático). Essa Kinase então fosforila resíduos específicos de tirosina (Y) no domínio intracelular da cadeia IL10R1. Uma vez fosforilados esses resíduos de tirosina servem como sítios de ancoragem para o fator de transcrição latente STAT-3. A proteína STAT-3 torna-se ativada e se dissocia do receptor IL10R1 ligando-se a outra molécula STAT-3. Os dímeros STAT-3 migram para o núcleo da célula e se ligam às seqüências de DNA (SBE, elemento ligante de STAT) nas regiões promotoras de genes responsivos a IL-10, e ativam a transcrição desse gene. Um desses genes, o *SOCS3*, é um membro de uma família de genes que produzem proteínas que inibem a sinalização dependente de JAK/STAT. A habilidade de IL-10 em rapidamente produzir a expressão de *SOCS-3* pode explicar, ao menos em parte, como a IL-10 inibe a indução de muitos genes (como a IL-1 e TNF- α) em monócitos^{1,23}. Recentemente, foi observado que camundongos com o gene *Socs3* inativo que apresentavam artrite reumatóide tiveram seus macrófagos

hiper-responsivos a IL-1 e concluiu-se que SOCS-3 é um regulador negativo importante em artrite inflamatória aguda dependente de IL-1¹⁰⁰.

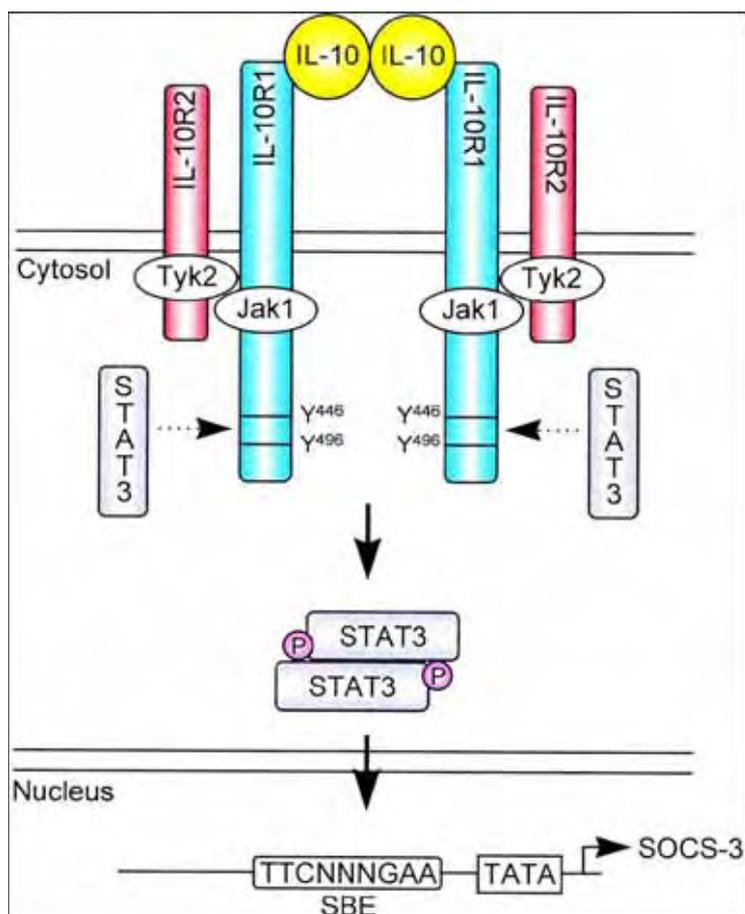


FIGURA 2 - Sinalização da citocina IL-10 pela via JAK/STAT. A citocina IL-10 se liga ao receptor IL10R1 dando início à cascata de eventos de transdução de sinal que inclui a fosforilação de JAK-1 e consequente fosforilação dos resíduos de tirosina (Y) no receptor IL10R1 que servem como sítios de ancoragem para o STAT-3 que torna-se ativado e se dissocia do receptor IL10R1 ligando-se a outra molécula STAT-3. Os dímeros STAT-3 migram para o núcleo da célula e se ligam às seqüências de DNA nas regiões promotoras de genes responsivos a IL-10, e ativam a transcrição desse gene. Que neste exemplo é o gene *SOCS3* (Donnelly et al.⁸, 1999).

Foi demonstrado em monócitos humanos que IL-10 inibiu a expressão dos genes *IP10* (proteína 10 induzível por interferon

gama) e *ICAM1* (molécula de adesão intercelular 1)⁴¹. Esses genes são induzidos por Interferon ($IFN-\alpha$ e $IFN-\gamma$) que utilizam a STAT-1 como molécula transdutora de sinal ao núcleo e que se liga na seqüência SBE (ou GAS – seqüência ativadora de interferon gama) presente no promotor dos citados genes *IP10* e *ICAM1*⁴¹. Portanto, a IL-10 pode diretamente inibir a expressão de genes induzidos por $IFN-\alpha$ e $IFN-\gamma$ por meio da supressão da fosforilação de STAT-1. Isso pode ocorrer devido a habilidade da IL-10 em induzir a expressão de SOCS-3³⁷.

É relevante acrescentar a importância das proteínas IP-10 e ICAM-1 no sistema imune. A IP-10 é uma citocina quimiotática (quimiocina) para monócitos e linfócitos T, promove adesão de linfócitos T a células endoteliais e atua como um potente inibidor de angiogênese in vivo. Mais recentemente a IP-10 tem sido chamada CXCL-10, pois na composição de aminoácidos da estrutura protéica do ligante (L) 10, há dois resíduos conservados de cisteína (C) separados por um único aminoácido qualquer (X), daí o termo CXCL-10 (OMIM 147310). No que se refere a ICAM-1, esta é uma molécula de adesão intercelular cuja principal função é ligar-se a linfócitos T que expressam em sua superfície a LFA-1 (antígeno 1 associado à função de linfócitos)¹ (OMIM 147840).

Até o momento não foi encontrada na literatura nenhuma pesquisa investigando expressão diferencial em indivíduos com SD do gene IL10, seus receptores, moléculas transdutoras de sinal e fatores de transcrição que influenciam a expressão de genes responsivos

à IL-10. Acredita-se que este trabalho poderá contribuir com valiosas informações sobre peculiaridades do sistema imune de indivíduos com SD.

Proposição

3 Proposição

Investigar a expressão dos genes *IL10*, *IL10RA*, *IL10RB*, *JAK1*, *STAT3*, *SOCS3*, *IP10* e *ICAM1* em indivíduos com Síndrome de Down (SD) que apresentam ou não Doença Periodontal. Esses dados serão comparados com os obtidos de indivíduos não Síndrômicos com e sem 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)
- 2) Grupo Síndrome de Down sem Doença Periodontal (SDsDP)
- 3) Grupo Controle (não-sindrômicos) com Doença Periodontal (CcDP)
- 4) Grupo Controle (não-sindrômicos) sem Doença Periodontal (CsDP)

Os indivíduos com Síndrome de Down e indivíduos não-sindrômicos selecionados foram de ambos os gêneros e qualquer etnia com idade a partir dos 6 anos. Os indivíduos do grupo SD foram selecionados fazendo-se esforços para parear idade seguida do gênero. Desta forma essas variáveis teriam menor influência na comparação da expressão gênica entre os grupos.

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 de acordo com a faixa etária 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 sendo considerados os seguintes critérios de exclusão:

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

Para que um indivíduo fosse selecionado para este estudo, além de atender aos critérios de exclusão, o mesmo 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 de maneira acessível, os objetivos da pesquisa aos indivíduos selecionados e seus responsáveis, obtendo 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 com Seres Humanos – CEP da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, protocolo n° 79/04 (Anexo 1).

4.2 Exame Clínico Periodontal

Cada sujeito participante desta pesquisa foi submetido a um exame periodontal realizado por meio de secagem prévia da região a ser examinada com jato de ar, utilizando uma sonda periodontal milimetrada tipo Williams, espelho plano e pinça clínica devidamente esterilizados⁹¹.

Os exames foram executados por um examinador previamente treinado, o qual realizou o exame periodontal em todos os dentes presentes na cavidade bucal. Os parâmetros clínicos de profundidade de sondagem e nível de inserção clínico (NIC) 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 foram utilizados para classificar os indivíduos em:

- Sem Doença Periodontal: indivíduos sem sinais clínicos de doença periodontal, tendo como características: ausência de

sangramento marginal, profundidade de sondagem e NIC \leq 3mm.

- Com Doença Periodontal: indivíduos com pelo menos 3 sítios não adjacentes apresentando sangramento à sondagem, profundidade de sondagem e NIC $>$ 3mm.

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 obtido de área não inflamada.

Um fragmento de gengiva de aproximadamente 2 mm foi coletado durante o tratamento odontológico dos indivíduos selecionados e mergulhado imediatamente em Trizol (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 a -80°C .

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. Fora do gelo, o tecido foi macerado com pistilo de vidro no próprio microtubo com Trizol para facilitar a extração do RNA. 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, Brasil) 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. Descartou-se o sobrenadante (isopropanol) de forma cuidadosa e acrescentou-se 1 ml de etanol 75% (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil). Após leve homogeneização do microtubo, este foi centrifugado a 7.500 rpm por 5 minutos a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante (etanol) de forma cuidadosa e, com o microtubo aberto, permitiu-se que resquícios de etanol evaporassem à temperatura ambiente, sem no entanto deixar o *pellet* secar completamente. O *pellet* de RNA foi ressuspensão em 20 a 50 µl de água ultrapura tratada com DEPC (BioAgency, São Paulo, São Paulo, Brasil) por meio do *up-&down* com micropipeta. O microtubo foi incubado a 55°C por 10 minutos.

Uma alíquota de RNA (2 µl) foi dissolvida em 98 µl de água-DEPC para realizar a quantificação do RNA em espectrofotômetro (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Também foi analisada a pureza do RNA de cada amostra, por meio da razão entre a absorvância 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₍₂₀₎ e o kit *SuperScript III First-Strand Synthesis Super Mix* (Invitrogen).

Em um microtubo de 0,2 ml o volume de RNA correspondente à concentração de cerca de 350 ng foi acrescido de 1 µl de Oligo dT, 1 µl de *Annealing Buffer* e água-DEPC até o volume final de 8 µl. 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 µl do Mix da Reação *First-Strand* e 2 µl 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 µl de cDNA que foi 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 (qRT-PCR)

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 no *Primer Express 3* do SDS 7500 (anexo 2) 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 n° 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 β -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 β -actina de acordo com a utilização dos primers específicos. O PCR em Tempo Real utilizando o sistema SYBR Green realiza as reações de amplificação e promove a detecção da expressão gênica na amostra 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 da investigação desta pesquisa é relativa à expressão do gene constitutivo, neste caso, o gene da β -actina. Em cada microplaca incluiu-se uma amostra de cada um dos quatro grupos que foi investigada

em duplicata para cada um dos genes *IL10*, *IL10RA*, *IL10RB*, *JAK1*, *STAT3*, *SOCS3*, *IP10*, *ICAM1* e *ACTB* (β -actina). Além disso, havia 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 seria utilizado nas reações de qRT-PCR. Foram testadas as concentrações de 100, 300 e 500 nM. Constatou-se que a concentração ideal de todos os primers a serem investigados neste estudo foi de 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, tendo sido escolhida a concentração de 10 ng de cDNA mediante a observação das curvas de eficiência.

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 qRT-PCR 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. O referido programa, conhecido como *RQ Study* analisa simultaneamente somente dez microplacas. Por esse motivo, o programa *Microsoft Excell* foi utilizado para análise das 20 microplacas simultaneamente a partir dos algoritmos descritos no *User Bulletin, Subject: Relative Quantification (RQ) algorithms in Applied Biosystems Real-Time PCR Systems Software**. 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 (ΔC_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: $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

*Applied Biosystems. Guide to performing relative quantitation of gene expression using Real-Time quantitative PCR.

4.4 Análise Estatística dos Resultados

A Doença Periodontal e a Síndrome de Down foram consideradas variáveis independentes, influenciando ou não a expressão dos genes *IL10*, *IL10RA*, *IL10RB*, *JAK1*, *STAT3*, *SOCS3*, *IP10* e *ICAM1*, consideradas variáveis dependentes.

De acordo com a proposição deste trabalho, as hipóteses testadas foram:

- Se a Síndrome de Down influencia a expressão dos genes

H₀: A Síndrome de Down não exerce influência sobre a expressão dos genes

H₁: A Síndrome de Down exerce influência sobre a expressão dos genes

- Se a Doença Periodontal influencia a expressão dos genes

H₀: A Doença Periodontal não exerce influência sobre a expressão dos genes

H₁: A Doença Periodontal exerce influência sobre a expressão dos genes

- Se a Síndrome de Down associada à Doença Periodontal influenciam a expressão dos genes

H₀: A Síndrome de Down associada à Doença Periodontal não exerce influência sobre a expressão dos genes

H₁: A Síndrome de Down associada à Doença Periodontal exerce influência sobre a expressão dos genes

Os dados foram avaliados quanto a sua distribuição. Por não apresentarem aderência à curva de normalidade, utilizou-se o

teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis associado ao método de Student-Newman-Keuls, por meio do programa BioEstat v.4.0 (UFPA, MCT, CNPq, Belém, PA, Brasil) para verificar diferenças entre os genes na análise de um grupo em relação a um calibrador. Para identificar e/ou confirmar diferenças na expressão genética foi utilizado o teste de Mann-Whitney (comparações 2 a 2). A análise estatística foi realizada ao nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

Resultado

5 Resultado

5.1 Casuística, obtenção do RNA e padronização de qRT-PCR

Os indivíduos incluídos neste estudo foram classificados quanto à presença ou ausência da SD e DP e subdivididos em quatro grupos. Dentro de cada grupo esses indivíduos foram organizados quanto ao gênero e suas respectivas idades (Quadro 1).

Quadro 1 - Casuística subdividida nos diferentes grupos especificada por gênero e idade

Gênero	Grupos			
	SDcDP (n = 20)	SDsDP (n = 20)	CcDP (n =20)	CsDP (n=20)
Feminino (F)	06	11	11	10
Masculino (M)	14	09	09	10
Idade e Gênero	26 (F)	06 (F)	34 (F)	15 (F)
	15 (F)	06 (F)	19 (F)	20 (F)
	28 (F)	07 (F)	31 (F)	27 (F)
	30 (F)	13 (F)	27 (F)	36 (F)
	32 (F)	16 (F)	31 (F)	40 (F)
	36 (F)	12 (F)	47 (F)	45 (F)
	33(M)	07 (F)	34 (F)	22 (F)
	30 (M)	12 (F)	60 (F)	30 (F)
	31 (M)	08 (F)	39 (F)	28 (F)
	37(M)	07 (F)	26 (F)	29 (F)
	33 (M)	14 (F)	42 (F)	20 (M)
	25 (M)	07 (M)	47 (M)	24 (M)
	25 (M)	11 (M)	41 (M)	13 (M)
	32 (M)	23 (M)	52 (M)	06 (M)
	40 (M)	29 (M)	54 (M)	04(M)
	20 (M)	14 (M)	61 (M)	06 (M)
	28 (M)	20 (M)	47 (M)	9 (M)
	34 (M)	06 (M)	37 (M)	10 (M)
	38 (M)	10 (M)	57 (M)	13 (M)
	39 (M)	12 (M)	40 (M)	14 (M)
Média (± DesvPad)	30,6 ± 6,34	12 ± 6,18	41,3 ± 11,7	20,5 ± 11,7

Obteve-se uma porcentagem um pouco maior de indivíduos do gênero masculino (52,5%) em relação ao feminino (47,5%). A faixa etária dos indivíduos com SD foi de 6 a 40 anos. Essa amplitude é justificável pelo desenho experimental deste estudo que incluiu dois grupos de indivíduos com SD (um com DP e outro sem DP). Era esperado que indivíduos com SD e com DP fossem mais velhos (30,6 anos em média) que aqueles que não tivessem desenvolvido DP (12 anos em média). O grupo CcDP teve a média de idade de 41,3 anos em comparação à do grupo SDcDP (30,6 anos), enquanto no grupo CsDP a média de idade foi de 20,5 anos e no grupo SDsDP a idade média foi de 12 anos.

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 3 e 4). 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 qRT-PCR, mediante a observação das curvas de eficiência (Figura 5). As eficiências de amplificação obtidas foram: 97% (gene *IL10RA*), 99% (gene *JAK1*) e 100% (genes *ACTB*, *IL10*, *IL10RB*, *STAT3*, *SOCS3*, *IP10* e *ICAM1*), permitindo a utilização de qRT-PCR para investigação da expressão

gênica nas amostras de gengiva e a utilização da equação: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para análise dos resultados.

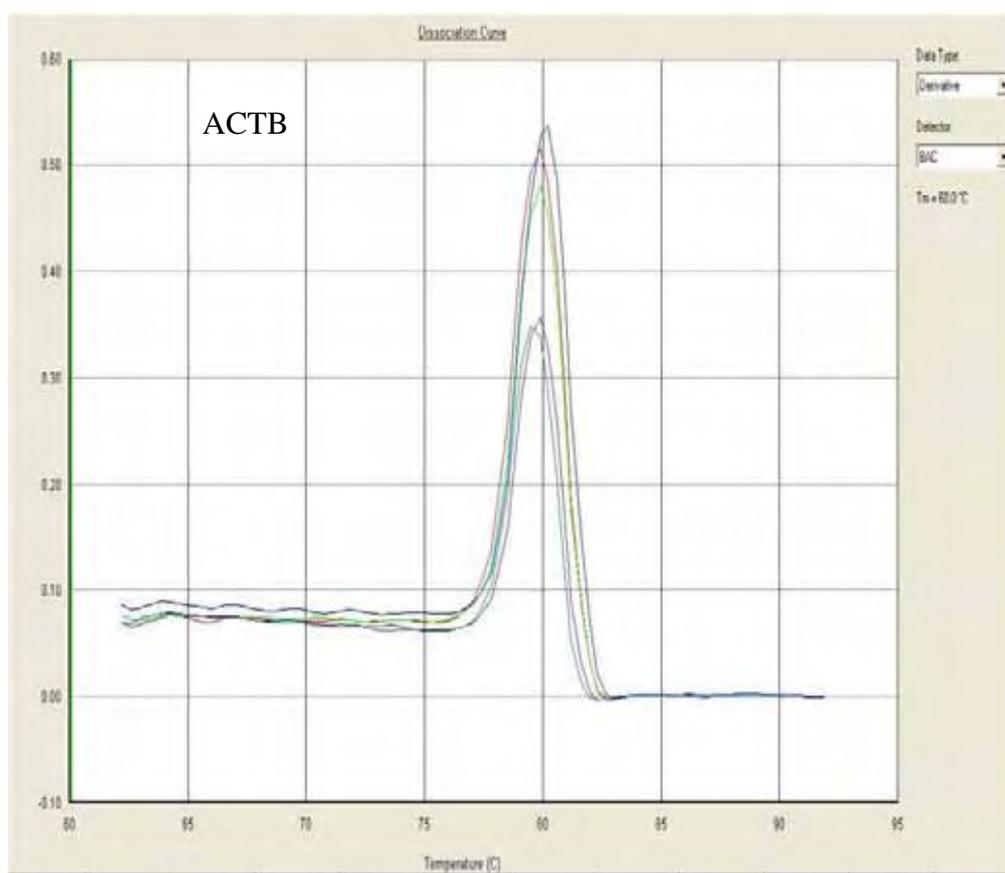


FIGURA 3 - Curvas de dissociação do gene constitutivo *ACTB* (β -actina) mostrando um único pico referente ao T_m do respectivo amplicon, o que comprova a especificidade do par de primers.

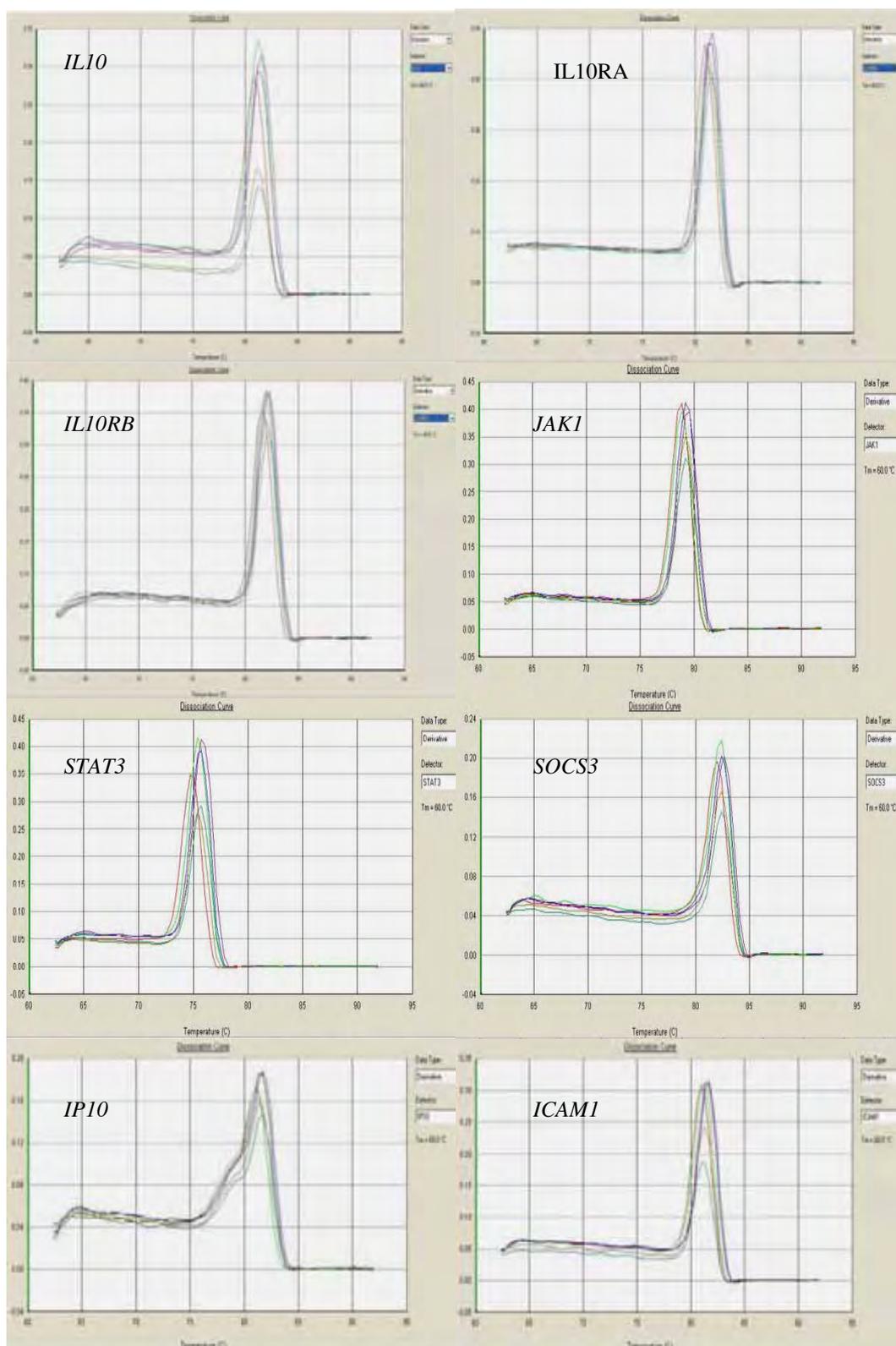


FIGURA 4 - Curvas de dissociação dos genes alvo mostrando um único pico referente ao T_m do respectivo amplicon, o que comprova a especificidade do par de primers.

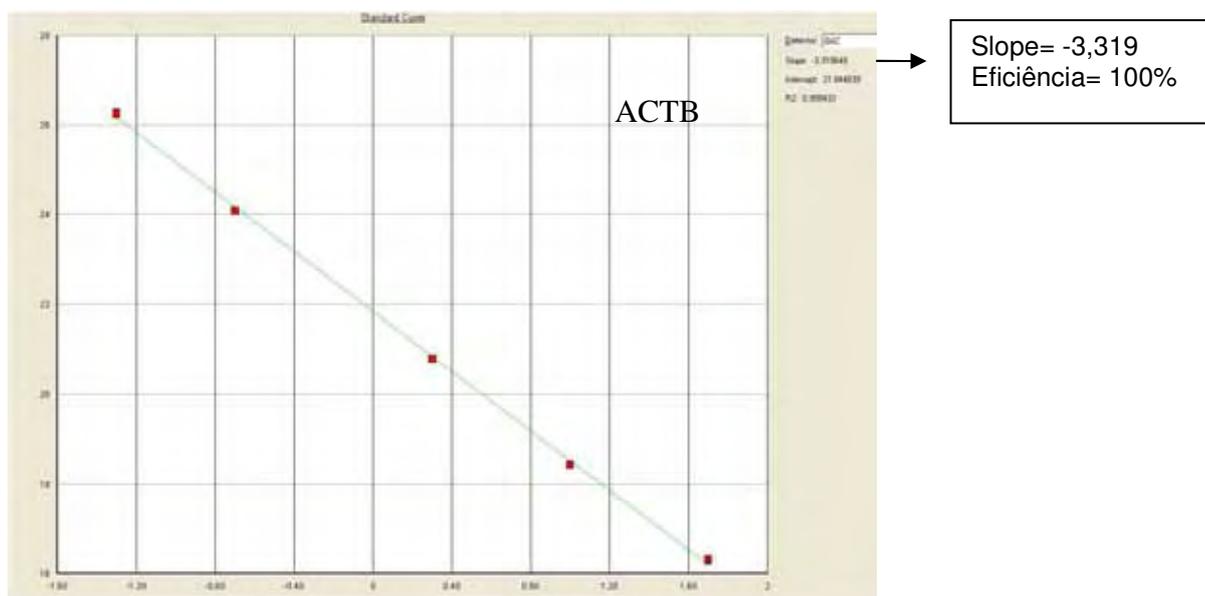


FIGURA 5 - Curva padrão para verificação da eficiência de amplificação por PCR em Tempo Real utilizando o par de oligonucleotídeos do gene constitutivo *ACTB* (β -actina) e diferentes quantidades de cDNA (50, 10, 2, 0,2, 0,05 ng). A eficiência de amplificação é determinada pela função: $Efic = 10^{(-1/slope) - 1}$.

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 ΔC_T , foram realizadas comparações dos resultados entre os diferentes grupos (pois a quantificação é relativa), gerando o $\Delta\Delta C_T$. Por exemplo: Para saber a expressão do gene *IL10* no grupo SDcDP ($\Delta C_T=10,1881$) em relação ao grupo SDsDP ($\Delta C_T=11,0443$), foi realizado o cálculo:

$$\Delta\Delta C_T (\text{SDcDP} - \text{SDsDP}) = 10,1881 - 11,0443$$

$$\Delta\Delta C_T (\text{SDcDP} - \text{SDsDP}) = -0.8562$$

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 Doença Periodontal faz diferença na expressão gênica de indivíduos que apresentam Síndrome de Down;
- b) Grupo A - C (SDcDP - CcDP): foi avaliado se a Síndrome de Down interfere na expressão gênica de indivíduos com Doença Periodontal;
- c) Grupo B - D (SDsDP - CsDP): foi avaliado se a Síndrome de Down interfere na expressão gênica de indivíduos com periodonto saudável (sem Doença Periodontal);
- d) Grupo C - D (CcDP - CsDP): foi avaliado se a Doença Periodontal faz diferença na expressão gênica de indivíduos não portadores da Síndrome de Down (pertencentes ao grupo Controle);
- e) Grupo A+B - C+D [(SDcDP+SDsDP) - (CcDP+CsDP)]: foi avaliado se a Síndrome de Down faz diferença na expressão gênica em comparação a indivíduos cromossomicamente normais, independente da presença de Doença Periodontal;

- f) Grupo A+C – B+D [(SDcDP+CcDP) – (SDsDP+CsDP)]: foi avaliado se a presença da Doença Periodontal faz diferença na expressão gênica dos indivíduos, independente de serem portadores ou não da Síndrome de Down.

Com os valores obtidos de $\Delta\Delta Ct$ calcula-se a expressão relativa por meio da equação: $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Seguindo o exemplo anterior onde $\Delta\Delta Ct$ (SDcDP – SDsDP) = -0.8562, a expressão relativa será: $2^{-(-0.8562)} = 2^{+0.8562} = 1,81$. Isso significa que indivíduos com SDcDP têm 1,81 vezes a expressão do gene *IL10* em relação ao calibrador (SDsDP). Convencionando-se o calibrador com uma expressão de *IL10* de 100%, o grupo SDcDP tem uma sobre expressão de 81% em relação ao calibrador. Esse valor de 1,81 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*⁴. 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.

5.2 Análise da expressão gênica de SDcDP em relação a SDsDP

Analisando a expressão dos indivíduos SDcDP em relação ao grupo SDsDP (calibrador), ou seja A – B, observou-se que há uma sobre expressão dos genes *IL10* (81%), *IL10RA* (152%), *JAK1*

(214%), *SOCS3* (92%), *IP10* (23%) e *ICAM1* (95%), enquanto os genes *IL10RB* (46%) e *STAT3* (14%) tiveram diminuição de expressão em relação ao (grupo) calibrador (Figura 6).

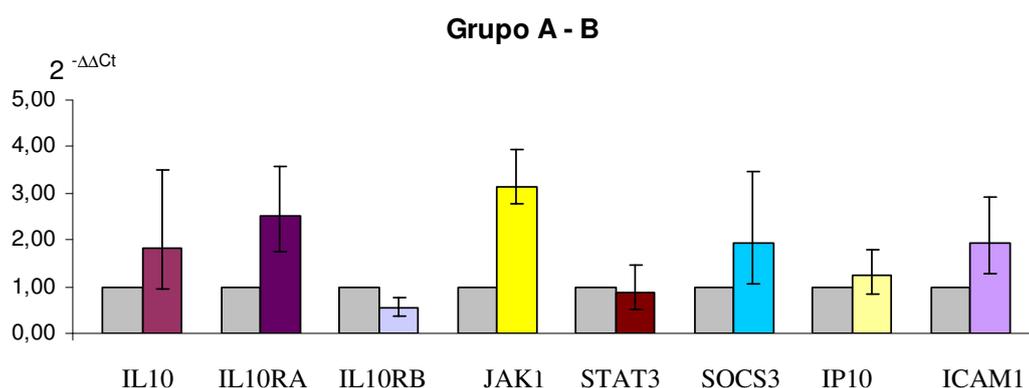


FIGURA 6 - Comparação da expressão genética dos genes *IL10*, *IL10RA*, *IL10RB*, *JAK1*, *STAT3*, *SOCS3*, *IP10* e *ICAM1* do grupo SDcDP em relação ao grupo SDsDP (calibrador).

Para verificar se existiam diferenças estatisticamente significantes da expressão gênica entre os diferentes genes do grupo SDcDP (em relação ao grupo SDsDP), submeteram-se os valores obtidos de RQ (quantificação relativa = $2^{-\Delta\Delta C_t}$) ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. O teste foi realizado adotando-se um intervalo de confiança de 95%, o que significa um erro $\alpha = 0,05$. Obtiveram-se os seguintes resultados (Quadro 2).

Quadro 2 - Significância das diferenças de expressão (valores RQ) entre os diferentes genes na análise SDcDP em relação a SDsDP

Genes	IL10	IL10RA	IL10RB	JAK1	STAT3	SOCS3	IP10	ICAM1
IL10	-	ns	p=0,022	p=0,031	ns	ns	ns	ns
IL10RA		-	p=0,0007	ns	p=0,019	ns	ns	ns
IL10RB			-	p<0,0001	ns	p=0,035	p=0,032	p=0,010
JAK1				-	p=0,0005	p=0,020	p=0,021	ns
STAT3					-	ns	ns	ns
SOCS3						-	ns	ns
IP10							-	ns
ICAM1								-

ns= não significativo, ou seja, $p>0,05$ (teste Kruskal-Wallis).

Analisando os resultados apresentados na Figura 6 e no Quadro 2, nota-se que indivíduos com SDcDP expressam quase o dobro de *IL10* (0,81 vezes em relação a SDsDP), juntamente com uma alta expressão do receptor *IL10RA*, mas que, em contraste, a expressão de *IL10RB* está significativamente menor do que a de *IL10* e *IL10RA*. Além disso, destaca-se a expressão de *JAK1* como a maior em relação ao calibrador e em comparação com os outros genes investigados, mostrando expressão significativamente diferente de todos os genes exceto *IL10RA* e *ICAM1*. No grupo SDcDP, *STAT3* apresentou sub expressão em relação a SDsDP, mas *SOCS3*, *IP10* e *ICAM1* apresentaram superexpressão, sem no entanto diferirem estatisticamente entre si. Portanto, comparando indivíduos com SD, os resultados indicaram que no contexto da inflamação causado pela DP houve maior expressão do gene *IL10*, do seu principal receptor (*IL10RA*), de *JAK1*, além dos genes *SOCS3*, *IP10* e *ICAM1*, os quais pareceram realmente ser responsivos à *IL10*.

5.3 Análise da expressão gênica de SDcDP em relação a CcDP

Por meio da comparação do grupo SDcDP em relação ao grupo CcDP (calibrador), ou seja A – C, observou-se uma sutil sobre expressão somente de dois genes: *IL10RB* (24%) e *JAK1* (12%) (Fig 7). Portanto foram sub expressos os genes *IL10* (81%), *IL10RA* (24%), *STAT3* (31%), *SOCS3* (87%), *IP10* (57%) e *ICAM1* (73%), indicando que indivíduos com SD manifestam uma resposta imune deficitária no controle da inflamação em comparação a indivíduos não-sindrômicos em que ambos apresentam DP.

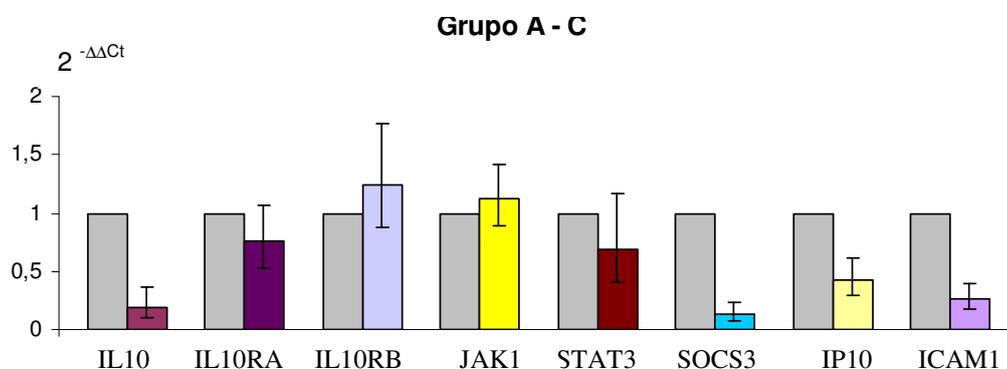


FIGURA 7 - Comparação da expressão genética dos genes *IL10*, *IL10RA*, *IL10RB*, *JAK1*, *STAT3*, *SOCS3*, *IP10* e *ICAM1* do grupo SDcDP em relação ao grupo CcDP (calibrador).

Quadro 3 - Significância das diferenças de expressão (valores RQ) entre os diferentes genes na análise SDcDP em relação a CcDP

Genes	IL10	IL10RA	IL10RB	JAK1	STAT3	SOCS3	IP10	ICAM1
IL10	-	p=0,017	p=0,017	p=0,008	p=0,021	ns	ns	ns
IL10RA		-	ns	ns	ns	p=0,001	ns	p=0,009
IL10RB			-	ns	ns	p=0,001	ns	p=0,009
JAK1				-	ns	p=0,0004	ns	p=0,004
STAT3					-	p=0,001	ns	p=0,011
SOCS3						-	ns	ns
IP10							-	ns
ICAM1								-

No Quadro 3, pode-se verificar que a sub expressão de *IL10* é estatisticamente significativa em relação a *IL10RA*, *IL10RB*, *JAK1* e *STAT3*, enquanto que houve correspondência entre a baixa expressão de *IL10*, *SOCS3*, *IP10* e *ICAM1*. Esses dados indicam que indivíduos com SD manifestam uma resposta imune deficitária no controle da inflamação, dada pela sub expressão de *IL10* (ação principalmente antiinflamatória) assim como de genes responsivos à *IL10* (*SOCS3*, *IP10* e *ICAM1*). Um fato interessante foi, em comparação à expressão de *IL10*, a elevada expressão de seus receptores e de JAK/STAT.

5.4 Análise da expressão gênica de SDsDP em relação a CsDP

Analisando a expressão do grupo SDsDP em relação ao grupo CsDP (calibrador) observou-se uma maior expressão do gene *IL10RB* (92%). A expressão do gene *STAT3* foi ligeiramente (1%) maior que a do calibrador. Os genes *IL10* (73%), *IL10RA* (21%), *JAK1* (29%),

SOCS3 (74%), *IP10* (23%) e *ICAM1* (70%) expressaram menos em relação ao calibrador (Figura 8).

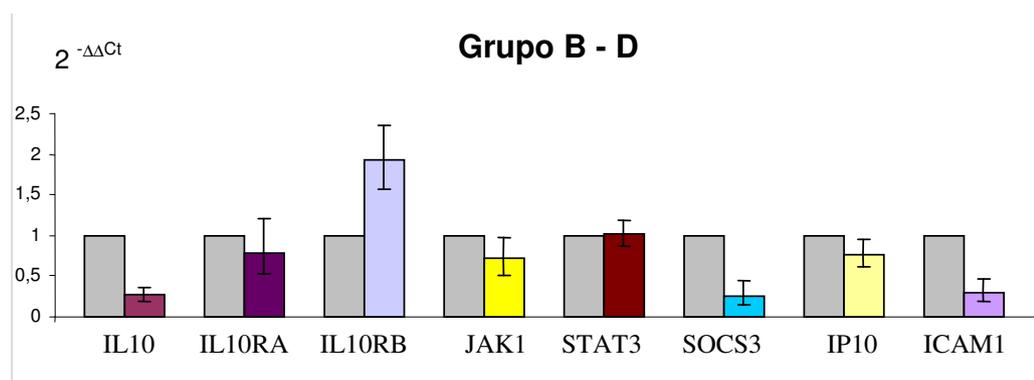


FIGURA 8 - Comparação da expressão genética dos genes *IL10*, *IL10RA*, *IL10RB*, *JAK1*, *STAT3*, *SOCS3*, *IP10* e *ICAM1* do grupo SDsDP em relação ao grupo CsDP (calibrador).

Quadro 4 - Significância das diferenças de expressão (valores RQ) entre os diferentes genes na análise SDsDP em relação a CsDP

Genes	IL10	IL10RA	IL10RB	JAK1	STAT3	SOCS3	IP10	ICAM1
IL10	-	ns	p=0,001	ns	0,049	ns	ns	ns
IL10RA		-	ns	ns	ns	ns	ns	ns
IL10RB			-	ns	ns	p=0,002	ns	p=0,001
JAK1				-	ns	ns	ns	ns
STAT3					-	ns	ns	ns
SOCS3						-	ns	ns
IP10							-	ns
ICAM1								-

ns= não significativo, ou seja, $p > 0,05$ (teste Kruskal-Wallis).

Nos indivíduos SD em comparação aos cromossomicamente normais, ambos sem DP, foi possível notar um padrão semelhante ao de A – C (SDcDP – CcDP) para a expressão dos genes *IL10*, *IL10RA*, *SOCS3*, *IP10* e *ICAM1* (Figuras 7 e 8). Esse fato parece indicar que independentemente da presença da DP a resposta imune dos indivíduos com SD se mostra semelhante.

5.5 Análise da expressão gênica de CcDP em relação a CsDP

Ao analisar a expressão dos indivíduos CcDP em relação ao grupo CsDP (calibrador) observou-se uma maior expressão de todos os genes com exceção do gene da *IL10RB* (sub expressão em 16%). Portanto os genes *IL10* (157%), *IL10RA* (162%), *JAK1* (98%), *STAT3* (26%), *SOCS3* (288%), *IP10* (123%) e *ICAM1* (119%) tiveram superexpressão em relação ao calibrador.

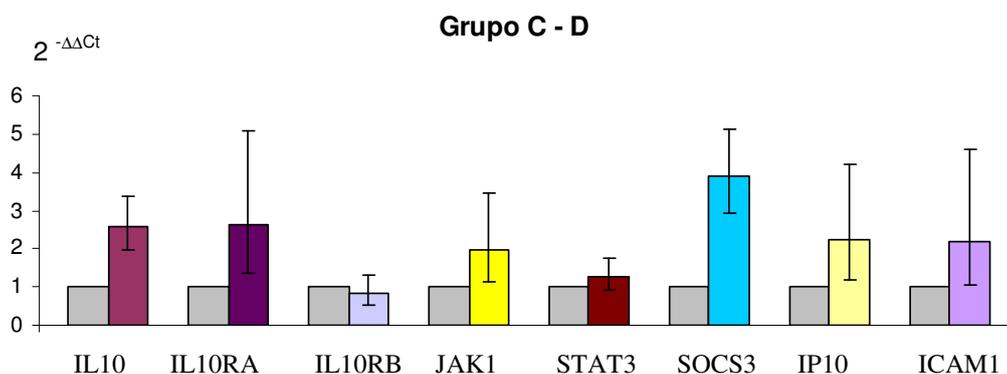


FIGURA 9 - Comparação da expressão genética dos genes *IL10*, *IL10RA*, *IL10RB*, *JAK1*, *STAT3*, *SOCS3*, *IP10* e *ICAM1* do grupo CcDP em relação ao grupo CsDP (calibrador).

Quadro 5 - Significância das diferenças de expressão (valores RQ) entre os diferentes genes na análise CcDP em relação a CsDP

Genes	IL10	IL10RA	IL10RB	JAK1	STAT3	SOCS3	IP10	ICAM1
IL10	-	ns	p=0,035	ns	p=0,024	ns	ns	ns
IL10RA		-	ns	ns	ns	ns	ns	ns
IL10RB			-	ns	ns	p=0,003	ns	p=0,041
JAK1				-	p=0,041	ns	ns	ns
STAT3					-	p=0,001	p=0,034	p=0,032
SOCS3						-	ns	ns
IP10							-	ns
ICAM1								-

ns= não significativo, ou seja, $p > 0,05$ (teste Kruskal-Wallis).

Neste grupo foi analisado se a DP interferia na expressão genética de indivíduos cromossomicamente normais. Observou-se que os indivíduos CcDP tiveram superexpressão de *IL10*, *IL10RA*, *JAK1*, *SOCS3*, *IP10* e *ICAM1* em relação ao calibrador (CsDP). Apenas o gene da *IL10RB* apresentou sub expressão (16%) em relação ao calibrador. Também é possível observar que a expressão de *IL10* e *IL10RA* são semelhantes, não apresentando diferença estatística entre esses genes. Os genes *SOCS3*, *IP10* e *ICAM1* também manifestaram aumento de expressão acompanhando a super expressão do gene *IL10*. Isso reforça o conceito que os genes *SOCS3*, *IP10* e *ICAM1* são responsivos a *IL10*. A análise da expressão gênica no grupo CcDP indica que no processo inflamatório, dado pela Doença Periodontal, indivíduos cromossomicamente normais têm o desempenho normal da resposta imune, pois, níveis mais elevados de genes como *IL10* (uma citocina anti-inflamatória) e *SOCS3* (regulador negativo da ação de citocinas) justificam-se pela tentativa do sistema imune em conter o processo inflamatório e restabelecer o equilíbrio.

5.6 Análise da expressão gênica de SDcDP + SDsDP em relação a CcDP + CsDP

Ao avaliar a expressão genética em indivíduos com SD em relação a indivíduos cromossomicamente normais (calibrador), independente da presença de DP em ambos os grupos, observou-se

apenas a superexpressão do gene *IL10RB* (55%). Os demais genes *IL10* (78%), *IL10RA* (23%), *JAK1* (11%), *STAT3* (17%), *SOCS3* (82%), *IP10* (43%) e *ICAM1* (72%) foram sub expressos nos indivíduos com SD (grupo A + B) em comparação aos indivíduos cromossomicamente normais (grupo C + D).

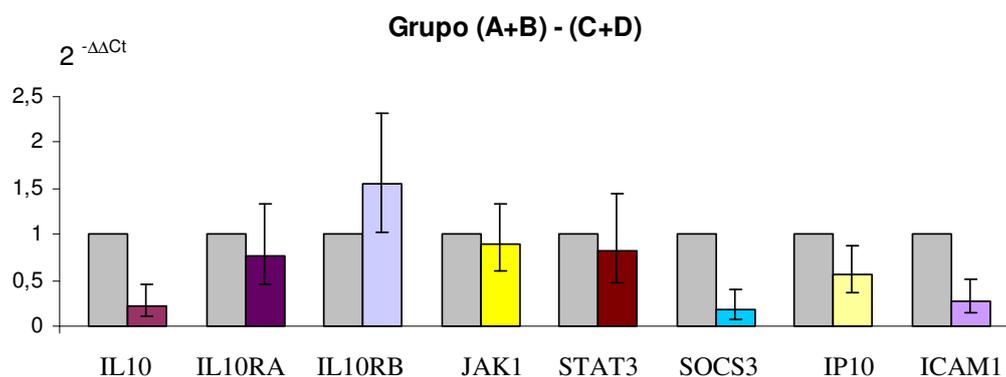


FIGURA 10 - Comparação da expressão genética dos genes *IL10*, *IL10RA*, *IL10RB*, *JAK1*, *STAT3*, *SOCS3*, *IP10* e *ICAM1* do grupo SDcDP + SDsDP em relação ao grupo CcDP + CsDP (calibrador).

Quadro 6 - Significância das diferenças de expressão (valores RQ) entre os diferentes genes na análise SDcDP + SDsDP em relação a CcDP + CsDP

Genes	IL10	IL10RA	IL10RB	JAK1	STAT3	SOCS3	IP10	ICAM1
IL10	-	p=0,003	p=0,0002	p=0,004	p=0,007	ns	ns	ns
IL10RA		-	ns	ns	ns	p=0,0008	ns	p=0,002
IL10RB			-	ns	ns	p<0,0001	p=0,029	p=0,0001
JAK1				-	ns	p=0,001	ns	p=0,004
STAT3					-	p=0,001	ns	p=0,0065
SOCS3						-	p=0,043	ns
IP10							-	ns
ICAM1								-

ns= não significativo, ou seja, p>0,05 (teste Kruskal-Wallis).

O padrão da expressão gênica visto na Figura 10 é semelhante ao encontrado na análise de A – C e B – D, que também

compararam indivíduos SD em relação aos não sindrômicos. O único gene que teve maior expressão em relação ao calibrador foi o *IL10RB*, assim como observado nas análises A – C e B – D. Uma possível explicação é o fato do gene *IL10RB* estar localizado no cromossomo 21, portanto, é natural que indivíduos com a trissomia do 21 apresentem expressão excessiva de genes localizados nesse cromossomo.

Com a fusão dos grupos A+B e a comparação de C+D, foi possível observar o padrão de expressão dos genes em relação à presença da SD. Nessa análise também ficou evidente a responsividade de *SOCS3* e *ICAM1* à *IL10*. Apesar do gene *IP10* ser também responsivo à *IL10*, o padrão de expressão de *SOCS3* e *ICAM1* parecem bem mais relacionados entre si (Figuras 6, 7 e 8), do que *IP10*, sugerindo que haja outros fatores influenciando na sua expressão.

Considerando a Figura 10 e o Quadro 6 compreende-se que indivíduos com SD em comparação aos cromossomicamente normais apresentaram uma diminuição na expressão de *IL10* e genes responsivos a essa citocina, demonstrando uma deficiência imunológica desses indivíduos independente da presença do processo inflamatório ocasionado pela DP.

5.7 Análise da expressão gênica de SDcDP + CcDP em relação a SDsDP + CsDP

Analisando a expressão genética dos indivíduos SDcDP+CcDP em relação a SDsDP+CsDP (calibrador), ou seja, unindo todos os indivíduos com DP em um mesmo grupo e todos os indivíduos sem DP em outro grupo, independente de apresentarem SD, observou-se maior expressão dos genes *IL10* (116%), *IL10RA* (157%), *JAK1*(150%), *STAT3* (4%), *SOCS3* (173%), *IP10* (65%) e *ICAM1*(106%). Apenas o gene *IL10RB* mostrou sub expressão (33%) em relação ao calibrador. Tal padrão de expressão foi semelhante ao demonstrado na Figura 9 para a análise C – D, onde não havia indivíduos com SD.

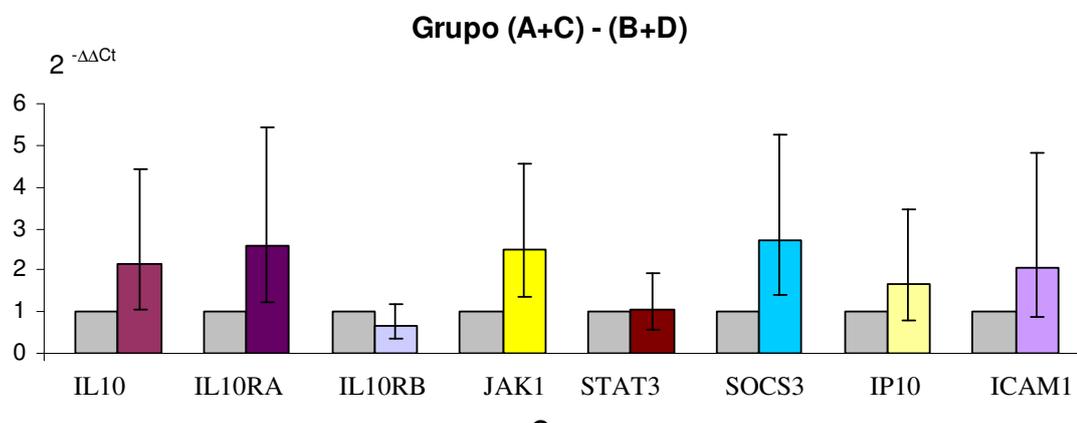


FIGURA 11 - Comparação da expressão genética dos genes *IL10*, *IL10RA*, *IL10RB*, *JAK1*, *STAT3*, *SOCS3*, *IP10* e *ICAM1* do grupo SDcDP + CcDP em relação ao grupo SDsDP + CsDP (calibrador).

Quadro 7 - Significância das diferenças de expressão (valores RQ) entre os diferentes genes na análise SDcDP + CcDP em relação a SDsDP + CsDP

Genes	IL10	IL10RA	IL10RB	JAK1	STAT3	SOCS3	IP10	ICAM1
IL10	-	ns	p=0,004	ns	p=0,012	ns	ns	ns
IL10RA		-	p=0,022	ns	ns	ns	ns	ns
IL10RB			-	p=0,001	ns	p=0,001	p=0,034	p=0,016
JAK1				-	p=0,003	ns	ns	ns
STAT3					-	p=0,004	ns	p=0,042
SOCS3						-	ns	ns
IP10							-	ns
ICAM1								-

ns= não significativo, ou seja, $p > 0,05$ (teste Kruskal-Wallis).

Considerando a Figura 11 e o Quadro 7, é possível compreender que a DP (independentemente da presença de SD) promoveu a superexpressão de todos os genes investigados neste estudo (com exceção de *IL10RB*), com destaque para *IL10*, *SOCS3* e *ICAM1* pela sua importância na resposta imune conduzindo o sistema a controlar o processo inflamatório e restabelecer o equilíbrio.

De forma geral, neste estudo foi possível notar que indivíduos normais (sem síndrome) expressam mais *IL10* e outros genes a ele relacionados do que indivíduos com Síndrome de Down, independente de terem DP.

Comparando-se os genes *IL10*, *SOCS3*, *ICAM1* e *IP10*, observou-se que os indivíduos sem SD expressam em média 2,8 vezes mais que os indivíduos síndrômicos frente ao mesmo estímulo inflamatório (DP). Portanto, indivíduos com SD apresentaram

imunodeficiência quando comparados com indivíduos cromossomicamente normais.

Discussão

6 Discussão

No delineamento deste estudo houve o intuito de selecionar indivíduos com SD que apresentassem DP e indivíduos com SD sem DP, por esse motivo a faixa etária de indivíduos com SD foi ampla (6 a 40 anos). Há grande prevalência de gengivite em indivíduos com SD mais jovens (de 4 a 10 anos)⁶⁵, ocorrendo evolução para periodontite na adolescência numa prevalência de 30% a 40%, subindo para cerca de 100% em indivíduos com idade próxima aos 30 anos⁷⁵. Pelos critérios clínicos periodontais estabelecidos neste estudo, indivíduos com gengivite estão incluídos nos grupos sem DP, juntamente com indivíduos com periodonto plenamente saudável. Assim, no grupo SDsDP, onde também há indivíduos com gengivite, nota-se que a idade média é 18,6 anos menor em relação ao grupo SDcDP, onde estão incluídos somente indivíduos com periodontite estabelecida, inclusive com perda óssea. Portanto, a idade média dos indivíduos nos grupos com SD encontrada neste estudo concorda com o relatado na literatura.

Foram feitas tentativas de pareamento principalmente por idade, seguida do gênero, entre os grupos com SD e sem síndrome, pois desta forma essas variáveis teriam menor influência na comparação da expressão gênica entre os grupos. Houve dificuldade para compor o grupo CcDP com indivíduos na faixa etária de 25 a 35 anos, pois a periodontite em indivíduos cromossomicamente normais afeta com maior prevalência indivíduos com idade superior aos 40 anos⁵⁰. O tipo de DP

que afeta preferencialmente indivíduos jovens até cerca de 35 anos sistemicamente (e cromossomicamente) normais, é a periodontite agressiva⁹⁶.

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^{14,64,81}, é de extrema necessidade o acompanhamento odontológico desses pacientes com medidas de motivação de higiene oral (envolvendo inclusive os responsáveis e/ou cuidadores do paciente) e controle de placa bacteriana, no intuito de prevenir e/ou conter o processo inflamatório da periodontite^{22,79}.

Está comprovado que a DP é causada por fatores etiológicos locais, especialmente a placa bacteriana, mas distúrbios sistêmicos podem reduzir ou alterar a resistência ou a resposta do hospedeiro e então predispor a alterações periodontais²⁵. 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 os tecidos são governados pelo estado de saúde geral do paciente⁵².

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 foi maior em crianças com SD do que em crianças com retardo

mental^{21,95}. 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 DP⁸². Agholme et al.² (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^{75,76}.

Os indivíduos com SD apresentam alterações no sistema imune como funções diminuídas de quimiotaxia e fagocitose por neutrófilos e linfócitos^{4,32,45,49,93} e ativação defeituosa de linfócitos T⁸⁵. Também foi observado que a proporção de imunoglobulina G1 (IgG1) em indivíduos com SD é maior que em indivíduos normais⁷. 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 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^{8,70}.

A investigação mais ampla em busca de conhecer outras diferenças envolvendo a resposta imune de indivíduos com SD em relação àqueles cromossomicamente normais frente à DP, é necessária em vista da pouca informação existente nessa área, considerando-se a

magnitude de mecanismos da resposta imune que participam do processo inflamatório.

Este estudo focou de forma inédita a expressão de genes que fazem parte da cascata de sinais da IL-10 em indivíduos com e sem SD frente à DP. Lembrando que a IL-10 é uma citocina com ação principalmente anti-inflamatória e que faz parte da resposta imune tipo Th2²⁶, observou-se neste estudo que indivíduos com DP mas sem SD manifestaram super expressão de *IL10* como uma forma de conter o processo inflamatório desencadeado pela DP (Fig. 9). Esse resultado condiz com o de Garlet et al.³⁰ (2003) que mostra maior expressão de *IL10* no tecido gengival de indivíduos com Doença Periodontal Crônica em comparação com indivíduos sem DP. Também foi demonstrado que a IL-10 tem papel inibidor sobre a ação de LPS de *T.forsythensis* que é uma bactéria importante no desenvolvimento da DP⁹⁸.

Indivíduos com SD, independente de apresentarem DP, manifestaram uma sub expressão de *IL10* (Figuras 7, 8 e 10). Dentre os indivíduos que têm SD (A – B), o processo inflamatório dado pela DP promove maior expressão *IL10* numa tentativa de conter a inflamação. No entanto, nota-se que a expressão de *IL10* é quase a metade (82% - Figura 6) em comparação à expressão de *IL10* nos indivíduos que não tem síndrome (157% - Figura 9) e 1,4 vezes menor que aqueles que têm DP independentemente da SD (116% - Figura 11), frente ao mesmo estímulo inflamatório dado pela DP.

Para iniciar a sinalização da IL-10, esta citocina tem que se ligar a receptores na superfície celular, que são os IL10RA e IL10RB^{23,38,48,58,61}. A IL10 se liga primeiramente ao IL10RA por apresentar uma alta afinidade com esse receptor. Em seguida, depois de já ligados IL10/IL10RA, o receptor IL10RB se associa ao complexo⁴⁸. Esse mecanismo funcional concorda com os achados desta pesquisa, já que, o nível de expressão de *IL10* foi compatível com a do *IL10RA* nas comparações independentes da SD (Figuras 9 e 11). Nos indivíduos com SD quando comparados com diferentes calibradores formados por indivíduos sem síndrome (Figuras 7, 8 e 10), a expressão de *IL10* e *IL10RA* foi proporcional, mostrando uma deficiência principalmente na expressão de *IL10* (de 78 a 81%) e em menor nível de *IL10RA* (de 21 a 24%).

É possível notar uma super expressão de *IL10RB* nos grupos onde a SD é o fator diferencial em relação ao calibrador (24% Figura 7; 92% Figura 8; 55% Figura 10). Esse resultado condiz com o fato do gene *IL10RB* estar localizado no cromossomo 21⁷⁴. Os indivíduos com SD apresentam um cromossomo 21 a mais, o que explica a super expressão desse gene em relação a indivíduos cromossomicamente normais.

A ligação de *IL10* aos receptores dá início à transdução do sinal para o meio intracelular que inclui a fosforilação de *JAK1*, que está associada ao *IL10RA* (Figura 2)^{23,48}. Resultados obtidos

nesta pesquisa comprovam uma correspondência entre os níveis de expressão de *IL10RA* e *JAK1*, uma vez que não houve diferença estatística em nenhuma das comparações entre os diferentes grupos para os níveis de expressão de *IL10RA* e *JAK1* (Quadros 2, 3, 4, 5, 6 e 7).

Segundo Donnelly et al.²³ (1999) o *STAT3* é um fator de transcrição essencial na via de sinalização de IL10, sendo, portanto ativado pela IL10. Já para Crepaldi et al.²⁰ (2001), Kinjyo et al.⁴⁶ (2006) e Cassatella et al.¹⁷ (1999) a expressão de *STAT3* não é completamente dependente do gene *IL10*. Neste estudo comparando os níveis de expressão de *IL10* e *STAT3*, os resultados parecem concordar com a idéia de correlação entre *IL10* e *STAT3*, pois viu-se que havia uma diferença estatística entre eles (Quadros 3, 4, 5, 6 e 7), exceto para a comparação dos grupos A-B. Portanto, os resultados deste estudo parecem indicar uma relação significativa na expressão de *IL10* e *STAT3*, pois também se observa que quando a expressão de *IL10* aumenta a expressão de *STAT3* diminui (Figuras 9 e 11) ou o contrário (Figuras 7, 8 e 10). Além disso, analisando os níveis de expressão de *STAT3* não se observou diferença estatística nas diferentes comparações entre grupos, portanto, neste estudo a expressão de *STAT3* apresentou-se independente da presença de SD e/ou DP (Figuras 6, 7, 8, 9, 10 e 11).

A expressão de *IL10* induz rapidamente (30 min.) a expressão de SOCS3 pela habilidade de induzir a fosforilação de tirosina do *STAT3*⁴¹. Donnelly et al.²³ (1999) concorda com Ito et al.⁴¹ (1999) ao

afirmar que *IL10* induz a expressão de *SOCS3* em monócitos. Analisando as diferentes comparações entre os grupos investigados neste estudo, (Figuras 6, 7, 8, 9, 10 e 11) observa-se uma equivalência de expressão entre o *IL10* e *SOCS3*, o que concorda com a afirmação de que *IL10* induz a expressão de *SOCS3*^{41,89}. É possível notar que quando a expressão de *IL10* aumenta, a expressão de *SOCS3* também aumenta nas comparações evidenciando a presença da DP (Figuras 6, 9 e 11); quando *IL10* diminui, *SOCS3* parece acompanhá-lo nas comparações evidenciando a presença da SD (Fig 7, 8 e 10). Como *SOCS3* funciona como um feedback negativo para o *IL10*¹⁰⁰, acredita-se que o organismo imunocompetente busque um equilíbrio entre a expressão desses genes, controlando assim o processo inflamatório⁵⁹. No entanto, em um organismo com resposta imune deficiente, como no caso deste estudo que foca indivíduos com SD, tanto *IL10* quanto *SOCS3* estão expressos em níveis menores (1,9 vezes para *IL10* e 3 vezes para *SOCS3*). Em outras palavras, evidenciando a presença de DP como estímulo inflamatório, indivíduos cromossomicamente normais têm super expressão de *IL10* (157%) e de *SOCS3* (288%) (Figura 9), já indivíduos com SD têm níveis bem menores de expressão de *IL10* (81%) e *SOCS3* (92%).

A IL-10 pode inibir a expressão de alguns genes que são induzidos pelo IFN- γ , dentre eles citam-se o *ICAM1* e *IP10*^{41,92}. Ito et al.⁴¹ (1999) demonstrou em monócitos humanos que IL-10 inibiu a

expressão dos genes *IP10* e *ICAM1*. A habilidade de IL-10 em inibir *ICAM1* e *IP10* está correlacionada com a indução de *SOCS3*⁴¹. A expressão de *SOCS3* atuaria como um gene intermediário na via de inibição da expressão de outros genes como *IP10* e *ICAM1*⁴¹. Tanto o *ICAM1* como o *IP10* apresentam uma seqüência ativadora interferon gama (GAS) na sua região promotora⁴¹, a qual tem função semelhante ao elemento ligante de STAT (SBE) presente na região promotora do *SOCS3*²³. Os achados desta pesquisa mostram uma responsividade à *IL10* pelos genes *SOCS3* e *ICAM1* (Figuras 6, 7, 8, 9, 10 e 11). A expressão do gene *IP10* não apresentou uma relação tão estreita com a expressão dos genes *IL10*, *SOCS3*, e *ICAM1*, como se pode observar principalmente na Figura 10. Esses dados podem ser interpretados como uma indicativa de que na expressão de *IP10* haveria influência de outros genes que não aqueles presentemente investigados (ex. STAT1). Segundo Luster et al.⁶⁰ (1995), Sgadari et al.⁸⁶ (1996) e Xia et al.¹⁰¹ (1997), o *IP10* tem maior expressão nos processos inflamatórios crônicos. Essa afirmativa concorda com os resultados visualizados nas Figura 9 (superexpressão em 123%), Figura 11 (65%), e em menor nível (23% - Figura 6); onde se nota maior expressão de *IP10* nos grupos com DP (processo inflamatório) quando comparados a um calibrador formado por um grupo que não tinha DP.

Em um estudo que investigou a expressão genética no timo de quatro crianças com SD pareadas por idade com crianças sem

síndrome, demonstrou que *ICAM1* foi mais expresso nos indivíduos com SD e que a distribuição de *ICAM1* na região cortical e medular do timo estava alterada em comparação com indivíduos cromossomicamente normais⁶⁶. Essa elevada expressão de *ICAM1* e sua distribuição anômala no timo pode levar à interação aumentada e inapropriada entre os timócitos em desenvolvimento e o estroma do timo⁶⁶. Essas interações aberrantes podem resultar em deleção aumentada de timócitos no timo de indivíduos com SD e explicam a depleção cortical^{10,55}, além da proporção diminuída de linfócitos maduros expressando altos níveis de TCR- α,β e CD3 no timo de indivíduos com SD⁶⁶. Diferentemente do timo, neste estudo em que foi avaliada a expressão genética em tecido gengival, observou-se que indivíduos com SD manifestaram sub expressão de *ICAM1* (72%) em comparação com indivíduos cromossomicamente normais, independentemente de terem DP (Figura 10). Considerando que a expressão de *ICAM1* é um fator importante no mecanismo de adesão de linfócitos T CD8⁺ a células apresentadoras de antígenos, pode-se depreender que se indivíduos com SD expressam menos *ICAM1* isso pode contribuir com a imunodeficiência que esses indivíduos apresentam. Um importante dado que dá suporte à essa suposição foi a constatação de que linfócitos de indivíduos com SD são menos adesivos a *ICAM1* em relação a indivíduos cromossomicamente normais, embora a expressão de LFA1 tenha sido compatível entre eles; portanto, linfócitos de indivíduos com SD têm menos adesividade comparando-se a indivíduos

sem síndrome⁵⁶. No entanto, no presente estudo foi observado que em indivíduos cromossomicamente normais frente à DP, *ICAM1* está superexpresso (119% - Figura 9; 106% - Figura 11) acompanhando a superexpressão de *IL10* e *SOCS3*. Esse resultado concorda com dados prévios que demonstraram maior expressão de *ICAM1* em biópsias de tecido gengival de indivíduos com periodontite e (em menor grau) com gengivite⁵¹, assim como em cultura de células (indivíduos cromossomicamente normais) de: a) epitélio oral após indução por produtos solúveis de *Eikenella corrodens*, um importante periodontopatógeno¹⁰³; b) células endoteliais após estímulo de *P. gingivalis*⁷⁸; c) monócitos e células de ligamento periodontal após indução por periodontopatógenos do gênero *Treponema*⁵³; d) fibroblastos gengivais após estímulo com a citocina pró-inflamatória IL-2⁷¹.

Do presente estudo, que permitiu várias comparações entre grupos com diferentes calibradores resultando em várias informações, de forma geral, depreendeu-se que os genes *IL10*, *SOCS3*, *IP10* e *ICAM1* foram os que mais se destacaram, demonstrando expressão significativamente menor em indivíduos com SD independente da presença de DP (A+B – C+D), comparando-se aos indivíduos cromossomicamente normais com DP (C-D). Adicionalmente, entre indivíduos com SD, os que têm DP (A-B) mostraram uma elevação da expressão desses mesmos genes em relação à comparação (A+B – C+D), mas esta foi cerca de 2,8 vezes menor que a expressão observada

em indivíduos cromossomicamente normais (C-D), frente ao mesmo estímulo inflamatório dado pela DP. Esses dados parecem indicar que indivíduos com SD têm deficiência em um importante mecanismo da resposta antiinflamatória que parece ser inerente à trissomia do cromossomo 21, e que mesmo entre indivíduos com SD o controle da inflamação é menor se comparado a indivíduos com número normal de cromossomos. Isso provê uma nova informação à gama de mecanismos da resposta imune que se mostram deficientes em indivíduos com SD^{4,9,32,45,49,56,85,93}. O menor controle da resposta inflamatória dada pela sub expressão dos genes *IL10*, *SOCS3*, *IP10* e *ICAM1* em indivíduos com SD em relação aos cromossomicamente normais, pode explicar em parte a maior susceptibilidade que indivíduos com SD manifestam a doenças infecciosas e inflamatórias relacionadas, por exemplo, ao aparelho respiratório¹¹ e periodontais⁶.

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 outros aspectos da resposta imune que se apresentam deficientes nesses indivíduos em comparação com aqueles cromossomicamente normais. Isso pode nortear outros grupos de pesquisadores em busca de terapias mais direcionadas e eficientes em indivíduos com SD, como novos fármacos, o que poderia proporcionar

melhoria da saúde dos portadores da SD e ganhos inestimáveis à sua qualidade de vida e dos seus responsáveis.

Conclusão

Conclusão

Em tecido gengival humano, ao avaliar a expressão do gene *IL10* e outros relacionados à sua cascata de ação em indivíduos com Síndrome de Down frente à Doença Periodontal, comparando-se a indivíduos cromossomicamente normais com e sem DP observou-se que:

- indivíduos com SD apresentaram uma expressão significativamente maior do gene *IL10RB*, o qual reside no cromossomo 21;
- indivíduos com SD independente da presença de DP (A+B – C+D), têm expressão significativamente menor dos genes *IL10* ($p=0,001$), *SOCS3* ($p<0,0001$), *IP10* ($p=0,002$) e *ICAM1* ($p=0,0001$) 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 frente à DP apresentaram uma elevação na expressão dos genes *IL10*, *SOCS3*, *IP10* e *ICAM1* como uma tentativa de controlar a inflamação, mas mesmo assim, ainda apresentaram 2,8 vezes menor expressão que indivíduos sem síndrome frente ao mesmo estímulo inflamatório dado pela DP.

Referências

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 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.
- 4 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.
- 5 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.
- 6 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.

- 7 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.
- 8 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.
- 9 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.
- 10 Benda CE, Strassmann GS. The thymus in mongolism. *J Ment Defic Res.* 1965;9:109-17.
- 11 Bittles AH, Bower C, Hussain R, Glasson EJ. The four ages of Down syndrome. *Eur J Public Health.* 2007;17:221-5.
- 12 Borges-Osorio MR, Robinson WM. As bases cromossômicas da hereditariedade: alterações cromossômicas. *Genética humana.* 2^a ed. Porto Alegre: Artmed; 2002. p. 68-115.
- 13 Brooksbank BW, Balazs R. Superoxide dismutase and lipoperoxidation in Down's syndrome fetal brain. *Lancet.* 1983;1(8329):881-2.
- 14 Brown RH. A longitudinal study of periodontal disease in Down's syndrome. *NZ Dent J.* 1978;74:137-44.

- 15 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.
- 16 Carter CO, Hamerton JL, Polani PE, Gunalp E, Weller SD. Chromosome translocation as a cause of familial mongolism. *Lancet* 2. 1960:278-80.
- 17 Cassatella MA, Gasperini S, Bovolenta C, Calzetti F, Vollebregt M, Scapini P, et al. Interleukin-10 (IL-10) selectively enhances CIS3/SOCS3 mRNA expression in human neutrophils: evidence for an IL-10-induced pathway that is independent of STAT protein activation. *Blood.* 1999;94:2880-9.
- 18 Ciamponi AL, Guaré RO. A criança com trissomia do cromossomo 21 (síndrome de Down). *Odontopediatria: resoluções clínicas.* Curitiba: Ed. Maio; 2000. p. 301-12.
- 19 Cichon P, Crawford L, Grimm WD. Early-onset periodontitis associated with Down's syndrome – clinical interventional study. *Ann Periodontol.* 1998;3:370-80.
- 20 Crepaldi L, Gasperini S, Lapinet JA, Calzetti F, Pinaridi C, Liu Y, et al. Up-regulation of IL-10 expression is required to render human neutrophils fully responsive to IL-10. *J Immunol.* 2001;167:2312-22.
- 21 Cutress TW. Periodontal disease and oral hygiene in trisomy 21. *Arch Oral Biol.* 1971;16:1345-55.
- 22 Desai SS. Down syndrome: a review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997; 84: 279-85.

23 Donnelly PR, Dickensheets H, Finbloom DS. The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. *J Interferon and Cytokine Res.* 1999;19:563-73.

24 Down JLH. Observation on ethnic classification of idiots. *London Hosp Rep.* 1899;3:259-63.

25 Fedi Jr PF, Vernino AR. *Fundamentos da periodontia.* 3^a ed. São Paulo: Premier Editora; 1998.

26 Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T-helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med.* 1989;170:2081-95.

27 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.

28 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.

29 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.

30 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.

31 Gemmell E, Seymour GJ. Modulation of immune responses to periodontal bacteria. *Curr Opin Periodontol.* 1994;28-38.

32 Gregory I, Williams R, Thompson E. Leucocyte function in Down's syndrome and acute leukaemia. *Lancet.* 7765.1972:1359.

33 Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal disease. *Periodontol.* 1994;5:78-111.

34 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.

35 Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet.* 2001;2:280-91.

36 Hassold T, Sherman S. Down syndrome: genetic recombination and the origin of the extra chromosome 21. *Clin Genet.* 2000;57:95-100.

37 Hilton DJ, Richardson RT, Alexander WS, Viney EM, Willson TA, Sprigg NS, et al. Twenty proteins containing a c-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:114-9.

38 Ho AS, Wei SH, Mui AL, Miyajima A, Moore KW. Functional regions of the mouse interleukin-10 receptor cytoplasmic domain. *Mol Cell Biol.* 1995;15:5043-53.

- 39 Hook EB, Cross PK, Schreinemachers DM. Chromosomal abnormality rates at amniocentesis and in live-born infants. *J Am Med Assoc.* 1983;249:2034-8.
- 40 Horewicz VV, Furuse C, Araújo VC, Cury PR. Susceptibilidade genética à periodontite crônica. *Rev Periodontia.* 2006;16:96-110.
- 41 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.
- 42 Izumi Y, Sugiyama S, Shinozuka O, Yamazaki T, Ishikawa I. Defective neutrophil chemotaxis in Down's syndrome patients and its relationship to periodontal destruction. *J Periodontol.* 1989;62:238-42.
- 43 Johnson GK, Slach NA. Impact of tobacco use on periodontal status. *J Dent Educ.* 2001;65:313-21.
- 44 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.
- 45 Khan AJ, Evans HE, Glass L, Skin YH, Almonte D. Defective neutrophil chemotaxis in patients with Down syndrome. *J Pediatr.* 1975;87:87-9.
- 46 Kinjyo I, Inoue H, Hamano S, Fukuyama S, Yoshimura T, Koga K, et al. Loss of SOCS3 in T helper cells resulted in reduced immune responses and hyperproduction of interleukin 10 and transforming growth factor-beta 1. *J Exp Med.* 2006;203:1021-31.

47 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.

48 Kotenko SV, Krause CD, Izotova LS, Pollack BP, Wu W, Pestka S. Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. *EMBO J.* 1997;16:5894-903.

49 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.

50 Lange N, Bartold PM, Cullinan M, Jeffcoat M, Mombelli A, Murakami S, et al. Consensus report: aggressive periodontitis. *Ann Periodontol.* 1999;4:53.

51 Lappin DF, McGregor AM, Kinane DF. The systemic immune response is more prominent than the mucosal immune response in the pathogenesis of periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2003;30:778-86.

52 Lascala NT, Moussalli NH. *Periodontia clínica: especialidades afins.* São Paulo: Artes Médicas;1980.

53 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.

54 Lejeune J, Gautier M, Turpin R. Study of Somatic chromosomes from 9 mongoloid children. *C R Hebd Seances Acad Sci.* 1959;248:1721-2.

55 Levin S, Schlesinger M, Handzel Z, Hahn T, Altman Y, Czernobilsky B, et al. Thymic deficiency in Down's syndrome. *Pediatrics*. 1979;63:80-7.

56 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.

57 Linden GJ, Mullally BH, Freeman R. Stress and the progression of periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1996;23:675-80.

58 Liu Y, Wei SH, Ho AS, Waal Malefyt R, Moore KW. Expression cloning and characterization of human IL-10 receptor. *J Immunol*. 1994;152:1821.

59 Lombardi A, Cantini G, Piscitelli E, Gelmini S, Francalanci M, Mello T, et al. A new mechanism involving ERK contributes to rosiglitazone inhibition to tumor necrosis factor-alpha and interferon-gama inflammatory effects in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:718-24.

60 Luster AD, Greenberg SM, Leder P. The IP-10 chemokine binds to a specific cells surface heparin sulfate site shared with platelet factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation. *J Exp Med*. 1995;182:219-31.

61 Lutfalla G, Gardiner K, Uzé G. A new member of the cytokine receptor gene family maps on chromosome 21 at less than 35 Kb from IFNAR. *Genomics*. 1993;16:366-73.

62 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.

63 Mealy BL. Diabetes and periodontal disease: two sides of a coin. *Compend Contin Educ Dent*. 2000;21:943-6.

64 Modeer T, Barr M, Dahllof G. Periodontal disease in children with Down's syndrome. *Scand J Dent Res*. 1990;98:228-34.

65 Morinushi T, Lopatin DE, Van Poperin N. The relationship between gingivitis and the serum antibodies to the microbiota associates with periodontal disease in children with Down's syndrome. *J Periodontol*. 1997;68:626-31.

66 Murphy M, Insoft RM, Pike-Nobile L, Derbin KS, Epstein LB. Overexpression of LFA-1 and ICAM-1 in Down syndrome thymus. Implications for abnormal thymocyte maturation. *J Immunol*. 1993;150:5696-703.

67 Mustacchi Z, Peres S. *Genética baseada em evidências, síndromes e heranças*. São Paulo: CID Editora; 2000.

68 Mustacchi Z, Rozone G. *Síndrome de Down. Aspectos clínicos e odontológicos*. São Paulo: Ed. CID; 1990.

69 Nizetic D. Function genomics of the Down syndrome. *Croat Med J*. 2001;42:421-7.

70 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.

71 Ozawa A, Tada H, Tamai R, Uehara A, Watanabe K, Yamaguchi T, et al. Expression of IL-2 receptor beta and gamma chains by human gingival fibroblasts and p-regulation of adhesion to neutrophils in response to IL-2. *J Leukoc Biol.* 2003;74:352-9.

72 Pennisi E. And the gene number is...?. *Science.* 2000;288:1146-7.

73 Pimentel LM. Estima-se que haja oitenta mil brasileiros com Down [citado 2008 Jan 1]. Disponível em: <http://www.terra.com.br/saude/vidasaudavel>

74 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.

75 Reuland-Bosma W, van Dijk J. Periodontal disease in Down's síndrome: a review. *J Clin Periodontol.* 1986;13:64-73.

76 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.

77 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.

78 Roth GA, Moser B, Roth-Walter F, Giacona MB, Harja E, Papapanou PN, et al. Infection with a periodontal pathogen increases mononuclear cell adhesion to human aortic endothelial cell. *Atherosclerosis.* 2007;190:271-81.

79 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.

80 Savva GM, Morris JK, Mutton DE, Alberman E. Maternal age-specific fetal loss rates in Down syndrome pregnancies. *Prenat Diagn.* 2006; 26:499-504.

81 Saxen L, Aula S. Periodontal bone loss in patients with Down's syndrome. A follow-up study. *J Periodontol.* 1982;53:158-62.

82 Saxen L, Aula S, Westermarck T. Periodontal disease associated with Down's syndrome. An Orthopantomographic evaluation. *J Periodontol.* 1977;48:337-40.

83 Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB, Line SR. Investigation of an IL-2 polymorphism in patients with different levels of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2002;29:587-91.

84 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.

85 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.

86 Sgadari C, Angiolillo AL, Cherney BW, Pike SE, Farber JM, Koniaris LG, et al. Interferon-inducible protein-10 identified as a mediator of tumor necrosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:13791-6.

87 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 Periodontal Res*. 2001;36:183-6.

88 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.

89 Shen X, Hong F, Nguyen VA, Gao B. IL-10 attenuates IFN-alpha-activated STAT1 in the liver: involvement of SOCS2 and SOCS3. *FEBS Lett*. 2000;480:132-6.

90 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.

91 Silness P, Löe H. Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand*. 1964;22:121-35.

92 Song S, Ling-Hu H, Roebuck KA, Rabbi MF, Donnelly RP, Finnegan A. Interleukin-10 inhibits interferon-gamma-induced intercellular adhesion molecule-1 gene transcription in human monocytes. *Blood*. 1997;89:4461-9.

- 93 Sreedevi H, Munshi AK. Neutrophil chemotaxis in down syndrome and normal children to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Pediatr Dent*. 1998;22:141-6.
- 94 Stabholz A, Mann J, Sela M, Schurr D, Steinberg D, Shapira J. Caries experience, periodontal treatment needs, salivary pH, and *Streptococcus mutans* counts in a preadolescent Down syndrome population. *Spec Care Dentist*. 1991;11:203-8.
- 95 Swallow NJ. Dental disease in children with Down's syndrome. *J Ment Defic Res*. 1964;8:102-18.
- 96 Tonetti, MS, Mombelli A. Early onset periodontitis. *Ann Periodontol*. 1999;4:39-53.
- 97 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.
- 98 Wang PL, Shirasu S, Shinohar M, Azuma Y, Daito M, Yasuda H, et al. IL-10 inhibits *Porphyromonas gingivalis* LPS-stimulated human gingival fibroblasts production of IL-6. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 263: 372-7.
- 99 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.
- 100 Wong PK, Egan PJ, Croker BA, O'Donnell K, Sims NA, Drake S, et al. SOCS-3 negatively regulates innate and adaptive immune mechanisms in

acute IL-1-dependent inflammatory arthritis. *J Clin Invest.* 2006;116:1571-81.

101 Xia Y, Pauza ME, Feng L, Lo D. Rel. Regulation of chemokine expresión modulates local inflammation. *Am J Pathol.* 1997;151:375-87.

102 Yamamoto M, Fujihashi K, Hiroi T, McGhee JR, Van Dyke TE, Kiyono H. Molecular and cellular mechanisms for periodontal diseases: the role of Th1 and Th2 type cytokines in induction of mucosal inflammation. *J Periodontal Res,* 1997;32:115-9.

103 Yumoto H, Yamada M, Shinohara C, Nakae H, Takahashi K, Azakami H, et al. Soluble products from *Eikenella corrodens* induce cell proliferation and expression of interleukin-8 and adhesion molecules in endothelial cells via mitogen-activated protein kinase pathways. *Oral Microbiol Immunol.* 2007;22:36-45.

Anexos

Anexo 1

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



Anexo 2

Gene Alvo	Número de Acesso	Primer		Produto	Tm (°C)
		Tipo	Sequencia		
β-Actina	NM_001101.3	F	5' AAGCCACCCCACTTCTCTCTAA 3'	1509 - 1530	88
		R	5' AATTTACACGAAAGCAATGCTATCA 3'		
IL-10	NM_000572	F	5' GCCAGGGCACCCAGTCT 3'	121-137	74
		R	5' TCGGAGATCTCGAAGCATGTT 3'		
IL10-RA	NM_001558	F	5' CGTCTCCTGAGGTATGGAATAGAG 3'	253-275	115
		R	5' GCCCGGTAGCCATTGCT 3'		
IL10-RB	NM_000628	F	5' AATGGAGTGAGCCTGTCTGTGA 3'	707-728	90
		R	5' TGAAGACCCGAGGCCATGAG 3'		
JAK-1	NM_002227	F	5' GTCACAACCTCTTTGCCCTGTAT 3'	470-492	91
		R	5' CGGAGGGACATCTTGTCAATCA 3'		
STAT-3	NM_139276	F	5' TGCTGAAATCATCATGGGCTATA 3'	2190-2212	90
		R	5' TCCTTGGGAATGTCAGGATAGAG 3'		
SOCS3	NM_003955	F	5' TCCCCCAGAAAGAGCCTATT 3'	893-912	90
		R	5' GTCTTCCGACAGAGATGCTGAA 3'		
IP-10	NM_001504	F	5' ACTGCCCTTCTCATTTGGAAAC 3'	1410-1431	100
		R	5' CCTGGGCTGTGGCTTCAT 3'		
ICAM-1	NM_000201	F	5' GAAAATTTCCAGCAGACTCCAA 3'	1288-1309	94
		R	5' CGATGGGCAGTGGGAAAGT 3'		