

MARCIA HIROMI TANAKA

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E IMUNOLÓGICA DO FLUIDO  
GENGIVAL E PROTEOMA SALIVAR DE INDIVÍDUOS COM  
SÍNDROME DE DOWN COM DOENÇA PERIODONTAL

Orientadora:  
Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro

SER DIFERENTE  
É NORMAL

Araraquara  
2014



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



MARCIA HIROMI TANAKA

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E IMUNOLÓGICA DO FLUIDO  
GENGIVAL E PROTEOMA SALIVAR DE INDIVÍDUOS COM  
SÍNDROME DE DOWN COM DOENÇA PERIODONTAL

Araraquara

2014



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



*MARCIA HIROMI TANAKA*

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E IMUNOLÓGICA DO FLUIDO  
GENGIVAL E PROTEOMA SALIVAR DE INDIVÍDUOS COM  
SINDROME DE DOWN COM DOENÇA PERIODONTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas - Área de Odontopediatria, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para a obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Orientadora:  
Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro

Araraquara  
2014

Tanaka, Marcia Hiromi

Análise microbiológica e imunológica do fluído gengival e proteoma salivar de indivíduos com Síndrome de Down com doença periodontal / Márcia Hiromi Tanaka.-- Araraquara: [s.n.], 2014.

110 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro

1. Síndrome de Down 2. Periodontite 3. Proteínas e peptídeos salivares 4. Microbiologia I. Título

**MARCIA HIROMI TANAKA**

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E IMUNOLÓGICA DO FLUIDO GENGIVAL E  
PROTEOMA SALIVAR DE INDIVÍDUOS COM SINDROME DE DOWN COM  
DOENÇA PERIODONTAL

COMISSÃO JULGADORA

DEFESA DE TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro

2º Examinador: Prof. Dr. Walter Luiz Siqueira

3º Examinador: Profa. Dra. Cristiane Yumi Koga-Ito

4º Examinador: Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

5º Examinador: Prof. Dr. Cyneu Aguiar Pansani

Araraquara, 28 de março de 2014.

## **DADOS CURRICULARES**

### **Marcia Hiromi Tanaka**

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

- 2009/2010** Curso de Pós-Graduação em Odontologia Legal. Nível de Especialização, Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP
- 2010/2014** Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de concentração Odontopediatria. Nível Doutorado, Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP
- 2013/2013** Estágio de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) no Departamento de Bioquímica, Schulich School of Medicine & Dentistry, The University of Western Ontario, London, Ontario, Canada

*Todo mundo tem seu jeito singular  
De ser feliz, de viver e de enxergar  
Se os olhos são maiores ou são orientais  
E daí, que diferença faz?  
Todo mundo tem que ser especial  
Em oportunidades, em direitos, coisa e tal  
Seja branco, preto, verde, azul ou lilás  
E daí, que diferença faz?  
Já pensou, tudo sempre igual?  
Ser mais do mesmo o tempo todo não é tão legal  
Já pensou, sempre tão igual?  
Tá na hora de ir em frente:  
Ser diferente é normal!  
Todo mundo tem seu jeito singular  
De crescer, aparecer e se manifestar  
Se o peso na balança é de uns quilinhos a mais  
E daí, que diferença faz?  
Todo mundo tem que ser especial  
Em seu sorriso, sua fé e no seu visual  
Se curte tatuagens ou pinturas naturais  
E daí, que diferença faz?  
Já pensou, tudo sempre igual?  
Ser mais do mesmo o tempo todo não é tão legal  
Já pensou, sempre tão igual?  
Tá na hora de ir em frente:*

***Ser diferente é normal!***

Vinícius Castro

DEDICATÓRIA

---

## **Dedico este trabalho...**

### **Aos meus queridos pais, Yuki e Alice**

Vocês são a minha fonte de energia, força e amor. Faltam-me palavras para expressar todo o amor e gratidão, por tanta demonstrações de carinho, compreensão, renúncia, dedicação e incentivo que me dispensaram durante toda esta jornada, sempre respeitando as minhas decisões. Eu sei q não foi fácil apoiar as minhas decisões durante esta jornada mas reconheço o sacrifício e agradeço enormemente. Obrigada por sempre compreenderem a minha necessidade, persistência e até mesmo a minha ausência. AMO MUITO VOCÊS!

### **A Profa. Dra. Elisa Maria Ap. Giro**

Tia Elisa!!! Não é só minha orientadora mas é uma grande amiga! Não tenho palavras para agradecer todo o carinho, apoio e dedicação que recebi não só durante esta jornada mas nesses muitos, muitos e muitos anos de convivência (...rs). Você é uma pessoa única, com o coração ENORME!!!!!! Sempre prestativa não importando quem seja e sempre recebendo todos de braços abertos. Aprendi muito com você! Sua dedicação e seu profissionalismo me inspiram até hoje. Ah...um ensinamento que me marcou e levarei comigo é seu amor incondicional pelos NOSSOS queridos pacientes com necessidades especiais. Sim, esse bichinho me picou também...rs. Amo você, Tia Elisa!

### **Aos meus querido avós Takeru e Toko Tanaka (*in memoriam*)**

Que saudades de vocês! Dítiam, você se foi tão cedo mas me lembro de todas as brincadeiras que fazíamos juntos, principalmente quando você me colocava pra fazer odori...rs. Batiam, guerreira, estudiosa e teimosa também (característica que definitivamente herdei de você). É assim que me lembro com carinho de você...rs. Com vocês aprendi que devo perseguir meus sonhos e nunca desistir! Tenho certeza que estão no céu sempre torcendo por mim. Amo vocês!

### **Aos meus padrinhos, Hideki (*in memoriam*) e Nilza**

Padrinho, saudades de você! Você faz e fará uma falta enorme mas tenho certeza que está ao meu lado me incentivando em todos os momentos da minha vida. Assim como você, Madrinha. Só tenho que me desculpar pela minha enorme ausência mas saiba que te amo! Agradeço a Deus por ter vocês como meus padrinhos!

### **Ao meu namorado Rogério**

=\* ...rs. Obrigada por fazer minha vida tão animada e FELIZ. Por ter compreendido e respeitado minha dedicação aos estudos, acima de tudo me apoiando e sempre me estimulando a buscar o MELHOR. Sou eternamente grata pelo seu carinho e compreensão em todos os momentos estressantes (no mestrado e agora no doutorado). Por ter respeitado os momentos que estava ausente para realização deste trabalho, nós sabemos que não foi fácil mas no final foi recompensador. Só tenho a agradecer à Deus por ter te colocado na minha vida! Amo muito você!

### **Aos meus queridos irmãos Yooiti e Yassushi**

Obrigada pela paciência e compreensão durante todos esses anos. Agradeço também a disposição, carinho e por terem me ajudado muito durante esta jornada. Saibam que sem vocês este sonho não teria acontecido. Muito obrigada! Amo vocês!

### **Aos meus sobrinhos Vitinho e Jun**

Esses dois já cresceram e estão quase uns adolescentes. Mas como sempre dizem, aos olhos da tia serão eternas crianças...rs. Espero curtir mais vezes como nós curtimos as férias de vocês no Canadá, principalmente, com a família reunida. Tia, ama muito vocês!

**ESSA CONQUISTA É DE TODOS**

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

---

### **À Deus**

Obrigada Meu Deus pela presença constante, por ter me abençoada com uma família e amigos maravilhosos, pelos ensinamentos diários e por me dar saúde e forças para lutar e seguir meu caminho. Obrigada Senhor.

### **Aos pacientes desta pesquisa**

Agradeço com enorme carinho à TODOS os pacientes que participaram desta pesquisa, principalmente, aos pacientes com Síndrome de Down e seus responsáveis. Obrigada por confiarem no meu trabalho e me ajudarem a realizar esta pesquisa.

### **A Profa. Dra. Raquel M. Scarel Caminaga**

Exemplo de professora, educadora e pesquisadora, sempre disposta a ajudar a todos. Agradeço por ter acreditado no meu trabalho e ter me incentivado a continuá-lo no doutorado. Com você aprendi que devemos ser humildes para dizer que não sabemos mas com certeza possuímos a perseverança e a persistência para aprender. Obrigada por ter me ajudado nas situações de incertezas. Agradeço profundamente!

### **Ao Prof. Dr. Walter Luiz Siqueira**

Exemplo de determinação e profissionalismo. Obrigada pela disponibilidade e confiança durante meu estágio em London, na Universidade de Western Ontario, CA. Apesar de ficar nervosa com os seus questionamentos quero agradecer por tê-los e, principalmente, por dividi-los comigo. Com você aprendi que devemos sempre questionar independente dos resultados. Agradeço a enorme contribuição à minha formação profissional e crescimento pessoal, e pela oportunidade de trabalhar sob a sua supervisão, ampliando meus conhecimentos! Agradeço a sua esposa Michele e seus filhos Joseph e Thomas, por terem sempre me recebido com carinho e com um sorriso enorme!

Thank you very much!

### **À Thamiris Orrico Rodrigues**

Tha!!!Minha amiga e companheira em TODOS os momentos da pesquisa, desde as estradas que percorremos até os momentos engraçados dos atendimentos clínicos. Sempre ajudando e me acalmando nos momentos difíceis do desenvolvimento desse trabalho. Só você sabe todos os momentos de incertezas, dúvidas e conquista que passamos sempre juntas. Muito obrigada!!!!

## **À Lívia Sertori Finoti**

Lí!!!!!! A Parceira de pesquisa!!!! Só tenho que agradecer por tudo que você me ajudou nesta pesquisa. Me socorreu de vários apuros, sempre com muita calma e humildade! Te admiro muito viu! Você tem um coração do tamanho do mundo e sempre está de braços abertos. Tenho orgulho da profissional que você se tornou e da amiga que você continua sendo até hoje! Espero poder retribuir todo carinho e dedicação que você teve comigo. Obrigada parceira!

## **Às minhas queridas amigas “irmãs de coração”**

Cármem, Dulce, Emi e Michele, agradeço por todos os momentos compartilhados nas alegrias e nas dificuldades. Apesar da distância nossa amizade continua a mesma! Obrigada pelas risadas e pelas broncas, seja pessoalmente ou pelo whatsapp. Sempre me divirto com vocês! Deus não me deu irmãs de sangue mas me deu vocês! Obrigada frenéticas! Esse time agora tem um mascote, o João Victor! Bem vindo querido sobrinho!!!! =D

*Abençoados os que possuem amigos, os que os têm sem pedir.*

*Porque amigo não se pede, não se compra, nem se vende.*

*Amigo a gente sente!*

*Benditos os que sofrem por amigos, os que falam com o olhar.*

*Porque amigo não se cala, não questiona, nem se rende.*

*Amigo a gente entende!*

*Benditos os que guardam amigos, os que entregam o ombro pra chorar.*

*Porque amigo sofre e chora.*

*Amigo não tem hora pra consolar!*

*Benditos sejam os amigos que acreditam na tua verdade ou te apontam a realidade.*

*Porque amigo é a direção.*

*Amigo é a base quando falta o chão!*

*Benditos sejam todos os amigos de raízes, verdadeiros.*

*Porque amigos são herdeiros da real sagacidade.*

*Ter amigos é a melhor cumplicidade!*

*Há pessoas que choram por saber que as rosas têm espinho,*

*Há outras que sorriem por saber que os espinhos têm rosas!*

*Machado de Assis (Bons Amigos)*

## AGRADECIMENTOS

---

**À Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP**, representados pela digníssima Diretora Profa. Dra. Andréia Afonso Barretto Montandon e Vice-Diretora Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato.

**Aos professores da banca examinadora**

Prof. Dr. Walter Luiz Siqueira, Profa. Dra. Cristiane Yumi Koga-Ito, Prof. Dr. Cyneu Aguiar Pansani, Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel-Caminaga por aceitarem prontamente meu convite e me darem a honra de fazerem parte da minha defesa de doutorado.

**Aos professores da Disciplina de Odontopediatria**

Profa. Dra. Ângela Cristina Cilense Zuanon, Prof. Dr. Cyneu Aguiar Pansani, Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro, Prof. Dr. Fábio de Abreu-e-Lima, Profa. Dra. Fernanda Lourenção Brigenti, Profa. Dra. Josimeri Hebling, Profa. Dra. Lourdes Aparecida Martins dos Santos-Pinto e Profa. Dra. Rita de Cássia Loiola Cordeiro, pela convivência diária contribuição à minha vida pessoal e profissional. Obrigada por me mostrarem o caminho maravilhoso da Odontopediatria!

**Ao Prof. Dr. Carlos Rossa Junior** pelos sábios conselhos sempre vindos nos momentos de dúvidas. Obrigada pela amizade e conhecimentos transmitidos.

**Ao Prof. Dr. Niels Olsen Câmara** (Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo- USP) por ter me recebido em seu laboratório para as análises de marcadores inflamatórios e à **Meire Hiyane**, uma pessoa incrível que com dedicação e paciência me ensinou e ajudou muito durante a realização destas análises. Muito obrigada à vocês dois!

**À Profa. Dra. Márcia Mayer** (Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo- USP), por toda atenção, acolhimento e disponibilidade dispensada para a análise microbiológica. E à todos do seu **Laboratório de Microbiologia**, principalmente a **Didi** (minha irmã gêmea), **Ellen, Maike, Lucas e Leo**, pessoas maravilhosas que tive a oportunidade de conhecer e aprender! Muito obrigada à todos!!!!

**Aos professores Prof. Dr. Sílvio Issao Myake, Profa. Dra. Mônica Fernandes Gomes, Profa. Dra. Cristiane Yumi Koga-Ito, Prof. Dr. Antônio Olavo Cardoso Jorge, Prof. Dr. Jose Benedito Oliveira Amorim, Prof. Dr. João Carlos da Rocha, Prof. Dr. Mauro Pedrini Santamaria e Profa. Dra. Maria das Graças Goulart, Obrigada por terem me acolhido na fase de coleta das amostras. Obrigada professores!**

**Aos meus amigos de curso de Doutorado Débora, Fabiano, Juliana, Letícia e Marília pelo apoio e ajuda durante todo o curso. Muito obrigada a todos.**

**Aos amigos da Pós-graduação Thamiris, Carol, Manoel, Luana, Renata, Juliana, Diego, Camila, Thalita, Popis, Liege e Luciana pela convivência e pelo carinho compartilhados durante todo o curso.**

**Aos amigos do laboratório de genética**

**Lí Finoti, Profa. Dra. Ticiano Sidorenko Capote, Suzane, Sâmia, Giovana, Rafael, Guilherme e Fabrício pela ajuda, pelas risadas, pelas conversas fornecida sempre que precisei. Acima de tudo, pela amizade e pelo carinho de todos vocês! Obrigada à todos!!!!**

**Aos amigos “canadenses” (Saliva Buddies 4life!!!!)**

**Carolina Rayo, Eduardo Moffa, Carolina Mussi, Cindy, Heide, Tayebah, Alina, “Forever” Young, Ali “Veleshi Baba”, “Bixo” Jonatas, Rajesh, Little Cindy, Adja, Nicole e Shaw. Ai que saudades do Canadá! Obrigada a todos vocês! O laboratório não ia ser igual sem vocês. Algumas frases já me remetem à vocês: Top model, “encher as caixinhas”, Elisa, Western Blot, praia, farofa, alugar carro, DELAY, “Veleshi baba”, cookie run, Forever Young, slave, Tim Hortons, entre outras. Dú e Carols, Obrigada por tudo!**

**Thank you for your kindness and support!!!**

**Aos funcionários da Odontopediatria**

**Soninha, Dona Odete, Dulce, Tânia, Totó, Pedrinho, Diego, Cristina e Marcia pela convivência, disponibilidade e ajuda durante as clínicas. Obrigada a todos!**

**Aos funcionários da esterilização e urgência, em especialmente a Ângela, Marquinho, Paulo pela amizade, disponibilidade e ajuda sempre que precisei. Muito obrigada!**

### **A todos os funcionários da Secção de Pós-Graduação**

Mara, Alexandre e Sérgio vocês são especiais e essenciais na vida de um pós-graduando. Agradeço a constante ajuda, atenção e organização em todos os momentos. Obrigada por tudo!

### **Aos funcionários da biblioteca**

Ceres, Adriano e Marley pela convivência agradável e ajuda durante as pesquisas bibliográficas e confecção da ficha catalográfica.

**À todos os funcionários das APAEs e ASIN** que me receberam de forma tão carinhosa e sempre acreditaram no meu trabalho.

### **À CAPES** –Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Pela concessão de bolsa de estudo que possibilitou a cobertura financeira desta pesquisa durante o curso de Doutorado no Brasil e pela concessão de bolsa de estudo Doutorado sanduíche no exterior – PDSE (Processo: BEX 0225/13-4), que possibilitou a realização deste trabalho no Department of Biochemistry, Schulich School of Medicine & Dentistry, The University of Western Ontario, London, Ontario, Canada.

**À FAPESP** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo  
pela concessão de Auxílio Regular para o desenvolvimento desta pesquisa

### **À Universidade de Western Ontario, London, Canadá**

Por terem me recebido prontamente para a realização de estágio no exterior

### **À família Cassiano Costa**

Em especial, a Reneide, Milena, Bianca, Celi, Rejane, Flávia e Juliano que me ajudaram e me apoiaram durante esta jornada. **Mathias**, você é muito especial na minha vida! Obrigada pelo carinho, dedicação e compreensão!!!

### **À Dulce e Sílvia**

Por terem não só me acolhido durante a fase final desta jornada mas por tudo que fizeram por mim. Obrigada pelas conversas, pelas risadas, pelos jantares, pela compreensão, enfim Meu Muito OBRIGADA!! Amei meu cantinho na casa de vocês! ...rs.

**Às minhas queridas amigas**

Katinha, Camila Merida, Nilce, Alyne, Paty Melo e Shinobu Obrigada pela amizade, compreensão e carinho!!!! Apesar da distância, vocês moram no meu coração! Obrigada a todos!

**Aos meus familiares e amigos e a todos** que, direta e indiretamente, colaboraram para a execução desta pesquisa.

*Sonhe com aquilo que você quer ser,  
porque você possui apenas uma vida  
e nela só se tem uma chance  
de fazer aquilo que quer.*

*Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.  
Dificuldades para fazê-la forte.  
Tristeza para fazê-la humana.  
E esperança suficiente para fazê-la feliz.*

*As pessoas mais felizes não tem as melhores coisas.  
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades  
que aparecem em seus caminhos.*

*A felicidade aparece para aqueles que choram.  
Para aqueles que se machucam  
Para aqueles que buscam e tentam sempre.  
E para aqueles que reconhecem  
a importância das pessoas que passaram por suas vidas.*

*Clarice Lispector*

RESUMO

---

Tanaka MH. Análise microbiológica e imunológica do fluido gengival e proteoma salivar de indivíduos com Síndrome de Down com doença periodontal [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

## **RESUMO**

---

O objetivo deste estudo foi avaliar a quantidade de periodontopatógenos e de citocinas inflamatórias no fluido gengival, bem como as proteínas salivares em indivíduos com Síndrome de Down (SD) com Doença Periodontal (DP), comparando-os com indivíduos cromossomicamente normais, antes e 45 dias após o tratamento periodontal não-cirúrgico. Para detectar e quantificar as bactérias (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*), o fluido gengival foi coletado de 35 indivíduos com DP, sendo 23 indivíduos com SD e 12 não-sindrômicos (controle). Para quantificar as citocinas inflamatórias e as proteínas salivares foram coletados fluido gengival e saliva de 30 indivíduos com DP, sendo 20 indivíduos com SD e 10 não-sindrômicos (controle). Os efeitos do tratamento nos parâmetros clínicos foram positivos para o índice de placa, sangramento à sondagem, profundidade de sondagem e nível de inserção, em ambos os grupos. Porém, a contagem dos periodontopatógenos foi maior nos indivíduos com SD comparados com o grupo controle, antes e 45 dias após o tratamento periodontal. As citocinas Th1, Th2 e Th17 também foram encontradas em maiores quantidades nos indivíduos com SD do que nos controle, mesmo depois do tratamento periodontal. Adicionalmente, maiores quantidades de proteínas salivares com propriedades antimicrobianas, lubrificação, metabolismo, organização celular, resposta imune e transporte foram encontradas em indivíduos com SD depois do tratamento periodontal. Conclui-se que os resultados desta pesquisa podem contribuir para uma compreensão mais aprofundada do comportamento microbiológico, imunológico e do proteoma salivar de indivíduos com SD, e,

consequentemente, explicar a alta prevalência e severidade da doença periodontal nesses indivíduos.

***Palavras-chave:*** Síndrome de Down, Periodontite, Microbiologia, Citocinas, Proteínas e peptídeos salivares

**ABSTRACT**

---

Tanaka MH. Microbiological and immunological analysis in the gingival crevicular fluid and salivary proteome analysis in individuals with Down syndrome with periodontal disease [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

## ***ABSTRACT***

---

The aim of this study was to quantify the periodontopathogens, inflammatory cytokines and salivary proteins in subjects with Down syndrome (DS) and normal subjects, both with periodontal disease (PD), before and 45 days after non-surgical periodontal therapy. To detect and quantify bacteria (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola*), crevicular gingival fluid (CGF) was collected from 35 individuals with PD, 23 with DS and 12 non-syndromic (control). To quantify the inflammatory cytokines and salivary proteins, CGF and saliva of 30 individuals with PD, 20 with SD and 10 non-syndromic (control) were collected. The effects of the non-surgical periodontal therapy on clinical parameters were positive in both groups. However, the count of periodontopathogens was higher in individuals with DS compared with the control group, before and after periodontal therapy. Th1, Th2 and Th17 cytokines were also found in higher amounts in individuals with DS even after periodontal therapy compared with control patients. Furthermore, higher amounts of salivary proteins with antimicrobial properties, lubrication, metabolism, cellular organization, immune response and transport were quantified in individuals with DS after periodontal therapy. Despite of clinical parameters improvement after non-surgical periodontal therapy in subjects with DS, it is concluded that the results of this study may contribute to a more profound understanding of microbiological and immunological behavior, as well as knowledge of the salivary proteome in individuals with Down syndrome, and also might explain the high prevalence and severity of periodontal disease in these individuals.

**Key word:** Down syndrome, Periodontitis, Microbiology, Cytokines, Salivary Proteins and Peptides

## SUMÁRIO

1	Introdução .....	24
2	Proposição .....	29
3	Capítulo 1 .....	31
4	Capítulo 2 .....	46
5	Capítulo 3 .....	68
6	Considerações finais.....	94
7	Referências .....	97
8	Anexo .....	107



## 1 Introdução

A Síndrome de Down (SD) é a mais freqüente desordem cromossômica, sendo caracterizada por um cromossomo 21 extra ou pela triplicação do braço longo do cromossomo 21<sup>12, 32, 64</sup>. Com base no censo populacional de 2000, há no Brasil cerca de 300 mil indivíduos com SD e, anualmente cerca de 8 mil brasileiros nascem com a síndrome<sup>41</sup>.

Nos indivíduos com SD, as características bucais observadas são palato ogival, “falsa” macroglossia, hipotonia muscular, língua fissurada, anomalias dentárias como a presença de dentes conóides, microdontia, fusão, geminação, hipocalcificação, oligodontia e atraso na erupção dentária. Além disso, estes indivíduos apresentam menor prevalência de lesões de cárie e maior de doença periodontal<sup>24, 26, 27, 64</sup>.

A doença periodontal (DP) é uma doença inflamatória que afeta as estruturas de suporte do dente, sendo considerada uma das formas patológicas mais comuns de destruição óssea no ser humano<sup>15, 33, 66</sup>. Vários estudos tem relatado que os indivíduos com SD têm uma alta prevalência de DP em comparação com indivíduos cromossomicamente normais (euplóides) e com outros portadores de necessidades especiais, na mesma faixa etária<sup>7, 26, 27, 34, 59, 68, 80, 96, 114</sup>.

Considerada como uma doença multifatorial, a DP pode estar associada a vários fatores previamente investigados nos indivíduos com SD, como má higiene bucal, composição da placa subgingival e deficiência na resposta imune frente ao processo inflamatório<sup>3, 21, 46, 51, 52, 61, 103, 110</sup>.

A presença de bactérias periodontopatogênicas, como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, (bactérias do complexo vermelho)<sup>30, 31, 38</sup>, representa um fator fortemente associado à DP. Estudos mostram que esses periodontopatógenos estão presentes na placa subgingival de crianças com Síndrome de Down a partir de 2-4 anos, e aumentam em quantidade gradualmente com a idade, sempre mantendo uma prevalência significativamente maior do que nos indivíduos controle<sup>4, 81</sup>.

Todavia, a evolução da DP não é definida apenas pelos agentes microbianos presentes. Para que ela ocorra é necessário um desequilíbrio entre

esses periodontopatógenos e o potencial imunológico do hospedeiro, bem como a associação de fatores ambientais e genéticos<sup>25, 31, 55</sup>.

O mecanismo de defesa dos indivíduos com SD apresenta algumas alterações na resposta imune quando comparado com indivíduos cromossomicamente normais. Tais alterações compreendem um desbalanço nas subpopulações de linfócitos T, menor atividade de fagocitose por leucócitos, redução na quimiotaxia de neutrófilos, produção alterada de anticorpos e maiores quantidades de mediadores inflamatórios<sup>6, 9, 21, 46, 50, 56, 72, 87, 92, 94, 102</sup>.

É interessante ressaltar que no braço longo do cromossomo 21 existe um agrupamento composto pelos genes *IL10RB*, *IFNGR2* e genes dos dois receptores do IFN- $\alpha$ <sup>77</sup>. Alguns autores encontraram uma maior expressão gênica de *IL10* mRNA em indivíduos com SD com DP do que em não síndrômicos, e isso tem sido associado à presença do cromossomo 21 extra nesses indivíduos<sup>19, 98</sup>. Porém, não foram detectadas diferenças na expressão do *IFN $\gamma$*  mRNA entre indivíduos SD e controle, ambos com DP<sup>19, 98</sup>. Os SD mostram também, uma super expressão de citocinas como *TNF $\alpha$*  e *IFN $\gamma$*  mRNA no timo, o que pode explicar o reduzido número de linfócitos T maduros nesses indivíduos, e provavelmente está relacionado com a resposta imune deficiente<sup>63</sup>.

Os linfócitos T helper (Th) podem se diferenciar em Th1, Th2, Th17 e Treg que irão mediar na inflamação, destruição tecidual e autoimunidade<sup>62</sup>. Algumas das citocinas dos linfócitos Th1 (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL12, IFN- $\gamma$ , GM-CSF e TNF- $\alpha$ ) e Th17 (IL-17) são conhecidas como citocinas pro-inflamatórias, e as citocinas dos linfócitos Th2 (IL-4, IL-6 e IL-10) são conhecidas como citocinas anti inflamatórias<sup>45, 76, 88, 97, 111</sup>. Assim, como em qualquer doença inflamatória crônica, as citocinas tem um papel importante no início, na progressão e na modulação da resposta imune do hospedeiro na doença periodontal<sup>10, 111</sup>. Desse modo, o desbalanço das quantidades dessas citocinas Th1, Th2 e Th17 no tecido gengival e no fluido gengival crevicular pode causar reabsorção óssea e destruição do colágeno durante a evolução da inflamação periodontal<sup>42</sup>.

Vários estudos analisaram a quantidade destas citocinas Th usando o fluido gengival de pacientes com doença periodontal<sup>11, 37, 41, 54, 67, 69, 73, 88, 97, 99-101, 111</sup>. Porém, poucos são os estudos com as células Th e suas citocinas no fluido gengival

de indivíduos com SD<sup>79, 103</sup>. Estes estudos demonstraram que há um desequilíbrio entre Th1 e Th2, indicando uma possível causa para o aparecimento precoce e rápida progressão da DP encontradas nesta população<sup>79, 103</sup>.

A saliva, assim como o fluido gengival crevicular, também pode ser utilizada para o diagnóstico da doença periodontal. A saliva é um fluido constituído de proteínas de fontes local e sistêmica, e pode ser obtida usando métodos de fácil execução e não invasivos<sup>43, 93, 113</sup>. Muitos de seus componentes tem sido pesquisados e estão contribuindo no diagnóstico de doenças sistêmicas, como o câncer de mama<sup>14, 95, 104</sup>, *Diabetes Mellitus*<sup>17, 75</sup>, Síndrome de Sjögren<sup>5, 112</sup> e Fibrose Cística<sup>57</sup>, bem como de algumas patologias bucais, como líquen plano<sup>109</sup>, câncer bucal<sup>71, 108, 112</sup>, incluindo a cárie dentária<sup>58, 60</sup> e a doença periodontal<sup>13, 35, 39, 47, 74, 90, 107</sup>.

Os biomarcadores da doença periodontal presentes na saliva podem ser produzidos tanto local quanto sistemicamente<sup>20, 35, 36, 39, 74, 82, 113</sup>. Vários estudos avaliaram alguns biomarcadores da DP na saliva em pacientes cromossomicamente normais com doença periodontal<sup>44, 90, 93, 107</sup>. Entre esses marcadores estão as cistatins que são importantes para a proteção contra a degradação tecidual em locais com inflamação ou infecção bacteriana<sup>49</sup>. Sua quantidade em pacientes cromossomicamente normais com DP é controverso, alguns estudos mostram serem menos abundante<sup>35, 40, 44</sup> e outros não mostram nenhuma diferença na quantidade em comparação com os pacientes periodontalmente saudáveis<sup>2</sup>. Já a Haptoglobina é encontrada em maior quantidade na fase aguda da DP sendo correlacionada com a severidade da DP<sup>28, 39</sup>. Comumente encontradas na saliva, as proteínas Alpha amylase 1 e serum albumin, segundo alguns estudos, estão presentes em maiores quantidades (ou: são mais abundantes) em pacientes com DP comparados com os periodontalmente saudáveis<sup>29, 35, 36, 84, 107</sup>. Entretanto, outros, mostram que independente da DP a quantidade destas proteínas é igual em pacientes cromossomicamente normais<sup>40, 74, 83</sup>.

Nos indivíduos com SD, uma das proteínas relacionada com o sistema imune são as imunoglobulinas porém os dados são controversos<sup>7, 8, 21, 22</sup>. A proteína Alpha amylase, muito comum na cavidade bucal, é encontrada em quantidades menores<sup>91</sup> ou iguais<sup>106</sup> em indivíduos com SD em comparação com aqueles cromossomicamente normais e periodontalmente saudáveis. Recentemente, Cabras

et al. <sup>16</sup> identificaram 30 proteínas na saliva de pacientes com SD e controle. Observaram que a proteína Cystatin B tem uma maior quantidade e a Cystatin S tem uma menor quantidade em indivíduos com SD. Vale ressaltar que este estudo observou maiores quantidades de proteínas relacionadas com a doença de Alzheimer <sup>16</sup>, cujo risco de os indivíduos com SD desenvolverem é de quase 100% dos casos<sup>105</sup>. As proteínas Apolipoprotein 1 e Alpha enolase, estudadas no cérebro de pacientes com Alzheimer e no líquido amniótico de mães portadores de fetos com SD, mostraram resultados bastante controversos<sup>18, 48, 53, 65, 70, 86</sup> em comparação com pacientes saudáveis. Na saliva, as quantidades de Apolipoprotein são maiores e para a Alpha enolase são menores, no único estudo encontrado, em pacientes com DP comparados com pacientes periodontalmente saudáveis<sup>44</sup>.

Desta forma, podemos observar que as quantidades de bactérias do complexo vermelho, as quantidades de citocinas Th1, Th2 e Th17 e as alterações na composição da saliva e suas influências sobre os altos índices de doença periodontal nos indivíduos SD não são bem conhecidos. Adicionalmente, até o momento não foi encontrada na literatura nenhuma pesquisa investigando estes parâmetros em indivíduos SD com DP com as metodologias empregadas neste estudo, e nem estudos longitudinais que avaliassem os efeitos do tratamento periodontal não-cirúrgico nos mesmos.

PROPOSIÇÃO

---

## **2 Proposição Geral**

Avaliar a microbiota e a resposta imune adaptativa em indivíduos com Síndrome de Down com Doença Periodontal, antes e 45 dias após o tratamento periodontal não-cirúrgico.

### **2.1 Proposição Específica**

- 1) Detectar e quantificar as bactérias *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* no fluido gengival crevicular (FGC) de indivíduos com SD e não-sindrômicos (controle) , ambos com DP, antes e 45 dias após o tratamento periodontal não-cirúrgico
- 2) Determinar os níveis das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 (p70), IFN- $\gamma$ , GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-17A e IL-10 no FGC de indivíduos com SD e controle, ambos com DP, antes e 45 dias após o tratamento periodontal não-cirúrgico
- 3) Identificar as proteínas salivares e comparar os níveis destas proteínas em indivíduos com SD e controle, ambos com DP, antes e 45 dias após o tratamento periodontal não-cirúrgico.



## Capítulo 1

# **Red complex microorganisms in Down syndrome with periodontal disease\***

M. H. Tanaka<sup>1,2</sup>

T. O. Rodrigues<sup>1</sup>

L. S. Finoti<sup>2</sup>

S. R. L. Teixeira<sup>3</sup>

M.P. A. Mayer<sup>3</sup>

R. M. Scarel-Caminaga<sup>2</sup>

E. M. A. Giro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Orthodontics and Pediatric Dentistry, School of Dentistry, UNESP – Univ Estadual Paulista, Araraquara, SP, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup> Department of Morphology, School of Dentistry, UNESP – Univ Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, SP, Brazil

<sup>3</sup> Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

***Red complex microorganisms in Down syndrome with periodontal disease\****

M. H. Tanaka<sup>1,2</sup>; T. O. Rodrigues<sup>1</sup>; L. S. Finoti<sup>2</sup>; S. R. L. Teixeira<sup>3</sup>; M.P. A. Mayer<sup>3</sup>; R. M. Scarel-Caminaga<sup>2</sup>; E. M. A. Giro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Orthodontics and Pediatric Dentistry, School of Dentistry, UNESP – Univ Estadual Paulista, Araraquara, SP, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup>Department of Morphology, School of Dentistry, UNESP – Univ Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, SP, Brazil

<sup>3</sup>Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Corresponding Author:

Elisa Maria Aparecida Giro

Department of Orthodontics and Pediatric Dentistry, Araraquara School of Dentistry, UNESP – Univ Estadual Paulista

Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, Brazil

CEP- 14801-903

Tel.:+55 16 33016336

Fax: +55 16 33016329

e-mail: [egiro@foar.unesp.br](mailto:egiro@foar.unesp.br)

## ***Abstract***

Periodontitis is an inflammatory disease associated with microbial agents, such as *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola* (together called the red complex). Although the clinical outcomes of the Periodontal Disease (PD) aren't trigger only by microbial agents, but represent the interaction of host defense mechanisms, environmental and genetic factors. Down syndrome (DS) is one of the genetic factors that causes a high prevalence of periodontal disease compared with otherwise chromosomally normal (euploid), and other mentally handicapped patients of similar age distribution. This study investigated whether in individuals with Down syndrome with chronic periodontitis, the clinical parameters and levels of microbial red complex varied in response to non-surgical periodontal therapy. Twenty-three patients with Down syndrome and twelve euploid patients were submitted to non-surgical periodontal treatment. Levels of *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola* were determined in 140 subgingival plaque samples by qPCR. Demographic characteristics were analyzed by unpaired t-test, and site-based analysis by Mann-Whitney and Wilcoxon tests to assess differences between groups and periods, respectively ( $\alpha=0.05$ ). The clinical parameters after periodontal treatment were similar in diseased and healthy sites, independently of the Down syndrome. At baseline, diseased sites of Down syndrome patients show no significant difference in levels of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia*, but reveal significantly higher levels of *Treponema denticola* compared with euploid individuals. However, the non-surgical periodontal therapy decreased the levels of red complex pathogens and the tested clinical parameters of diseased sites in both groups. The periodontal treatment improved clinical parameters and reduced levels of periodontopathogens, independent of Down syndrome. Nonetheless, individuals with Down syndrome often require maintenance therapy for maintaining oral health.

***Key words:*** Down syndrome, bacteria, microbiology, periodontitis

## ***Introduction***

Periodontal Disease (PD) is an inflammatory disease that affects supporting structures of the teeth, constituting one of the most prevalent forms of bone destructive pathology in humans<sup>21, 53</sup>. One of the most important triggers for an intense inflammatory reaction that have been strongly associated with PD are periodontopathogenic bacteria, such as *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola* (together called the red complex)<sup>46, 48, 63, 161</sup>.

Although the clinical outcomes of the PD aren't triggered only by microbial agents but are results from the interaction of host defense mechanisms, and environmental and genetic factors<sup>34, 47, 85</sup>. The genetic background may affect many functions, which in turn might affect inflammation and the expression of some of inflammatory cytokines such as *IL10* mRNA and *IFN $\gamma$*  mRNA in gingival tissue<sup>25, 133, 149</sup>. Individuals with Down's syndrome (DS) have an increased prevalence of PD compared with otherwise chromosomally normal (euploid), age-matched control and other mentally handicapped patients of similar age distribution<sup>32, 41, 58, 121</sup>.

The imbalance between colonizing microorganisms and the immunological potential of the host can define the state of the periodontal diseases<sup>47</sup>. Many studies have reported a prevalence of certain pathogens in subgingival plaque from individuals with DS compared with controls<sup>5, 65, 81, 90, 99, 124, 168</sup>. Some of these studies have

mainly noted that *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola*, which are considered to be important pathogens of severe types of adult periodontitis, were significantly higher in the DS subjects in a very early colonization in their childhood compared with controls<sup>5</sup>. However, other researchers found no statistically significant differences related with red complex pathogens in Down syndrome individuals with periodontitis compared with a well-matched control group<sup>81, 120</sup>. Recently, a study about characterization of periodontal biofilm showed that periodontopathogens from red complex of periodontitis were more frequent in Down syndrome with periodontal disease<sup>90</sup>.

Because PD is a complex disease, factors such as immunological deficiency and genetics, may also influence the clinical outcomes of the periodontal treatment and host's ability to reduce the pathogenic microbiota. Therefore, the aim of this study was to investigate whether in individuals with Down syndrome with chronic periodontitis, the clinical parameters and levels of microbial red complex change in response to non-surgical periodontal therapy.

## ***Materials and methods***

### **Subjects**

The human subject protocol was approved by the ethics committee at UNESP- Universidade Estadual Paulista (Protocol number 62/11). Between March 2012 and Feb 2013, all patients with DS and their parents as well as chromosomally normal (euploid) individuals were informed about the study and informed consent forms were signed. A total of 125 patients with DS and 150 chromosomally normal patients were initially recruited into the study. Their medical history was taken and they underwent a clinical periodontal examination in the School of Dentistry of Araraquara (UNESP), in 5 of the Associations of Parents and Friends of Disabled Patients (APAEs) of Araraquara and the surrounding cities (São Carlos, Catanduva, Matão and Taquaritinga) and another institution Down Syndrome Association of São José dos Campos (ASIN).

To be enrolled in the study, the participants were selected on a two-step process: (1) non-institutionalized DS adult subjects (i.e., older than 19 years, according to WHO (2003)<sup>163</sup> with a karyotype of simple 21st trisomy (mosaics were excluded) and chromosomally normal (euploid) adult individuals. (2) None of the following exclusion criteria: diabetes mellitus or any other chronic inflammatory disease or infections; pregnancy or lactating; current smoker status or cessation of smoking for less than 5 years; use systemic and/or topical steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs or antibiotics during the last 3 months before the experimental phase.

Patients were considered as periodontally diseased when exhibiting more than eight sites in non-adjacent teeth exhibited probing pocket depths  $\geq 4$  mm, clinical attachment loss  $\geq 3$  mm and bleeding on probing<sup>152</sup>. Subjects were divided into the following groups based on their genetic condition:

- DS: Down syndrome individuals with periodontal disease (n = 23).
- C: chromosomally normal individuals with periodontal disease (n = 12).

### **Clinical measurements**

A single previously calibrated examiner (M.H.T./ Kappa = 0.80) recorded clinical measurements of the probing pocket depth (PPD: from the gingival margin to the base of the pocket), clinical attachment loss (CAL: from the cemento-enamel junction to the base of the pocket), and presence of bleeding on probing (BOP). The teeth were examined at six sites: mesio-buccal, mid-buccal, disto-buccal, mesio-lingual, mid-lingual and disto-lingual. All clinical measurements were performed with the use of a manual probe (Trinity-Campo Mourão, Brazil). Each patient's clinical data were recorded at baseline and 45 days after the completion of non-surgical treatment.

### **Periodontal treatment**

Both study groups underwent an initial evaluation consisting of clinical history and assessment of clinical periodontal parameters. The patients received non-surgical periodontal treatment, comprising oral hygiene instruction, scaling and root planing under local anesthesia. The treatment required, on average, four sessions using manual instruments (Hu-Friedy Manufacturing Inc., Chicago, IL, USA) performed by one periodontist (MHT). After the periodontal treatment, a professional plaque control program was carried out twice a month for 45 days, consisting of supra gingival plaque removal and reinstruction of oral hygiene procedures.

### **Sites and sampling**

Subgingival samples were collected in two sites of non-adjacent teeth with PPD  $\geq$  4 mm and BOP (diseased sites) and from two proximal sites of non-adjacent teeth with PPD  $\leq$  2 mm (healthy sites), at baseline and 45 days after the completion of non-surgical treatment. Thus, 140 subgingival plaque samples, obtained from 70 diseased sites and 70 healthy sites (46/24 from Down syndrome and Control group, respectively), were evaluated.

After the removal of supragingival plaque, subgingival plaque samples were gathered by inserting a sterile endodontic paper point for 30 s, placing the paper points in separate microtubes containing 100  $\mu$ L of TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.6), which were stored at -80°C until use.

### **Absolute quantification of bacteria by qPCR**

Genomic DNA from bacteria and subgingival plaque samples was isolated and purified using kit Wizard® Genomic DNA Purification (PROMEGA, Madison, WI, USA) and was used as the template for real-time polymerase chain reaction (qPCR). To establish the quantitative assay, plasmids containing the target genes were used as standards. PCR amplicons for 16SrRNA gene of *P. gingivalis*, *T. denticola* and *T. forsythia* were obtained, individually cloned in PCR 2.1 TOPO TA (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's recommendations, and transformed in *Escherichia coli* DH5-a. After the growth of transformants, plasmids were extracted using the PureLink Quick Plasmid Miniprep kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)<sup>150</sup>.

The standard curve with diluted plasmids that harbored a cloned copy of template DNA for *P. gingivalis* W83, *T. denticola* ATCC 33520, and *T. forsythia* ATCC 43037 qPCR had a minimum R<sup>2</sup> value of

0.98, and the estimated amplification efficiency ranged from 97% to 102%. The seven standard dilutions (from  $10^7$  to  $10^1$  copies) were run in triplicate, and the subgingival samples were run in duplicate. The mean values of target molecule numbers were used for analysis.

Quantitative PCR was carried out using the SYBR Green Power Kit (Applied Biosystems, Warrington, UK). PCR reactions were set up in 96-well plates in a total volume of 22  $\mu$ l, containing 11  $\mu$ l of SYBR Green mix, 1  $\mu$ l of DNA sample, and 100 nM of each primer for *P. gingivalis*, *T. denticola*, and *T. forsythia* <sup>6, 98, 134, 150</sup>. The following thermal program was used: 95 °C for 10 min followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, annealing at 60 °C for 1 min, and extension at 95 °C for 15 s. Melting curve analysis was carried out at 65–95 °C to confirm that the PCR products from samples and reference plasmids had identical melting points. Data were analyzed using the SDS 7500 Applied Biosystems software. The levels of red complex bacteria for each site were expressed as the sum of the number of copies of 16SrRNA gene of each red complex microorganism (*P. gingivalis* + *T. denticola* + *T. forsythia*). The sensitivity range of bacterial detection and quantification of the qPCR technique used was  $10^1$ – $10^7$  bacteria for each of the periodontopathogens tested.

### Statistical analysis

The unit for the analyses was the subject for demographic analysis and the site for the microbiological analysis, and  $\alpha$  was set on 0.05. The Shapiro-Wilk test was used to assess the distribution normality of quantitative data. Data were categorized as “baseline” and “45 days after treatment”. Because the demographic characteristics were distributed normally, Unpaired t-test was used to assess differences among the groups. The  $\chi^2$  test was used to determine whether the groups were composed of the same proportion of males and females.

For site-based analyses, due of the absence of a normal distribution, comparisons between the Down syndrome and control group were accomplished using Mann-Whitney *U*-Test. The Wilcoxon test was utilized to assess differences between study periods.

## Results

### Demographic characteristics

The demographic characteristics and clinical data of the studied population are summarized in Table 1. The Control group presents a higher mean age compared to the DS group (Unpaired t-test;  $p=0.001$ ). No statistically significant differences were observed among groups with regard to gender ( $\chi^2$ ;  $p=0.689$ ). For the full-mouth clinical parameters, probing depth, attachment level and bleeding on probing were similar (Unpaired t-test;  $p=0.001$ ). However, the parameters plaque and gingival bleeding were more prevalent in Down syndrome patients than in the control group (Unpaired t-test;  $p<0.0001$  and  $p=0.0090$  respectively).

### Clinical outcomes in the evaluated periods

The clinical parameters at sample-collected sites were similar in the Down syndrome and Control groups in diseased and healthy sites for both periods (Mann-Whitney *U*-test,  $p>0.05$ ; Table 2). The effects of non-surgical periodontal therapy on the clinical parameters were evaluated in diseased sites and healthy sites through comparisons before and 45 days after treatment (Table 2). Non-surgical periodontal therapy resulted in a significant decrease in the clinical parameters of diseased sites for both groups (Down Syndrome and Control)

at 45 days (Wilcoxon test,  $p < 0.05$ ; Table 2). There were no differences in clinical parameters in healthy sites between baseline and 45 days after treatment for both groups. Therefore, the treatment was equally effective for the Down syndrome and Control groups.

### **Periodontopathogens in Down syndrome and Control Group**

To investigate the relationship between Down syndrome and the colonization of the oral cavity by periodontopathogens, the quantitative *P. gingivalis*, *T. forsythia*, and *T. denticola* data were obtained from 70 diseased sites and 70 healthy sites (46/24 from Down Syndrome and Control Group, respectively), at baseline and after 45 days of treatment. In regarding to diseased sites, no statistically significant differences were observed among groups in the counts of *P. gingivalis* and *T. forsythia* at baseline. However, the levels of *T. denticola* were significantly higher in the Down syndrome than in Control Group (Mann-Whitney *U*-test,  $p = 0.03$ ; Table 3) at baseline. At 45 days after periodontal treatment, the levels of *P. gingivalis*, *T. forsythia*, and *T. denticola* were significantly higher in the Down syndrome than in Control group (Mann-Whitney *U*-test,  $p < 0.0001$ ,  $p = 0.0003$ , and  $p = 0.0007$ , respectively; Table 3). In regarding to healthy sites, no statistically significant differences were observed between groups in the counts of *T. denticola* and *T. forsythia* at baseline. However, the levels of *P. gingivalis* were significantly higher in the Down syndrome than in Control group (Mann-Whitney *U*-test,  $p = 0.0201$ ; Table 3) at baseline. At 45 days after periodontal treatment, the levels of *P. gingivalis*, *T. forsythia*, and *T. denticola* were significantly higher in the Down syndrome than in Control group (Mann-Whitney *U*-test,  $p < 0.0001$ ,  $p = 0.0043$ , and  $p < 0.0001$ ; respectively; Table 3).

Each intra-group comparison (among the study periods) revealed that the non-surgical periodontal therapy did not reduce significantly the counts of *16SrRNA* gene copies of the three investigated microorganisms in the diseased sites of the Down syndrome group (Wilcoxon test,  $p > 0.05$ ; Table 3). Otherwise, the levels of *P. gingivalis*, *T. forsythia*, and *T. denticola* were significantly lower 45 days after periodontal treatment in the diseased sites of the Control Group (Wilcoxon test,  $p < 0.05$ ; Table 3). In regarding to healthy sites, it was observed a reduction of all microorganisms evaluated 45 days after periodontal treatment in both groups (Wilcoxon test,  $p < 0.05$ ; Table 3).

## **Discussion**

Many studies have reported that DS individuals have an increased prevalence of periodontal disease (PD) compared with otherwise chromosomally normal (euploid), age-matched control and other mentally disabled patients of similar age distribution<sup>38, 41, 106, 121</sup>.

Various periodontal pathogens exhibited a very early colonization on the Down's syndrome children compared to systemically healthy children with similar levels of gingival inflammation and plaque accumulation<sup>5</sup>. It has also been reported that the same amount of plaque accumulation gives rise to an earlier, more rapid and more extensive gingival inflammation in the deciduous dentition in DS children compared to normal control children<sup>121</sup>. Thus, it was suspected that DS young adults would also have higher levels of complex microflora with causative pathogens than non-DS subjects with similar dental plaque levels<sup>4</sup>. In this study, the DS population has an earlier age and almost the same periodontal clinical data compared with the controls (Table 1).

The first report, in 1968, found that 71% out of 41 institutionalized DS children (5 to 12 years) harbored black-pigment *Bacteroides* (BPB) including *P. gingivalis* and *P. intermedia*<sup>92</sup>. Two years later, another research found no significant difference in BPB counts between age-matched DS and non-DS subjects (9 to 24 years), but the BPB counts were significantly higher in institutionalized DS children than in DS children living at home<sup>38</sup>. Several periodontal pathogens were found colonizing the oral tissues of children, adolescents and young adults with Down syndrome, earlier and at higher levels, when compared to healthy individuals and subjects with cerebral palsy<sup>5, 124</sup>.

Recently, Martinez-Martinez et al.<sup>90</sup> (2013) reported that *Tannerella forsythia* was the most frequent bacteria detected in individuals with DS with and without periodontitis, followed by *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*. In this study, diseased sites showed no statistically significant differences between the Down syndrome and control group in counts of *P. gingivalis* and *T. forsythia* at baseline. In agreement, Reuland-Bosma et al.<sup>120</sup> (2001) comparing seventeen Down syndrome adults with moderate periodontitis which received daily oral hygiene care performed by a caregiver and with a well-matched mentally disabled individuals (control group) did not find statistically significant differences in the subgingival prevalence and culturable proportions of *P. gingivalis* and *T. forsythia*. Even when the authors divided the Down syndrome group in “low-risk” group and a “high-risk” group, no differences in the prevalence of distinct periodontopathic bacteria and bacterial subgingival composition could be established. Another research using checkerboard DNA-DNA hybridization found that most of the 40 subgingival bacterial species including the major periodontal pathogens *A. actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *P. intermedia*, *Parvimonas micra*, *F. nucleatum* and *Campylobacter rectus* were present at similar levels in adult Down syndrome subjects compared with matched non-Down syndrome mentally disabled and mentally normal subjects<sup>81</sup>. Interesting fact, mainly because individuals with Down syndrome show no statistically significant differences in *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* compared with individuals without Down syndrome, in agreement with this study.

According to Amano et al.<sup>5</sup> even in early childhood (2 to 4 years) in individuals with Down syndrome, some periodontopathogens like *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola*, were detected. The number of species gradually increased with age, and all were most often detected between 11 and 13 years of age. In addition, *Porphyromonas gingivalis*, and *Treponema denticola* were not found between 2 and 13 years old children in control group. These findings suggest that individuals with Down syndrome experience a very early colonization by periodontopathogens in their childhood and bacteria levels tend to increase over the years. So, these findings may support the higher level of *Treponema denticola* found in the Down syndrome than in Control group at baseline in the present study.

Notably, this study is the first one that quantifies the levels of *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola* by qPCR and found significantly higher levels of these red complex pathogens in the Down syndrome than in control group 45 days after non-surgical periodontal therapy.

Regarding to healthy sites at baseline, no statistically significant differences were found between groups in the counts of *T. denticola* and *T. forsythia*. Although DS subjects generally develop an earlier and more

extensive periodontal breakdown than those presented by subjects with mental disabilities, Amano et al. <sup>4</sup> (2001) did not observe significant differences in the bacterial profiles comparing these two groups of patients. Yamazaki-Kubota et al. <sup>168</sup> (2010) found a rate of 42.9% for *P. gingivalis*, 64.3% for *A. actinomycetemcomitans*, 35.7% for *C. rectus* and *T. denticola* in DS patients. Nevertheless, the detection rate of periodontopathic bacteria in subgingival plaque in Down's syndrome patients wasn't statistically different compared to the control subjects. *Porphyromonas gingivalis* is frequently detected in periodontally healthy people, and this colonization of the oral cavity is necessary, but not sufficient, to induce periodontal disease<sup>61</sup>. However, the increase of *P. gingivalis* is gradual and the prevalence is significantly high in Down syndrome. Although the periodontal parameters in both groups were comparable in the present study, when we compared healthy sites in Down's syndrome individuals and in control group it was observed a significantly higher count of this periodontal bacteria in the DS group ( $p=0.0201$ ). This finding suggests that host factor(s) are important in the induction and progression of periodontal diseases, likely that gingival epithelial cells associated with DS are more sensitive to *P. gingivalis* than those of healthy individuals<sup>99, 128</sup>.

Comparing findings at baseline and 45 days after non-surgical periodontal treatment, in diseased sites of the Down syndrome group, although there was a decrease in the count of *T. denticola* and *T. forsythia*, it was not statistically significant. These observations are in agreement with finding by Cichon et al. <sup>32</sup> who demonstrated no statistically significant difference in percentage of *P. gingivalis*, *T. denticola* and *T. forsythia* in individuals with Down's syndrome compared with control subjects at baseline, and at 1, 4, and 12 weeks post treatment. Otherwise, in this work, the levels of *P. gingivalis*, *T. forsythia*, and *T. denticola* were significantly lower at 45 days after periodontal treatment in the diseased sites of the Control group. Similar results were found by Finoti et al. <sup>48</sup> and Cugini et al. <sup>36</sup>. Hanookai et al. <sup>65</sup> doing the counts of *P. gingivalis* and *T. forsythia* in samples obtained from subgingival debridement in the deep pockets (5mm or more) at baseline, 1 and 4 weeks did not show statistically significant difference. On the other hand, in one longitudinal study with five Down's syndrome adult patients with periodontitis placed on a recall visit schedule at 1, 3 and 6 months after treatment, the percentages of detection of *P. gingivalis* and *T. forsythia* were reduced at 1 and 3 months after baseline ( $p<0.05$ ). Six months after treatment the percentage of detection was increased only for *T. forsythia* ( $p<0.05$ )<sup>124</sup>.

Regarding to healthy sites, at 45 days after periodontal treatment, the levels of *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola* reduced significantly in both groups. Different findings were found by Hanookai et al. <sup>65</sup> who showed that the occurrence of *P. gingivalis* and *T. Forsythia* in shallow periodontal sites (1 to 3 mm) at baseline, 1 and 4 weeks had no statistically significant difference in Down syndrome patients. The results of the present investigation reinforced that patient collaboration with oral hygiene and with the non-surgical treatment are essential factors to obtain a greatest reduction in specific subgingival microbial species.

## **Conclusion**

According to the data reported in this work, the maintenance phase of therapy might not have the major effect in the count of red complex pathogens in diseased sites difference but have improved effect in healthy sites, for Down syndrome patients. Nevertheless, the continual and effective oral hygiene can markedly delay

subgingival establishment of pathogenic bacteria. Although, higher prevalence of periodontal disease in Down syndrome subjects is, probably, related to the impaired host response and not to the occurrence of specific periodontal pathogens. Perhaps, other associated factors might be the inability of remove the biofilm and effectively control supragingival plaque. Further studies could determine a better protocol for monitoring and maintenance for improve periodontal health in Down syndrome with periodontal disease.

## References

1. Byrne SJ, Dashper SG, Darby IB, Adams GG, Hoffmann B, Reynolds EC (2009) Progression of chronic periodontitis can be predicted by the levels of Porphyromonas gingivalis and Treponema denticola in subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol* 24 (6):469-477. doi:10.1111/j.1399-302X.2009.00544.x
2. Garlet GP (2010) Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of dental research* 89 (12):1349-1363. doi:10.1177/0022034510376402
3. Feng Z, Weinberg A (2006) Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontol* 2000 40:50-76. doi:10.1111/j.1600-0757.2005.00148.x
4. Haffajee AD, Socransky SS (1994) Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000 5:78-111
5. Wade WG (2011) Has the use of molecular methods for the characterization of the human oral microbiome changed our understanding of the role of bacteria in the pathogenesis of periodontal disease? *J Clin Periodontol* 38 Suppl 11:7-16. doi:10.1111/j.1600-051X.2010.01679.x
6. Finoti LS, Corbi SC, Anovazzi G, Teixeira SR, Capela MV, Tanaka MH, Kim YJ, Orrico SR, Cirelli JA, Mayer MP, Scarel-Caminaga RM (2013) Pathogen levels and clinical response to periodontal treatment in patients with Interleukin 8 haplotypes. *Pathogens and disease*. doi:10.1111/2049-632X.12062
7. Kornman K, Crane A, Wang H, di Giovine F, Newman M, Pirk F, Wilson TJ, Higginbottom F, Duff G (1997) The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol* 24 (1):72-77
8. Corbi SC, Finoti LS, Anovazzi G, Tanaka MH, Kim YJ, Secolin R, Marcaccini AM, Gerlach RF, Orrico SR, Cirelli JA, Scarel-Caminaga RM (2013) Clinical outcomes of periodontal therapy are not influenced by the ATC/TTC haplotype in the IL8 gene. *Journal of periodontal research*. doi:10.1111/jre.12128
9. Finoti LS, Anovazzi G, Pigossi SC, Corbi SC, Teixeira SR, Braidó GV, Kim YJ, Orrico SR, Cirelli JA, Mayer MP, Scarel-Caminaga RM (2013) Periodontopathogens levels and clinical response to periodontal therapy in individuals with the interleukin-4 haplotype associated with susceptibility to chronic periodontitis. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 32 (12):1501-1509. doi:10.1007/s10096-013-1903-z
10. Shapira L, Wilensky A, Kinane D (2005) Effect of genetic variability on the inflammatory response to periodontal infection. *J Clin Periodontol* 32 (6):72-86
11. Cavalcante LB, Tanaka MH, Pires JR, Apponi LH, Aparecida Giro EM, Valentini SR, Palomari Spolidorio DM, Capela MV, Rossa C, Jr., Scarel-Caminaga RM (2012) Expression of the interleukin-10 signaling pathway genes in individuals with Down syndrome and periodontitis. *J Periodontol* 83 (7):926-935. doi:10.1902/jop.2011.110056
12. Tanaka MH, Giro EM, Cavalcante LB, Pires JR, Apponi LH, Valentini SR, Spolidorio DM, Capela MV, Rossa C, Jr., Scarel-Caminaga RM (2012) Expression of interferon-gamma, interferon-alpha and related genes in individuals with Down syndrome and periodontitis. *Cytokine* 60 (3):875-881. doi:10.1016/j.cyto.2012.08.020
13. Cichon P, Crawford L, Grimm WD (1998) Early-onset periodontitis associated with Down's syndrome--clinical interventional study. *Ann Periodontol* 3 (1):370-380
14. Desai S (1997) Down syndrome: a review of the literature. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 3:279-285
15. Genco RJ, Loe H (1993) The role of systemic conditions and disorders in periodontal disease. *Periodontol* 2000 2:98-116
16. Reuland-Bosma W, van Dijk J (1986) Periodontal disease in Down's syndrome: a review. *J Clin Periodontol* 13 (1):64-73
17. Amano A, Kishima T, Kimura S, Takiguchi M, Ooshima T, Hamada S, Morisaki I (2000) Periodontopathic bacteria in children with Down syndrome. *J Periodontol* 71 (2):249-255. doi:10.1902/jop.2000.71.2.249
18. Hanookai D, Nowzari H, Contreras A, Morrison JL, Slots J (2000) Herpesviruses and periodontopathic bacteria in Trisomy 21 periodontitis. *J Periodontol* 71 (3):376-384. doi:10.1902/jop.2000.71.3.376

19. Sakellari D, Belibasakis G, Chadjipadelis T, Arapostathis K, Konstantinidis A (2001) Supragingival and subgingival microbiota of adult patients with Down's syndrome. Changes after periodontal treatment. *Oral Microbiol Immunol* 16 (6):376-382. doi:160610 [pii]
20. Murakami J, Kato T, Kawai S, Akiyama S, Amano A, Morisaki I (2008) Cellular motility of Down syndrome gingival fibroblasts is susceptible to impairment by *Porphyromonas gingivalis* invasion. *J Periodontol* 79 (4):721-727. doi:10.1902/jop.2008.070400
21. Yamazaki-Kubota T, Miyamoto M, Sano Y, Kusumoto M, Yonezu T, Sugita K, Okuda K, Yakushiji M, Ishihara K (2010) Analysis of matrix metalloproteinase (MMP-8 and MMP-2) activity in gingival crevicular fluid from children with Down's syndrome. *Journal of periodontal research* 45 (2):170-176. doi:JRE1214 [pii] 10.1111/j.1600-0765.2009.01214.x
22. Khocht A, Yaskell T, Janal M, Turner BF, Rams TE, Haffajee AD, Socransky SS (2012) Subgingival microbiota in adult Down syndrome periodontitis. *Journal of periodontal research*. doi:10.1111/j.1600-0765.2011.01459.x
23. Martinez-Martinez RE, Loyola-Rodriguez JP, Bonilla-Garro SE, Patino-Marin N, Haubek D, Amano A, Poulsen K (2013) Characterization of periodontal biofilm in Down syndrome patients: a comparative study. *The Journal of clinical pediatric dentistry* 37 (3):289-295
24. Reuland-Bosma W, van der Reijden WA, van Winkelhoff AJ (2001) Absence of a specific subgingival microflora in adults with Down's syndrome. *J Clin Periodontol* 28 (11):1004-1009
25. WHO (2003) The World Oral Health Report-Continuous improvement of oral health in the 21st century - the approach of the WHO Global Oral Health Programme. World Health Organization
26. Teles RP, Likhari V, Socransky SS, Haffajee AD (2009) Salivary cytokine levels in subjects with chronic periodontitis and in periodontally healthy individuals: a cross-sectional study. *Journal of periodontal research* 44 (3):411-417. doi:10.1111/j.1600-0765.2008.01119.x
27. Teixeira SR, Mattarazo F, Feres M, Figueiredo LC, de Faveri M, Simionato MR, Mayer MP (2009) Quantification of *Porphyromonas gingivalis* and fimA genotypes in smoker chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 36 (6):482-487. doi:CPE1411 [pii] 10.1111/j.1600-051X.2009.01411.x
28. Amano A, Nakagawa I, Kataoka K, Morisaki I, Hamada S (1999) Distribution of *Porphyromonas gingivalis* strains with fimA genotypes in periodontitis patients. *J Clin Microbiol* 37 (5):1426-1430
29. Mullally BH, Dace B, Shelburne CE, Wolff LF, Coulter WA (2000) Prevalence of periodontal pathogens in localized and generalized forms of early-onset periodontitis. *Journal of periodontal research* 35 (4):232-241
30. Shelburne CE, Prabhu A, Gleason RM, Mullally BH, Coulter WA (2000) Quantitation of *Bacteroides forsythus* in subgingival plaque comparison of immunoassay and quantitative polymerase chain reaction. *J Microbiol Methods* 39 (2):97-107
31. Cutress TW, Brown RH, Guy EM (1970) Occurrence of some bacterial species in the dental plaque of trisomic 21 (mongoloid), other mentally retarded, and normal subjects. *The New Zealand dental journal* 66 (304):153-161
32. Orner G (1976) Periodontal disease among children with Down's syndrome and their siblings. *Journal of dental research* 55 (5):778-782
33. Amano A, Kishima T, Akiyama S, Nakagawa I, Hamada S, Morisaki I (2001) Relationship of periodontopathic bacteria with early-onset periodontitis in Down's syndrome. *J Periodontol* 72 (3):368-373. doi:10.1902/jop.2001.72.3.368
34. Meskin LH, Farsht EM, Anderson DL (1968) Prevalence of *Bacteroides melaninogenicus* in the gingival crevice area of institutionalized trisomy 21 and cerebral palsy patients and normal children. *J Periodontol* 39 (6):326-328
35. Griffen AL, Becker MR, Lyons SR, Moeschberger ML, Leys EJ (1998) Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal health status. *J Clin Microbiol* 36 (11):3239-3242
36. Sasaki Y, Sumi Y, Miyazaki Y, Hamachi T, Nakata M (2004) Periodontal management of an adolescent with Down's syndrome--a case report. *Int J Paediatr Dent* 14 (2):127-135. doi:529 [pii]
37. Cugini MA, Haffajee AD, Smith C, Kent RL, Jr., Socransky SS (2000) The effect of scaling and root planing on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases: 12-month results. *J Clin Periodontol* 27 (1):30-36

**Table 1. Demographic characteristics and mean ( $\pm$ SD) of full-mouth clinical parameters of the study groups**

Characteristics (mean values $\pm$ SD)	Groups		
	Down Syndrome n=23	Control Group n=12	<i>p</i> -value
Age (years) ( $\pm$ )	31.91 ( $\pm$ 5.85)	41.25 ( $\pm$ 6.17)	0.001
Gender (M/F)	15/8	7/5	NS
<b>Probing depth (mm) (<math>\pm</math>)</b>			
Baseline	2.27 ( $\pm$ 0.45)	2.29 ( $\pm$ 0.45)	NS
45 days	1.82 ( $\pm$ 0.44)	1.57 ( $\pm$ 0.21)	NS
<b>p-value</b>	0.0012	0.0001	
<b>Attachment level (mm) (<math>\pm</math>)</b>			
Baseline	2.33 ( $\pm$ 0.51)	2.47 ( $\pm$ 0.48)	NS
45 days	1.91 ( $\pm$ 0.51)	1.74 ( $\pm$ 0.34)	NS
<b>p-value</b>	0.0084	0.0007	
<b>Plaque (%faces)</b>			
Baseline	83.76 ( $\pm$ 11.33)	48.51 ( $\pm$ 19.54)	<0.0001
45 days	27.73 ( $\pm$ 13.33)	15.57 ( $\pm$ 10.15)	0,0158
<b>p-value</b>	< 0,0001	0,0001	
<b>GB (%sites)</b>			
Baseline	44.20 ( $\pm$ 21.45)	25.57 ( $\pm$ 12.10)	0.0090
45 days	10.29( $\pm$ 11.80)	6.85 ( $\pm$ 7.40)	NS
<b>p-value</b>	< 0,0001	0,0004	
<b>BOP (%sites)</b>			
Baseline	39.16 ( $\pm$ 20.75)	40.46 ( $\pm$ 21.10)	NS
45 days	12.46 ( $\pm$ 9.14)	8.76 ( $\pm$ 5.93)	NS
<b>p-value</b>	< 0,0001	0,0002	

GB: Gingival bleeding and BOP: Bleeding on probing

*p*-value = Unpaired t-test for evaluation between Down Syndrome and Control Group for all variables, except for gender it was used the Chi-squared test.

**Table 2. Clinical parameters (median; min-max) in both periodontal diseased groups (at baseline and 45 after treatment) at sample collected sites**

	Clinical Parameters	Groups		<i>p</i> -value*
		Down syndrome	Control	
Diseased Sites	<b>PPD (mm)</b>			
	<b>Baseline</b>	4.0 (4.0-5.0)	4.0 (4.0-5.0)	<i>NS</i>
	<b>45 days</b>	3.0 (1.0-6.0)	2.0 (1.0-3.0)	<i>NS</i>
	<i>p</i> -value**	<0.0001	<0.0001	
	<b>CAL (mm)</b>			
	<b>Baseline</b>	4.0 (4.0-6.0)	4.0 (4.0-8.0)	<i>NS</i>
	<b>45 days</b>	3.0 (1.0-6.0)	2.0 (1.0-5.0)	<i>NS</i>
	<i>p</i> -value**	<0.0001	<0.0001	
	<b>BOP (Y/N)</b>			
<b>Baseline</b>	41/5	18/6	<i>NS</i>	
<b>45 days</b>	4/38	3/17	<i>NS</i>	
<i>p</i> -value**	<0.0001	<0.0001		
Healthy Sites	<b>PPD (mm)</b>			
	<b>Baseline</b>	1.0 (1.0-2.0)	1.0 (1.0-2.0)	<i>NS</i>
	<b>45 days</b>	1.0 (1.0-2.0)	1.0 (1.0-2.0)	<i>NS</i>
	<i>p</i> -value**	<i>NS</i>	<i>NS</i>	
	<b>CAL (mm)</b>			
	<b>Baseline</b>	1.0 (1.0-3.0)	1.0 (1.0-3.0)	<i>NS</i>
	<b>45 days</b>	1.0 (1.0-3.0)	1.0 (1.0-5.0)	<i>NS</i>
	<i>p</i> -value**	<i>NS</i>	<i>NS</i>	
	<b>BOP (Y/N)</b>			
<b>Baseline</b>	2/44	0/24	<i>NS</i>	
<b>45 days</b>	0/42	0/20	<i>NS</i>	
<i>p</i> -value**	<i>NS</i>	<i>NS</i>		

PPD=Probing Pocket Depth; CAL=Clinical Attachment Loss; BOP=Bleeding on Probing; NS: no significance  
*p*-value\* = Mann-Whitney for evaluation between the Down Syndrome and Control Group in each period  
*p*-value\*\* = Wilcoxon test for evaluation of each group between the different periods

**Table 3. Counts of *16SrRNA* gene copies of microorganisms (median; min-max [ $\times 10^3$ ]) in samples obtained from diseased and healthy sites in both periodontal diseased groups (at baseline and 45 after treatment)**

	Counts of <i>16SrRNA</i>	Groups		<i>p</i> -value*
		Down syndrome	Control	
Diseased Sites	<i>P. gingivalis</i>			
	Baseline	29.1 (0.9-65044.3)	18.5 (0.3-8635.8)	NS
	45 days	22.3 (0.4-15397.2)	2.3 (0.0-39.2)	<0.0001
	<i>p</i> -value**	NS	0.0027	
	<i>T. denticola</i>			
	Baseline	1358.2 (7.2-86392.2)	208.7 (2.95-62549.3)	0.03
	45 days	441.4 (2.4-53255.7)	4.4 (0.1-8605.1)	0.0003
	<i>p</i> -value**	NS	0.0172	
	<i>T. forsythia</i>			
Baseline	235.4 (1.4-23178.3)	55.9 (1.5-20160)	NS	
45 days	46.81 (0.1-20963.1)	4.4 (0.0-4906.5)	0.0007	
<i>p</i> -value**	NS	0.0240		
Healthy Sites	<i>P. gingivalis</i>			
	Baseline	5.4 (0.3-7545.7)	1.3 (0.1-2407.9)	0.0201
	45 days	2.2 (0.0-1849.9)	0.5 (0.0-48.2)	<0.0001
	<i>p</i> -value**	0.01	0.04	
	<i>T. denticola</i>			
	Baseline	16.9 (1.2-18609.9)	7.3 (0.1-9489.6)	NS
	45 days	7.1 (0.2-11117.3)	2.3(0.0-21.9)	0.0043
	<i>p</i> -value**	0.0267	0.0328	
	<i>T. forsythia</i>			
Baseline	7.6 (0.1-19742.9)	4.7 (0.0-769.9)	NS	
45 days	3.5 (0.1-16550.1)	0.2 (0.0-1.94)	<0.0001	
<i>p</i> -value**	0.0017	0.0014		

*p*-value\* = Mann-Whitney for evaluation between the Down Syndrome and Control Group in each period

*p*-value\*\* = Wilcoxon test for evaluation of each group between the different periods

NS: no significance



## Capítulo 2

# Níveis das citocinas Th1/Th2 e Th17 em indivíduos com Síndrome de Down com doença periodontal antes e depois do tratamento periodontal não cirúrgico\*

Marcia H. Tanaka\*

Thamiris O. Rodrigues†

Carlos Rossa Jr‡

Raquel M. Scarel-Caminaga§

Niels O. S. Câmara\*\*

Elisa M. A. Giro††

\* Department of Orthodontics and Pediatric Dentistry, School of Dentistry, UNESP – Univ Estadual Paulista, Araraquara, SP, São Paulo, Brazil

† Department of Orthodontics and Pediatric Dentistry, School of Dentistry, UNESP – Univ Estadual Paulista, Araraquara, SP, São Paulo, Brazil

‡ Department of Diagnosis and Surgery, School of Dentistry at Araraquara, UNESP-Univ Estadual Paulista, São Paulo, Brazil

§ Department of Morphology, School of Dentistry, UNESP – Univ Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, SP, Brazil

\*\* Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil

†† Department of Orthodontics and Pediatric Dentistry, School of Dentistry, UNESP – Univ Estadual Paulista, Araraquara, SP, São Paulo, Brazil

***Níveis das citocinas Th1/Th2 e Th17 em indivíduos com Síndrome de Down com doença periodontal antes e depois do tratamento periodontal não cirúrgico\****

Marcia H. Tanaka, DDS, PhD student<sup>\*</sup>; Thamiris O. Rodrigues DDS, MS<sup>†</sup>; Carlos Rossa Jr, DDS, PhD<sup>‡</sup>, Raquel M. Scarel-Caminaga, BSc, MSc<sup>§</sup>, Niels O. S. Câmara, DDS, PhD<sup>\*\*</sup>; Elisa M. A. Giro, DDS, PhD<sup>††</sup>

<sup>\*</sup> Department of Orthodontics and Pediatric Dentistry, School of Dentistry, UNESP – Univ Estadual Paulista, Araraquara, SP, São Paulo, Brazil

<sup>†</sup> Department of Orthodontics and Pediatric Dentistry, School of Dentistry, UNESP – Univ Estadual Paulista, Araraquara, SP, São Paulo, Brazil

<sup>‡</sup> Department of Diagnosis and Surgery, School of Dentistry at Araraquara, UNESP-Univ Estadual Paulista, São Paulo, Brazil

<sup>§</sup> Department of Morphology, School of Dentistry, UNESP – Univ Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, SP, Brazil

<sup>\*\*</sup> Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil

<sup>††</sup> Department of Orthodontics and Pediatric Dentistry, School of Dentistry, UNESP – Univ Estadual Paulista, Araraquara, SP, São Paulo, Brazil

Corresponding Author:

Elisa Maria Aparecida Giro

Department of Orthodontics and Pediatric Dentistry, Araraquara School of Dentistry, UNESP – Univ Estadual Paulista

Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, Brazil

CEP- 14801-903

Tel.: +55 16 33016336

Fax: +55 16 33016329

e-mail: [egiro@foar.unesp.br](mailto:egiro@foar.unesp.br)

## **Resumo**

O objetivo deste estudo foi determinar se os níveis de algumas citocinas Th1, Th2 e Th17 no fluido gengival (GCF) foi diferente entre os indivíduos com Síndrome de Down (SD) e indivíduos normais, ambos com doença periodontal (DP), em resposta à tratamento periodontal não-cirúrgico. Foram selecionados um total de 30 indivíduos, os quais foram divididos nos seguintes grupos: Grupo 1- Síndrome de Down com Doença Periodontal (SD) (n=20) e Grupo 2- Não-sindrômicos com Doença Periodontal (Controle) (n=10), antes (I) e depois (F) do tratamento. Dependendo da normalidade dos dados, foram aplicados o teste-t de Student ou Mann-Whitney para analisar as diferenças entre os grupos, e os teste-t de Student ou Wilcoxon para dados pareados para analisar os diferentes períodos em ambos os grupos. O nível de significância adotado foi de 0,05. A interleucina (IL)-12 (p70) não foi detectada nos sítios (sadios e doentes) do grupo controle. Nos sítios doentes, foram observados maiores quantidades das citocinas IL-6, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-17A nos indivíduos com SD em comparação com o grupo controle, antes e depois do tratamento. Nos sítios sadios, as citocinas IL-6, IFN- $\gamma$  e IL-17A foram mais abundantes nos síndrômicos antes do tratamento, porém após o tratamento, somente a IL-17A foi maior nos indivíduos com SD. Concluindo, podemos sugerir que a resposta imune dos indivíduos com SD com DP possui maiores concentrações de Th1, Th2 e Th17 em sítios doentes do que os cromossomicamente normais e, embora o tratamento periodontal não cirúrgico determine uma redução das concentrações de várias citocinas pró-inflamatórias e melhora nos parâmetros clínicos, em ambos os grupos, a resposta frente ao processo inflamatório é mais intensa nos indivíduos com SD, explicando em parte, a alta prevalência e severidade da doença nesses indivíduos.

**Palavra-Chave:** Síndrome de Down, Periodontite, Sistema Imunológico, Linfócitos T Auxiliares-Indutores, Citocinas

## **Abstract**

The aim of this study was to determine if the levels of some cytokines of the Th1, Th2 and Th17 cells in gingival crevicular fluid (GCF) differed between subjects with Down syndrome (DS) and normal subjects, both with periodontal disease (PD), in response to non-surgical periodontal therapy. Thirty individuals were divided into the following groups: Group 1 - DS with PD (DS) (n=20) and Group 2 - Non-syndromic with PD (Control) (n=10), before (I) and after therapy (F). According to the normality of the data, were applied the Student's t-test or Mann-Whitney test to analyze differences between groups, and Student's t-test or Wilcoxon test for paired data to analyze the different periods in both groups ( $\alpha=0.05$ ). Interleukin (IL)-12 (p70) was not detected in healthy and diseased sites in the control group. In the diseased sites, increased levels of IL-6, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-17A and IL-10 were detected in individuals with DS compared with the control group before and after the periodontal therapy. In healthy sites, IL-6, IFN- $\gamma$  and IL-17A cytokines were more abundant in DS before the periodontal therapy. However, after the periodontal therapy, only IL-17A was higher in individuals with DS. The results confirm that periodontal therapy effectively reduces clinical parameters in the DS group and in the control group. Nevertheless, the levels of Th1, Th2 and Th17 cells at diseased sites were higher in DS group than in chromosomally normal group. So, increased inflammatory mediator levels in CGF in DS individuals, suggest that these patients might have a propensity to overproduce these cytokines, and may in part, explaining the higher prevalence of Down syndrome to periodontal diseases.

**Key Words:** Down syndrome, Periodontitis, Immune System, T-Lymphocytes, Helper-Inducer, Cytokines,

## **Introdução**

A Doença Periodontal (DP) é uma doença inflamatória caracterizada pela destruição do periodonto e eventual perda dentária<sup>104</sup>. Muitos estudos têm relatado que os indivíduos com Síndrome de Down (SD) têm um aumento da prevalência de doença periodontal (DP) em comparação com indivíduos cromossomicamente normais, pareados por idade, e com outros portadores de necessidades especiais<sup>11, 37, 39, 41, 93, 106, 121</sup>. A DP é considerada como uma doença multifatorial, podendo, nos indivíduos com SD, estar associada a fatores como má higiene bucal, a composição da placa subgengival e a deficiência na resposta imune frente ao processo inflamatório<sup>4, 29, 74, 79, 80, 96, 158</sup>.

Deficiências no sistema imune nos indivíduos SD incluem o desbalanço nas subpopulações de linfócitos T, menor atividade de fagocitose por leucócitos, redução na quimiotaxia de neutrófilos, produção alterada de anticorpos, e maiores quantidades de mediadores inflamatórios na presença da DP<sup>9, 14, 29, 73, 78, 88, 111, 141, 157</sup>.

Interessante ressaltar que no braço longo do cromossomo 21 existe um agrupamento de genes (*cluster*) composto pelos genes *IL10RB* e *IFNGR2* juntamente com os genes dos dois receptores do IFN- $\alpha$ , estando os quatro genes orientados um em seguida do outro (*tandem*)<sup>117</sup>. Pelo fato de possuírem um cromossomo 21 extra, na presença de DP, a expressão gênica de *IL10RB* mRNA é maior nesses indivíduos, porém a expressão do *IFN $\gamma$*  mRNA tem se mostrado semelhante entre os grupos SD e Controle, ambos com DP<sup>25, 149</sup>. Já no timo de indivíduos com Síndrome de Down, foi encontrada uma super expressão de citocinas como *TNF $\alpha$*  e *IFN $\gamma$*  mRNA, o que poderia explicar uma anatomia anormal do timo e reduzido número de linfócitos T maduros, resultando em uma resposta imune deficiente nesses indivíduos sindrômicos<sup>100</sup>.

Os linfócitos T helper (Th) são responsáveis pela resposta imune e podem se diferenciar em Th1, Th2, Th17 e Treg que irão mediar na inflamação, destruição tecidual e autoimunidade<sup>97</sup>. Algumas das citocinas liberadas pelos linfócitos Th1 (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL12, IFN- $\gamma$ , GM-CSF e TNF- $\alpha$ ) e Th17 (IL-17) são conhecidas como citocinas pro-inflamatórias, e as citocinas liberadas pelos linfócitos Th2 (IL-4, IL-6 e IL-10) são conhecidas como citocinas anti inflamatórias<sup>71, 116, 132, 148, 172</sup>. Assim, como em qualquer doença inflamatória crônica, as citocinas tem um papel importante no início, na progressão e na modulação da resposta imune do hospedeiro na doença periodontal<sup>15, 172</sup>. Desse modo, o desbalanço das quantidades dessas citocinas Th1, Th2 e Th17 no tecido gengival e no fluido gengival crevicular podem causar reabsorção óssea e destruição do colágeno durante a evolução da inflamação periodontal<sup>68</sup>.

A Interleucina 12 é produzida pelos macrófagos ativados e células dendríticas. Ela regula o balanço entre Th1 e Th2 pela diferenciação de células T naive em células Th1 que sintetizam múltiplas citocinas pro-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ <sup>107, 172</sup>. O Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) é um potente ativador de macrófagos, neutrófilos e pode estimular o desenvolvimento de células Th1 sendo importante na reabsorção óssea<sup>86</sup>. As citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  também são potentes indutores da reabsorção óssea e inibidores da formação óssea<sup>144, 145</sup>. Essas citocinas pró inflamatórias são liberadas principalmente por macrófagos após infecção bacteriana ou injúria no tecido<sup>42</sup>. Altas concentrações dessas citocinas são capazes de estimular a produção e liberação de outros mediadores inflamatórios como a IL-6 que atua como citocina pro e anti

inflamatória sendo capaz de induzir a diferenciação de células B, proliferação de células T e síntese de proteínas de fase aguda<sup>71, 116</sup>.

Outra citocina pro-inflamatória é a IL-17 que estimula uma variedade de células a produzir mediadores inflamatórios como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ <sup>17, 132</sup>. Adicionalmente, a via de sinalização da IL-17 também está associada na proteção contra bactérias via recrutamento de fagócitos, o que potencializa o processo de destruição periodontal<sup>122, 132, 148</sup>. Pertencente as citocinas pro-inflamatórias, o Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF) é produzido principalmente por monócitos/macrófagos, fibroblastos e células endoteliais e desempenha um papel essencial na sobrevivência dos neutrófilos. Esta citocina atrasa a apoptose dos neutrófilos resultando num aumento da função fagocitária nos tecidos gengivais de indivíduos com DP, aumentando assim o potencial de inflamação na periodontite<sup>35, 40, 51</sup>.

Por outro lado, temos a IL-10 que é uma citocina anti-inflamatória produzida principalmente por células Th2, associada a baixa severidade da doença periodontal<sup>52, 54</sup>. Portanto, inibe principalmente a produção de IFN- $\gamma$  pelas células Th1 além da síntese de outras citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-6, e TNF- $\alpha$ . Adicionalmente, a IL-10 também é um estimulador de células B e pode inibir uma série de vias de sinalização pro-inflamatórias, suprimindo a produção de metaloproteinases e estimulando a produção de osteoprotegerina, que é um inibidor da reabsorção óssea<sup>53, 129</sup>.

Portanto, podemos observar que o desbalanço nas populações de células Th1, Th2 e Th17 pode aumentar a severidade e estimular a progressão de doenças inflamatórias, como a doença periodontal. A associação do sistema imune deficiente com os fatores etiológicos da DP, nos indivíduos com SD, talvez possa explicar a evolução rápida e a maior severidade desta doença nesses pacientes. Desta forma, este estudo avalia algumas citocinas das células Th1, Th2 e Th17 relacionando suas quantidades nos sítios doentes e saudáveis, antes e depois do tratamento periodontal em indivíduos com Síndrome de Down com doença periodontal.

## ***Materias e Métodos***

### **Delineamento do estudo e seleção da casuística**

Os indivíduos com SD foram selecionados em Associações de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAEs) de Araraquara e região (São Carlos, Catanduva, Matão e Taquaritinga), Associação de Síndrome de Down de São José dos Campos (ASIN) e os não-sindrômicos, nas Clínicas de Periodontia e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr –UNESP). Todos os indivíduos selecionados para compor a casuística deste estudo tiveram seu histórico médico e odontológico avaliados. Os indivíduos com Síndrome de Down e indivíduos não sindrômicos selecionados são de ambos os gêneros e qualquer etnia, apresentando DP.

Foram excluídos indivíduos sem autorização do cardiologista para realização de procedimento odontológico invasivo, com história de antibioticoterapia, que fizeram uso de anti-inflamatórios e/ ou de imunossupressores nos últimos 3 meses, com história de tratamento periodontal nos últimos 6 meses; alteração sistêmica ou alguma doença infecciosa, gestantes, lactantes e os fumantes. Foram excluídos também os indivíduos com SD do tipo mosaico.

Após explicar de maneira acessível, os objetivos da pesquisa aos indivíduos selecionados e seus responsáveis, estes foram convidados a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) aprovado pelo Comitê de Ética em Humanos da FOAr (número do protocolo 62/11- Anexo).

### **Parâmetro clínico**

Foram selecionados para este estudo um total de 30 indivíduos, os quais foram divididos nos seguintes grupos: Grupo 1- Síndrome de Down com Doença Periodontal (SD) (n=20) e Grupo 2- Não-sindrômicos com Doença Periodontal (Controle) (n=10).

Foram considerados com doença periodontal aqueles pacientes com profundidade de sondagem (PS)  $\geq 4$ mm, presença de sangramento à sondagem (SS) e nível de inserção (NI)  $> 3$ mm em pelo menos oito sítios ou mais não adjacentes<sup>152</sup>.

Os participantes desta pesquisa foram submetidos a um exame periodontal realizado por meio de secagem prévia da região com jato de ar, e uso de uma sonda periodontal milimetrada tipo Williams (Trinity-Campo Mourão, Brazil) espelho plano e pinça clínica, devidamente esterilizados. Este exame foi realizado por um único examinador previamente calibrado e consistiu das seguintes avaliações: Índice de placa visível (IPV)<sup>3</sup>, Profundidade de sondagem (PS)<sup>95</sup>, Sangramento marginal (SM), sangramento à sondagem (SS) e Nível de inserção (NI)<sup>95</sup>.

As análises foram realizadas em 6 sítios por dente: disto-vestibular, vestibular, mesio-vestibular, disto-lingual, lingual e mesio-lingual nos parâmetros PS, NI e SS. Os outros parâmetros clínicos como IPV e SM foram realizadas em 4 faces por dente: vestibular, lingual, mesial e distal.

Para evitar interferências devido à sondagem, a coleta inicial do fluido gengival crevicular foi realizada uma semana após o exame clínico periodontal por um único pesquisador com a finalidade de diminuir possíveis variações no método.

### **Tratamento periodontal não-cirúrgico**

Todos os indivíduos participantes do estudo receberam tratamento periodontal não-cirúrgico (raspagem, alisamento e polimento supragengival), que foi realizado por um único cirurgião-dentista especialista em Periodontia, e receberam orientação de higiene bucal, sendo esta reforçada a cada consulta. Posteriormente à raspagem supragengival e contando com a colaboração quanto à higienização bucal, foram realizados a raspagem e alisamento radicular subgengival. Após o término do tratamento periodontal, a orientação de higiene bucal foi reforçado nas consultas de manutenção que foram agendadas a cada 15 dias, até totalizar 45 dias. Em seguida, foi realizada nova coleta de fluido gengival crevicular nos mesmos sítios determinados para a coleta inicial, e foi repetido o exame periodontal.

### **Seleção dos sítios e coletas**

Para as coletas inicial e final do fluido gengival, para ambos os grupos (indivíduos com SD e controle), foram selecionados 3 sítios doentes com profundidade de sondagem entre 4 e 6 mm e perda de inserção entre 3 e 4 mm; e 3 sítios sadios com profundidade de sondagem menor que 3 mm e com ausência de perda de inserção, em dentes diferentes, não-adjacentes. Previamente à coleta, foi removido o biofilme supragengival com gaze esterilizado, a região foi isolada com rolos de algodão, e, cuidadosamente seca com suaves jatos de ar. O fluido gengival foi coletado com o auxílio de um filtro especial (Periopaper - ProFlow Inc., Amityville, NY, USA) que foi introduzido nos mesmos sítios selecionados para análise microbiológica onde permaneceu durante 30 segundos.

No caso de contaminação da amostra com sangue, esta foi descartada, o sangramento do sulco foi controlado por irrigação com solução fisiológica e nova coleta foi realizada após 10 minutos. O volume de fluido foi quantificado utilizando-se um equipamento específico (Periotron 8000 - ProFlow Inc., Amityville, NY, USA), e, em seguida a amostra foi armazenada em microtubos à seco a uma temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior análise.

### **Análise Imunológica**

As amostras de fluido gengival foram utilizadas para avaliação da quantidade das proteínas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 (p70), IFN- $\gamma$ , GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-17A e IL-10. Para esta análise foi utilizada a tecnologia Luminex, utilizando um anticorpo e um recombinante protéico para as proteínas selecionadas do sistema Fluorokine MAP Multiplex Human Cytokine Panel A (Bio-Plex system, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Uma mistura das micropartículas diluídas (50  $\mu\text{L}$ ), a curva padrão (50  $\mu\text{L}$ ) e as amostras do fluido gengival diluídas 20 vezes (50  $\mu\text{L}$ ) foram pipetadas nos respectivos poços da placa e incubadas por 2 horas. Após a lavagem, um coquetel específico de anticorpos conjugado à biotina (50  $\mu\text{L}$ ) foi adicionado e incubado por mais uma hora à temperatura ambiente. Após nova lavagem, um conjugado estreptoavidina-ficoeritrina (50  $\mu\text{L}$ ) foi adicionado, incubado por 30 minutos e as micropartículas foram suspensas em solução tampão. Os resultados foram calculados por meio de um software analisador de imagens (Bio-Plex Manager Software®, Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA). A concentração de citocinas foi expressa em pg/mL.

### **Análise Estatística**

As condições de homogeneidade de variâncias e normalidade dos resíduos, antes e após o tratamento foram confirmadas pelos testes de Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente. O programa utilizado para as análises os dados foi o GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Os dados demográficos e clínicos, e o volume do fluido gengival crevicular tiveram uma distribuição normal. Para as citocinas, quando necessário, os dados foram transformados em logaritmos decimais para a normalização. Além disso, uma correção dos graus de liberdade foi aplicada quando ocorreu heterogeneidade de variâncias com normalidade dos resíduos. Assim, para a variável gênero foi utilizado o teste Qui-quadrado e, para os dados clínicos, volume do fluido gengival e dosagens de citocinas foi utilizado o teste-t de Student para analisar as diferenças entre os grupos, e o teste-t de Student para dados pareados para analisar os diferentes períodos em ambos os grupos. Quando os dados clínicos foram separados de acordo com a condição dos sítios (sadios e doentes), a normalidade não pode ser provada mesmo com a transformação logarítmica. Neste caso, adotou-se o teste U de Mann-Whitney para a comparação entre os dois grupos antes e após o tratamento e o teste de Wilcoxon para dados pareados para avaliar o efeito do tratamento sobre cada grupo. Para estudar a correlação da concentração de cada citocina com a condição dos sítios (sadios e doentes) foram empregados os coeficientes de correlação de Pearson. O nível de significância adotado foi de 0,05.

## ***Resultados***

### **Características Demográficas**

As características demográficas e os dados clínicos estão presentes na tabela 1. O grupo Controle apresentou uma idade média maior do que o grupo Síndrome de Down ( $p=0,001$ ). Em relação ao gênero, não foi

observada diferença estatística entre os grupos. Para profundidade de sondagem (PS) não foi observada diferença estatística entre os grupos nos momentos antes e 45 dias após o tratamento periodontal. Porém, houve uma redução da PS no grupo SD e controle depois do tratamento ( $p=0,0012$  e  $p=0,001$ , respectivamente). O nível de inserção (NI) também não mostrou diferença estatística entre os grupos, mas houve diferença estatística entre os períodos tanto para o grupo SD quanto para o Controle ( $p=0,0084$  e  $p=0,0007$ , respectivamente). O índice de placa visível foi maior para o grupo SD, tanto no início como após o tratamento ( $p<0,0001$  e  $p=0,0158$ , respectivamente) e, para ambos os grupos, o tratamento determinou uma redução significativa deste ( $p\leq 0,0001$ ). Para a variável sangramento marginal, as análises demonstraram efeito significativo do período de avaliação, sugerindo que o tratamento diminuiu as médias dos dois grupos (SD e controle;  $p<0,0001$  e  $p=0,0004$ , respectivamente), sem diferença entre eles após o tratamento. Para o sangramento à sondagem não houve diferença estatística entre os dois grupos, porém o tratamento determinou redução deste, tanto no grupo SD quanto no grupo Controle ( $p<0,0001$  e  $p=0,0002$ , respectivamente).

#### **Avaliação dos sítios selecionados nos diferentes períodos**

Os parâmetros clínicos (PS, NI e SS) dos sítios coletados foram similares nos grupos SD e Controle tanto para os sítios doentes como para os sadios em ambos os períodos (teste de Mann-Whitney,  $p>0,05$ ; Tabela 2). Nos sítios doentes, o tratamento periodontal não cirúrgico resultou numa diminuição significativa nos parâmetros clínicos analisados em ambos os grupos (SD e Controle) (teste de Wilcoxon,  $p<0,05$ , Tabela 2). Para os sítios sadios, antes e 45 dias após o tratamento, não houve diferença para ambos os grupos. Assim, observamos que o tratamento foi eficiente nos sítios doentes e manteve a saúde periodontal nos sítios sadios, em ambos os grupos SD e controle.

#### **Volume do Fluido gengival crevicular e as Concentrações das citocinas estudadas**

##### **Sítios doentes: antes e depois do tratamento**

A citocina IL-12 (p70) não foi detectada nos sítios doentes do grupo Controle. Os indivíduos com SD possuíam um maior volume de fluido gengival e maior concentração de citocinas (IL-6, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-17A) em comparação com indivíduos do grupo Controle antes do tratamento periodontal ( $p<0,05$ ; Tabela 3 e Figura 1). A IL-1 $\beta$  foi a única citocina que não apresentou diferença na quantidade entre ambos os grupos antes do tratamento.

Após o tratamento, todas as citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-10 e IFN- $\gamma$ ) tiveram uma maior quantidade no grupo sindrômico em relação ao grupo Controle ( $p<0,05$ ). Porém, o volume do fluido não apresentou diferença nos grupos estudados.

No grupo SD, o volume do fluido e as citocinas IL-1 $\beta$  e GM-CSF apresentaram uma diminuição significativa depois do tratamento ( $p<0,05$ ). As citocinas IFN- $\gamma$  ( $r:0,65$ ) e IL-10 ( $r:0,57$ ) tiveram uma correlação positiva entre antes e depois do tratamento (Tabela 6). Para o grupo Controle, apenas as citocinas IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  apresentaram uma menor concentração depois do tratamento ( $p<0,05$ ).

### **Sítios sadios: antes e depois do tratamento**

A citocina IL-12 não foi detectada nos sítios sadios de pacientes do grupo Controle. Nos sítios sadios, não foram encontradas diferenças nos volumes do fluido e nem nas concentrações das citocinas (IL-1 $\beta$ , GM-CSF, TNF- $\alpha$  e IL-10) em ambos os grupos. Somente as citocinas IL-6, IL-17A e IFN- $\gamma$  apresentaram concentrações maiores nos grupos com SD em comparação com os grupos controle antes do tratamento ( $p < 0,05$ ; Tabela 4 e Figura 3). Após o tratamento, apenas a citocina IL-17A tinha o dobro da quantidade nos síndromicos do que no grupo Controle.

No grupo SD, o volume do fluido e as concentrações das proteínas não tiveram diferença estatística em ambos os períodos. Observamos apenas uma correlação positiva para a IL-17 ( $r:0,73$ ; Tabela 6). Já para o grupo Controle, somente as citocinas IL-1 $\beta$  e GM-CSF tiveram uma redução na concentração destas proteínas depois do tratamento ( $p < 0,05$ ). Para a citocina IL-6 podemos observar uma correlação positiva ( $r:0,89$ ) nos períodos estudados (Tabela 6).

### **Síndrome de Down: sítios doentes x sítios sadios em diferentes períodos avaliados**

Antes do tratamento, o volume do fluido e as citocinas IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , GM-CSF, TNF- $\alpha$  e IL-17A tem uma maior concentração nos sítios doentes em comparação com os sítios sadios ( $p < 0,05$ ). Na IL-6 foi observada uma correlação positiva ( $r:0,45$ ) entre ambos os sítios antes do tratamento. Depois do tratamento, apenas a IL-10 teve a sua concentração inalterada tanto nos sítios doentes quanto nos sítios sadios. O volume do fluido e as outras citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 (p70), IFN- $\gamma$ , GM-CSF, TNF- $\alpha$  e IL-17A tiveram uma maior concentração em sítios doentes, com uma correlação positiva da IL-1 $\beta$  ( $r:0,50$ ) (Tabela 6).

### **Controle: sítios doentes x sítios sadios em diferentes períodos avaliados**

Antes do tratamento, o volume do fluido e as citocinas IL-1 $\beta$ , IL-17A e IFN- $\gamma$  tem maior quantidade nos sítios doentes em comparação com os sítios sadios. Correlação positiva foi encontrada para a citocina IL-10 ( $r:0,74$ ; Tabela 6). Depois do tratamento, observamos apenas que a IL-1 $\beta$  estava em uma maior quantidade nos sítios doentes em comparação com os sítios sadios ( $p < 0,05$ ). Na citocina IL-17, uma correlação negativa foi observada entre os sítios doente e sadio ( $r:-0,99$ ; Tabela 6).

## ***Discussão***

Evidências crescentes mostram que a alta prevalência de DP em indivíduos com SD pode ser explicado pela resposta deficiente do sistema imune frente ao processo inflamatório<sup>10, 12, 29, 96, 158, 168, 173</sup>. Neste estudo, as citocinas produzidas pela células Th1 (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$ , GM-CSF e TNF- $\alpha$ ), Th2 (IL-10) e Th17 (IL-17A) estão em maior quantidade nos sítios doentes de indivíduos com SD com DP em comparação com o grupo Controle, antes e após o tratamento periodontal não cirúrgico. Eventualmente, o desbalanço desses mediadores inflamatórios possam levar a uma maior severidade da DP nesses indivíduos com SD.

A única citocina não detectada nos pacientes do grupo Controle foi a IL-12 (p70) em ambos os sítios (doentes e sadios) nem antes e nem depois do tratamento. A IL-12 é um heterodímero composto pelas subunidades p35 e p40, os quais formam a IL-12 (p70) bioativa. Entretanto, a subunidade p40 pode ser um antagonista da ligação entre o heterodímero IL-12 (p70) e seu receptor, assim a razão entre IL-12 (p70) e o homodímero p40 refletem a atividade total de IL-12 bioativa<sup>57</sup>. Como este, outros estudos também não

detectaram a IL-12 (p70) nos sítios doentes e sadios de pacientes com periodontite crônica<sup>135, 155</sup>. Porém, encontraram uma maior quantidade de IL-12 (p40) nos sítios doentes em comparação com os sítios sadios. Já no estudo de Orozco et al.<sup>107</sup> foram encontradas menores quantidades dos dois tipos IL-12 (p40) e IL-12 (p70) nos pacientes com periodontite em comparação com pacientes com gengivite. Neste estudo, esta citocina foi detectada apenas no grupo SD e foi observada maior concentração nos sítios doentes em comparação com os sítios sadios apenas depois do tratamento periodontal. Contudo, no Tsilingaridis et al.<sup>158</sup> encontraram maiores concentrações de IL-12 nos pacientes com SD comparados com o grupo Controle. A não detecção da IL-12 nos pacientes do grupo Controle pode indicar concentrações inferiores a capacidade de detecção do método utilizado e, assim, pode-se sugerir que, como encontrado no estudo de Tsilingaridis et al.<sup>158</sup>, os indivíduos controle apresentam menor concentração dessa citocina do que os SD.

O Interferon (IFN)- $\gamma$ , produzido principalmente pelas células Th1 estimuladas pela IL-12, foi detectado em concentração 2,32 vezes maior em sítios doentes de pacientes do grupo SD quando comparado com o grupo Controle, antes do tratamento. Resultados semelhantes foram observados por Tsilingaridis et al.<sup>158</sup> que detectaram 1,88 vezes mais IFN- $\gamma$  em pacientes com SD com gengivite comparados com pacientes Controle com gengivite. Alguns estudos mostram ausência de diferença na concentração de IFN- $\gamma$  entre sítios doentes e sítios sadios de pacientes com DP<sup>105, 135, 155</sup>. Em discordância, este estudo encontrou maiores concentrações nos sítios doentes do grupo Controle antes do tratamento, porém, após o tratamento não foram observadas diferenças nas concentrações dessa citocina entre sítios doentes e sadios de pacientes controle. O mesmo não ocorreu para o grupo SD, as diferenças entre sítios permaneceram estatisticamente maiores nos sítios doentes mesmo depois do tratamento. Além disto, esta citocina teve uma correlação positiva nos sítios doentes de pacientes SD nos períodos estudados. Desta maneira, podemos sugerir que mesmo depois do tratamento, os indivíduos SD necessitam de um tempo maior do que os indivíduos cromossomicamente normais para que ocorra uma regulação na produção dessa citocina.

Além da IL-12, o IFN- $\gamma$  também estimula a produção de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  via diferenciação das células Th1<sup>72</sup>. As citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  são amplamente estudadas por estarem ligadas a reabsorção óssea que ocorre na doença periodontal<sup>16, 67, 84, 105, 107, 113, 135, 151, 153, 155, 158, 172</sup>. A concentração da citocina IL-1 $\beta$  no sangue e na cultura de células de indivíduos com SD, não tiveram diferenças em comparação com indivíduos cromossomicamente normais<sup>27, 72</sup>. Porém no fluido gengival, esta concentração foi maior em indivíduos com SD com gengivite comparados com grupo controle com gengivite<sup>158</sup>. Concordando, com esses autores, o presente estudo encontrou maiores concentrações de IL-1 $\beta$  nos sítios doentes de indivíduos com SD comparados com o grupo controle depois do tratamento. É interessante notar que esta citocina sempre está em concentrações maiores durante a evolução da doença periodontal sendo um bom indicativo do processo inflamatório<sup>105</sup>. Com relação ao TNF- $\alpha$ , os estudos são controversos sobre a sua concentração que pode ser baixa no sangue<sup>27</sup>, não ter diferença na cultura de células<sup>72</sup> e ser alta no fluido gengival<sup>158</sup> de indivíduos SD em comparação com indivíduos cromossomicamente normais. Neste estudo, também encontramos maiores concentrações nos sítios doentes do que nos sítios sadios dos indivíduos com SD tanto antes quanto depois do tratamento em comparação com o grupo controle. No grupo controle, as concentrações desta citocina não sofreram alteração mesmo depois do tratamento, de acordo com o estudo de Shimada et al.<sup>135</sup>. Já no grupo SD, foi observado maiores concentrações nos sítios doentes do que nos sítios sadios, e sem diferença após o tratamento periodontal. Assim,

a alta concentração observada de mais esta citocina pro-inflamatória no grupo SD pode acarretar uma evolução mais agressiva do processo inflamatório.

A citocina IL-6, é considerada uma citocina pro e anti inflamatória, que no sangue de indivíduos com SD foi encontrada em menores concentrações em comparação com o grupo controle<sup>27</sup>. No entanto, na cultura de células e no fluido gengival foram observadas em maior concentração nos SD<sup>72, 158</sup>, resultados que estão de acordo com os observados neste estudo tanto para os sítios doentes e como para os sadios, antes do tratamento. Segundo Offenbacher et al.<sup>105</sup>, Becerik et al.<sup>16</sup> e Shimada et al.<sup>135</sup> para os indivíduos cromossomicamente normais, as concentrações de IL-6 são baixas e as diferenças entre pacientes com periodontite e pacientes periodontalmente saudáveis são bastante discretas. Porém, Johnson et al. (2004) observaram que as concentrações aumentavam de forma gradual ao aumento da profundidade de sondagem em sítios doentes de pacientes com periodontite.

Não foi encontrado na literatura nenhum estudo avaliando a citocina GM-CSF no fluido gengival de indivíduos com SD com DP. Em indivíduos cromossomicamente normais, a concentração desta citocina não teve diferença antes e depois do tratamento periodontal em pacientes com periodontite crônica<sup>155</sup>. No presente estudo a concentração dessa citocina foi maior em pacientes SD do que nos não síndromicos apenas em sítios doentes e, houve uma redução significativa após o tratamento.

A única citocina anti-inflamatória deste estudo é a IL-10 que apresenta uma maior concentração, tanto em sangue quanto em fluido gengival, em indivíduos com SD em comparação com indivíduos cromossomicamente normais<sup>27, 158</sup>. As concentrações desta citocina também foram maiores nos sítios doentes dos indivíduos com SD em comparação com o grupo Controle, e o tratamento não foi capaz de promover uma redução significativa. No entanto, no tecido inflamado foram observados uma diminuição da expressão gênica da *IL-10 mRNA* em pacientes com SD com DP em comparação com pacientes cromossomicamente normais<sup>25</sup>.

Finalmente, uma a citocina que apresentou bastante diferença nas concentrações na comparação entre grupos (SD e Controle) e entre sítios (doentes e sadios) foi a IL-17. Estes resultados discordam daqueles encontrados por Tsilingaridis et al.<sup>158</sup>, que não observaram diferença na concentração em indivíduos com SD com DP em comparação com indivíduos normais com DP. Outro estudo com pacientes com periodontite, não observou nenhuma diferença entre os sítios doentes e sadios<sup>135</sup>. Porém, neste estudo observamos uma maior concentração de IL-17 nos sítios doentes em comparação com os sítios sadios em pacientes com periodontite antes do tratamento. Sua quantidade após o tratamento está inversamente proporcional entre os sítios doentes e sadios no grupo Controle (r:-0.99). Adicionalmente, os achados de Shaker et al.<sup>132</sup> mostraram que em pacientes com periodontite esta concentração é maior em comparação com pacientes periodontalmente saudáveis. Assim, podemos complementar que o grupo SD apresentou maiores concentrações de IL-17 em ambos os sítios (doentes e sadios) em comparação com o grupo Controle.

## **Conclusão**

As citocinas das células Th1, Th2 e Th17 são importantes na resposta imune frente a um processo patológico. Concluindo, podemos sugerir que nos indivíduos com SD o sistema imune não é eficiente na função e na produção de mediadores inflamatórios. Notavelmente, podemos observar uma maior quantidade de citocinas pro e anti inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-17A e IL-10) no fluido gengival desses indivíduos em comparação com os do grupo controle. Após o tratamento periodontal, embora houvesse

melhora nos parâmetros clínicos e redução na concentração de algumas citocinas, a maioria delas permaneceu em altas concentrações nos sítios doentes dos indivíduos com SD, o que demonstra que eles apresentam uma resposta muito mais intensa frente ao processo inflamatório, explicando em parte, a alta prevalência e severidade da doença periodontal em idades precoces.

## Referências

1. Nibali L, Ready D, Parkar M, et al. Gene polymorphisms and the prevalence of key periodontal pathogens. *Journal of dental research* 2007;86:416-420.
2. Cutress TW. Periodontal disease and oral hygiene in trisomy 21. *Arch Oral Biol* 1971;16:1345-1355.
3. Orner G. Periodontal disease among children with Down's syndrome and their siblings. *Journal of dental research* 1976;55:778-782.
4. Reuland-Bosma W, van Dijk J. Periodontal disease in Down's syndrome: a review. *J Clin Periodontol* 1986;13:64-73.
5. Desai S. Down syndrome: a review of the literature. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 1997;3:279-285.
6. Cutress TW, Mickleson KN, Brown RH. Vitamin A absorption and periodontal disease in trisomy G. *Journal of mental deficiency research* 1976;20:17-23.
7. Modeer T, Barr M, Dahllöf G. Periodontal disease in children with Down's syndrome. *Scandinavian journal of dental research* 1990;98:228-234.
8. Barr-Agholme M, Dahllöf G, Linder L, Modéer T. Actinobacillus actinomycetencomitans, Capnocytophaga and Porphyromonas gingivalis in subgingival plaque of adolescents with Down's syndrome. *Oral Microbiol Immunol* 1992;7:244-245.
9. Khocht A, Janal M, Turner B. Periodontal health in Down syndrome: contributions of mental disability, personal, and professional dental care. *Special care in dentistry : official publication of the American Association of Hospital Dentists, the Academy of Dentistry for the Handicapped, and the American Society for Geriatric Dentistry* 2010;30:118-123.
10. Amano A, Kishima T, Akiyama S, Nakagawa I, Hamada S, Morisaki I. Relationship of periodontopathic bacteria with early-onset periodontitis in Down's syndrome. *J Periodontol* 2001;72:368-373.
11. Morgan J. Why is periodontal disease more prevalent and more severe in people with Down syndrome? *Special care in dentistry : official publication of the American Association of Hospital Dentists, the Academy of Dentistry for the Handicapped, and the American Society for Geriatric Dentistry* 2007;27:196-201.
12. Khocht A, Heaney K, Janal M, Turner B. Association of interleukin-1 polymorphisms with periodontitis in Down syndrome. *Journal of oral science* 2011;53:193-202.
13. Tsilingaridis G, Yucel-Lindberg T, Modeer T. T-helper-related cytokines in gingival crevicular fluid from adolescents with Down syndrome. *Clinical oral investigations* 2012;16:267-273.
14. Chaushu S, Chaushu G, Zigmond M, et al. Age-dependent deficiency in saliva and salivary antibodies secretion in Down's syndrome. *Arch Oral Biol* 2007;52:1088-1096.
15. Izumi Y, Sugiyama S, Shinozuka O, Yamazaki T, Ohyama T, Ishikawa I. Defective neutrophil chemotaxis in Down's syndrome patients and its relationship to periodontal destruction. *J Periodontol* 1989;60:238-242.
16. Barkin R, Weston W, Humbert J, Sunada K. Phagocytic function in Down syndrome- Bactericidal activity and phagocytosis. *Journal of mental deficiency research* 1980;24:251-256.
17. Khan A, Evans H, Glass L, Skin Y, Almonte D. Defective neutrophil chemotaxis in patients with Down syndrome. *J Pediatr* 1975;87:87-89.
18. Barroeta O, Nungaray L, Lopez-Osuna M, Armendares S, Salamanca F, Kretschmer RR. Defective monocyte chemotaxis in children with Down's syndrome. *Pediatr Res* 1983;17:292-295.
19. Izumi Y, Sugiyama S, Shinozuka O, Yamazaki T, Ohyama T, Ishikawa I. Defective neutrophil chemotaxis in Down's syndrome patients and its relationship to periodontal destruction. *J Periodontol* 1989;60:238-242.
20. Sohoel PD, Johannessen AC, Kristoffersen T, Haugstvedt Y, Nilsen R. In situ characterization of mononuclear cells in marginal periodontitis of patients with Down's syndrome. *Acta odontologica Scandinavica* 1992;50:141-149.

21. Lin SJ, Wang JY, Klickstein LB, et al. 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.
22. Tsilingaridis G, Yucel-Lindberg T, Modeer T. Enhanced levels of prostaglandin E2, leukotriene B4, and matrix metalloproteinase-9 in gingival crevicular fluid from patients with Down syndrome. *Acta odontologica Scandinavica* 2003;61:154-158.
23. Pellegrini FP, Marinoni M, Frangione V, et al. Down syndrome, autoimmunity and T regulatory cells. *Clin Exp Immunol* 2012;169:238-243.
24. Reboul J, Gardiner K, Monneron D, Uze G, Lutfalla G. Comparative genomic analysis of the interferon/interleukin-10 receptor gene cluster. *Genome Res* 1999;9:242-250.
25. Cavalcante LB, Tanaka MH, Pires JR, et al. Expression of the interleukin-10 signaling pathway genes in individuals with Down syndrome and periodontitis. *J Periodontol* 2012;83:926-935.
26. Tanaka MH, Giro EM, Cavalcante LB, et al. Expression of interferon-gamma, interferon-alpha and related genes in individuals with Down syndrome and periodontitis. *Cytokine* 2012;60:875-881.
27. Murphy M, Friend D, Pike-Nobile L, Epstein L. Tumor necrosis factor-alpha and IFN-gamma expression in human thymus. Localization and overexpression in Down syndrome (trisomy 21). *J Immunol* 1992;149:2506-2512.
28. Mosmann TR, Kobie JJ, Lee FE, Quataert SA. T helper cytokine patterns: defined subsets, random expression, and external modulation. *Immunol Res* 2009;45:173-184.
29. Irwin CR, Myrillas TT. The role of IL-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *Oral diseases* 1998;4:43-47.
30. Yucel OO, Berker E, Gariboglu S, Otlu H. Interleukin-11, interleukin-1beta, interleukin-12 and the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 2008;35:365-370.
31. Shaker OG, Ghallab NA. IL-17 and IL-11 GCF levels in aggressive and chronic periodontitis patients: relation to PCR bacterial detection. *Mediators of inflammation* 2012;2012:174764.
32. Takahashi K, Azuma T, Motohira H, Kinane DF, Kitetsu S. The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2005;32:369-374.
33. Rathnayake N, Akerman S, Klinge B, et al. Salivary biomarkers of oral health: a cross-sectional study. *J Clin Periodontol* 2013;40:140-147.
34. Bascones A, Noronha S, Gomez M, Mota P, Gonzalez Moles MA, Villarroel Dorrego M. Tissue destruction in periodontitis: bacteria or cytokines fault? *Quintessence international* 2005;36:299-306.
35. Honda T, Domon H, Okui T, Kajita K, Amanuma R, Yamazaki K. Balance of inflammatory response in stable gingivitis and progressive periodontitis lesions. *Clin Exp Immunol* 2006;144:35-40.
36. Orozco A, Gemmell E, Bickel M, Seymour GJ. Interleukin-1beta, interleukin-12 and interleukin-18 levels in gingival fluid and serum of patients with gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2006;21:256-260.
37. Lehtonen A, Lund R, Lahesmaa R, Julkunen I, Sareneva T, Matikainen S. IFN-alpha and IL-12 activate IFN regulatory factor 1 (IRF-1), IRF-4, and IRF-8 gene expression in human NK and T cells. *Cytokine* 2003;24:81-90.
38. Stashenko P, Dewhirst FE, Peros WJ, Kent RL, Ago JM. Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. *J Immunol* 1987;138:1464-1468.
39. Stashenko P, Dewhirst FE, Rooney ML, Desjardins LA, Heeley JD. Interleukin-1 beta is a potent inhibitor of bone formation in vitro. *J Bone Miner Res* 1987;2:559-565.
40. Dinarello CA. The biology of interleukin 1 and comparison to tumor necrosis factor. *Immunol Lett* 1987;16:227-231.
41. Beklen A, Ainola M, Hukkanen M, Gurgan C, Sorsa T, Kontinen YT. MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. *Journal of dental research* 2007;86:347-351.
42. Ruddy MJ, Shen F, Smith JB, Sharma A, Gaffen SL. Interleukin-17 regulates expression of the CXC chemokine LIX/CXCL5 in osteoblasts: implications for inflammation and neutrophil recruitment. *J Leukoc Biol* 2004;76:135-144.
43. Coxon A, Tang T, Mayadas TN. Cytokine-activated endothelial cells delay neutrophil apoptosis in vitro and in vivo. A role for granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1999;190:923-934.
44. Gamonal J, Sanz M, O'Connor A, et al. Delayed neutrophil apoptosis in chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2003;30:616-623.
45. de Lima Oliveira AP, de Faveri M, Gursky LC, et al. Effects of periodontal therapy on GCF cytokines in generalized aggressive periodontitis subjects. *J Clin Periodontol* 2012;39:295-302.
46. Garlet G, Martins WJ, Fonseca B, Ferreira B, Silva J. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2004;31:671-679.

47. Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Martins W, Jr., Silva JS. Expression of suppressors of cytokine signaling in diseased periodontal tissues: a stop signal for disease progression? *Journal of periodontal research* 2006;41:580-584.
48. 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;31:443-448.
49. Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of dental research* 2010;89:1349-1363.
50. Teles RP, Likhari V, Socransky SS, Haffajee AD. Salivary cytokine levels in subjects with chronic periodontitis and in periodontally healthy individuals: a cross-sectional study. *Journal of periodontal research* 2009;44:411-417.
51. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J* 1975;25:229-235.
52. Mombelli A, Lang NP. Clinical parameters for the evaluation of dental implants. *Periodontol 2000* 1994;4:81-86.
53. Barr-Agholme M, Dahllof G, Linder L, Modeer T. Actinobacillus actinomycetemcomitans, Capnocytophaga and Porphyromonas gingivalis in subgingival plaque of adolescents with Down's syndrome. *Oral Microbiol Immunol* 1992;7:244-248.
54. Barr-Agholme M, Dahllof G, Modeer T, Engstrom PE, Engstrom GN. Periodontal conditions and salivary immunoglobulins in individuals with Down syndrome. *J Periodontol* 1998;69:1119-1123.
55. Zaldivar-Chiapa RM, Arce-Mendoza AY, De La Rosa-Ramirez M, Caffesse RG, Solis-Soto JM. Evaluation of surgical and non-surgical periodontal therapies, and immunological status, of young Down's syndrome patients. *J Periodontol* 2005;76:1061-1065.
56. Yamazaki-Kubota T, Miyamoto M, Sano Y, et al. Analysis of matrix metalloproteinase (MMP-8 and MMP-2) activity in gingival crevicular fluid from children with Down's syndrome. *Journal of periodontal research* 2010;45:170-176.
57. Gately MK, Renzetti LM, Magram J, et al. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998;16:495-521.
58. Thunell DH, Tymkiw KD, Johnson GK, et al. A multiplex immunoassay demonstrates reductions in gingival crevicular fluid cytokines following initial periodontal therapy. *Journal of periodontal research* 2010;45:148-152.
59. Shimada Y, Tabeta K, Sugita N, Yoshie H. Profiling biomarkers in gingival crevicular fluid using multiplex bead immunoassay. *Arch Oral Biol* 2013;58:724-730.
60. Offenbacher S, Barros S, Mendoza L, et al. Changes in gingival crevicular fluid inflammatory mediator levels during the induction and resolution of experimental gingivitis in humans. *J Clin Periodontol* 2010;37:324-333.
61. Iwamoto T, Yamada A, Yuasa K, et al. Influences of interferon-gamma on cell proliferation and interleukin-6 production in Down syndrome derived fibroblasts. *Arch Oral Biol* 2009;54:963-969.
62. Holmlund A, Hanstrom L, Lerner UH. Bone resorbing activity and cytokine levels in gingival crevicular fluid before and after treatment of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2004;31:475-482.
63. Teles RP, Gursky LC, Faveri M, et al. Relationships between subgingival microbiota and GCF biomarkers in generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2010;37:313-323.
64. Teles RP, Sakellari D, Konstantinidis A, Socransky SS, Haffajee AD. Application of the checkerboard immunoblotting technique to the quantification of host biomarkers in gingival crevicular fluid. *J Periodontol* 2009;80:447-456.
65. Perozini C, Chibebe PC, Leao MV, Queiroz Cda S, Pallos D. Gingival crevicular fluid biochemical markers in periodontal disease: a cross-sectional study. *Quintessence international* 2010;41:877-883.
66. Becerik S, Ozturk VO, Atmaca H, Atilla G, Emingil G. Gingival crevicular fluid and plasma acute-phase cytokine levels in different periodontal diseases. *J Periodontol* 2012;83:1304-1313.
67. Konopka L, Pietrzak A, Brzezinska-Blaszczyk E. Effect of scaling and root planing on interleukin-1beta, interleukin-8 and MMP-8 levels in gingival crevicular fluid from chronic periodontitis patients. *Journal of periodontal research* 2012;47:681-688.
68. Cetiner S, Demirhan O, Inal TC, Tastemir D, Sertdemir Y. Analysis of peripheral blood T-cell subsets, natural killer cells and serum levels of cytokines in children with Down syndrome. *Int J Immunogenet* 2010;37:233-237.

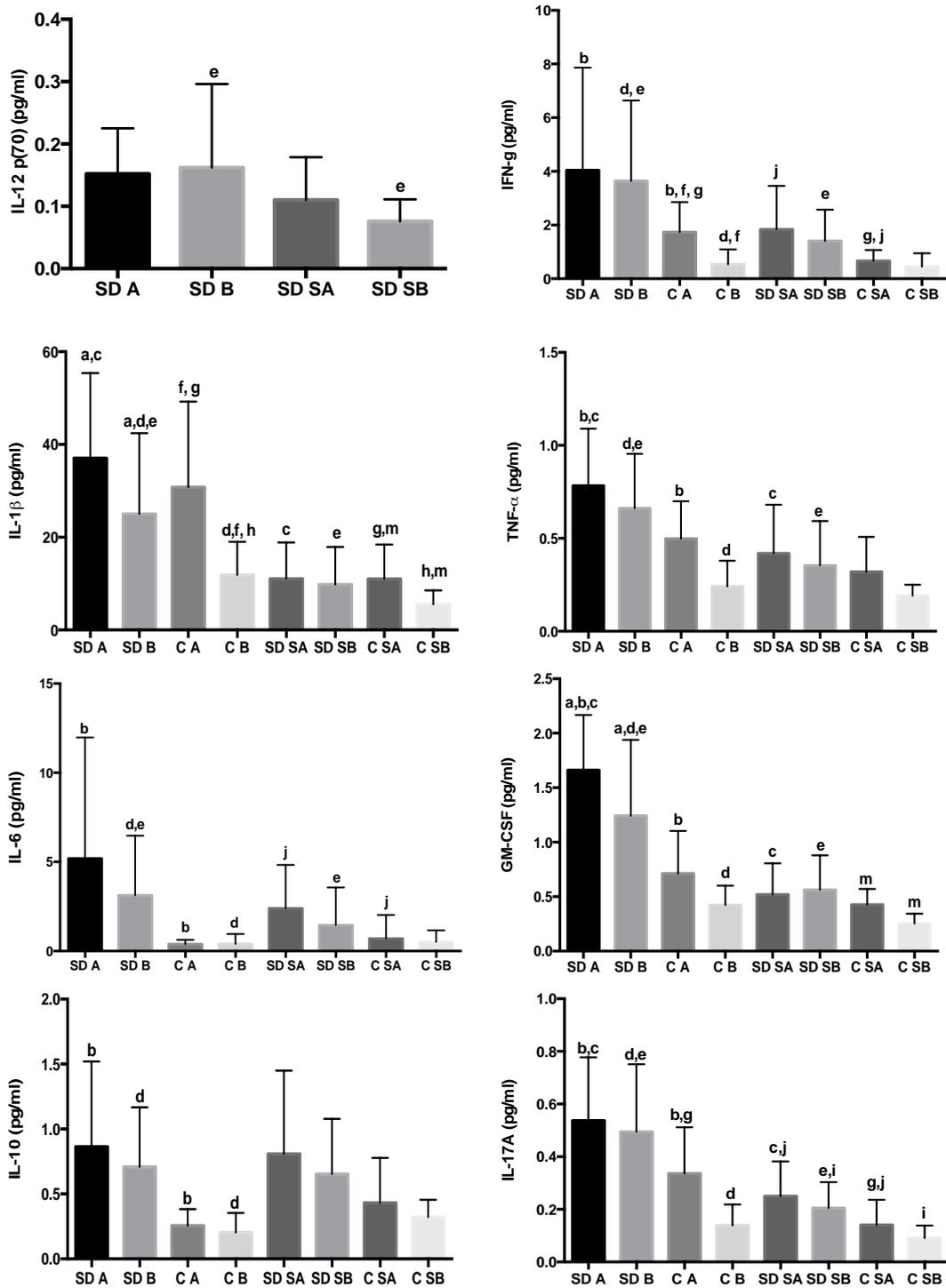


Figura 1 – Concentração das citocinas (pg/ml) IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 p(70), IL-17 $^A$ , GM-CSF, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nos sítios doentes (A: sítios doentes antes e B: sítios doentes depois do tratamento) nos grupos Síndrome de Down (SD) e grupo Controle (C). Letras iguais para representar diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). SDAxSDB (a); SDAxCA (b); SDAxSDSA (c); SDBxCB (d); SDBxSDSB (e); CAxCB (f); CAxCSA (g); CBxCB (h); SDSAxSDSB (i); SDSAxCSA (j); SDSBxCB (l) e CSAxCB (m). Diferenças nas concentrações de cada citocinas entre as diferentes comparações foram avaliadas pelo teste t de Student não pareado entre os grupos SD e C em cada período, e pelo teste t de Student pareado entre os diferentes períodos em cada grupo ( $*p < 0,05$ ). Colunas: concentração da citocina (pg/ml). Barras: desvio padrão.

**Tabela 1. Características Demográficas e as médias ( $\pm$ DP) dos parâmetros clínicos dos grupos estudados**

Características (Média $\pm$ DP)	Grupos		Valor de p*
	Síndrome de Down n=20	Controle n=10	
Idade (anos) ( $\pm$ )	31,91 ( $\pm$ 5,85)	41,25 ( $\pm$ 6,17)	0,001
Gênero (M/F)	12/8	6/4	NS
PS (mm) ( $\pm$ )			
Antes	2,27 ( $\pm$ 0,45)	2,29 ( $\pm$ 0,45)	NS
Depois	1,82 ( $\pm$ 0,44)	1,57 ( $\pm$ 0,21)	NS
	valor de p**	0,0012	NS
NI (mm) ( $\pm$ )			
Antes	2,33 ( $\pm$ 0,51)	2,47 ( $\pm$ 0,48)	NS
Depois	1,91 ( $\pm$ 0,51)	1,74 ( $\pm$ 0,34)	NS
	valor de p**	0,0084	0,0007
IPV (% faces)			
Antes	83,76 ( $\pm$ 11,33)	48,51 ( $\pm$ 19,54)	<0,0001
Depois	27,73 ( $\pm$ 13,33)	15,57 ( $\pm$ 10,15)	0,0158
	valor de p**	< 0,0001	0,0001
SM (% faces)			
Antes	44,20 ( $\pm$ 21,45)	25,57 ( $\pm$ 12,10)	0,0090
Depois	10,29( $\pm$ 11,80)	6,85 ( $\pm$ 7,40)	NS
	valor de p**	< 0,0001	0,0004
SS (% sítios)			
Antes	39,16 ( $\pm$ 20,75)	40,46 ( $\pm$ 21,10)	NS
Depois	12,46 ( $\pm$ 9,14)	8,76 ( $\pm$ 5,93)	NS
	valor de p**	< 0,0001	0,0002

PS: Profundidade de sondagem; NI: Nível de inserção; IPV: Índice de placa visível; SM: Sangramento marginal e SS: Sangramento à sondagem.

valor de p\* = Teste-t não pareado para analisar os grupos Síndrome de Down e Controle, exceto o gênero, o qual foi utilizado o teste Qui-quadrado.

valor de p\*\* = Teste-t pareado para analisar os grupos Síndrome de Down e Controle em diferentes períodos, exceto o gênero, o qual foi utilizado o teste Qui-quadrado.

**Tabela 2 – Parâmetros clínicos (mediana; mín-máx) em ambos os grupos com doença periodontal (antes e depois do tratamento) dos sítios coletados.**

	Parâmetros Clínicos	Grupos		valor de p*
		Síndrome de Down	Controle	
Sítios Doentes	PS (mm)			
	Antes	4.0 (4.0-5.0)	4.0 (4.0-5.0)	NS
	Depois	3.0 (1.0-6.0)	2.0 (1.0-3.0)	NS
		valor de p**	<0.0001	<0.0001
	NI(mm)			
	Antes	4.0 (4.0-6.0)	4.0 (4.0-8.0)	NS
Depois	3.0 (1.0-6.0)	2.0 (1.0-5.0)	NS	
	valor de p**	<0.0001	<0.0001	
Sítios Sadios	SS (S/N)			
	Antes	41/5	18/6	NS
	Depois	4/38	3/17	NS
		valor de p**	<0.0001	<0.0001
	PS (mm)			
	Antes	1.0 (1.0-2.0)	1.0 (1.0-2.0)	NS
Depois	1.0 (1.0-2.0)	1.0 (1.0-2.0)	NS	
	valor de p**	NS	NS	
Sítios Sadios	NI (mm)			
	Antes	1.0 (1.0-3.0)	1.0 (1.0-3.0)	NS
	Depois	1.0 (1.0-3.0)	1.0 (1.0-5.0)	NS
		valor de p**	NS	NS
	SS (S/N)			
	Antes	2/44	0/24	NS
Depois	0/42	0/20	NS	
	valor de p**	NS	NS	

PS: profundidade de sondagem; NI: nível de inserção; SS: sangramento à sondagem; NS: não significante  
*p*-value\* = teste de Mann-Whitney para avaliar diferença entre Síndrome de Down e Controle em cada período.  
*p*-value\*\* = teste de Wilcoxon test para avaliar cada grupo em diferentes períodos.

Tabela 3 – Volume de fluido gengival crevicular ( $\mu\text{L}$ ) e a concentração de citocinas ( $\text{pg/mL}$ ) encontradas nos sítios doentes dos grupos estudados antes e depois do tratamento

		Síndrome de Down	Controle	valor de $p^*$	
Sítios doente	Fluido gengival crevicular( $\mu\text{L}$ )	Antes	0,95 ( $\pm 0,40$ )	0,65 ( $\pm 0,38$ )	0,0373
		Depois	0,70 ( $\pm 0,31$ )	0,53 ( $\pm 0,30$ )	NS
		valor de $p^{**}$	0,0114	NS	
	IL-12 (p70) ( $\text{pg/mL}$ )	Antes	0,15 ( $\pm 0,07$ )	<OR	-
		Depois	0,16 ( $\pm 0,13$ )	<OR	-
		valor de $p^{**}$	NS	-	
	IFN- $\gamma$ ( $\text{pg/mL}$ )	Antes	4,04 ( $\pm 3,82$ )	1,74 ( $\pm 1,12$ )	0,0046
		Depois	3,64 ( $\pm 3,00$ )	0,54 ( $\pm 0,55$ )	<0,0001
		valor de $p^{**}$	NS	0,0213	
	IL-1 $\beta$ ( $\text{pg/mL}$ )	Antes	37,05 ( $\pm 18,32$ )	30,81 ( $\pm 18,43$ )	NS
		Depois	25,03 ( $\pm 17,39$ )	11,86 ( $\pm 7,17$ )	0,0493
		valor de $p^{**}$	0,0190	0,0241	
	TNF- $\alpha$ ( $\text{pg/mL}$ )	Antes	0,78 ( $\pm 0,31$ )	0,50 ( $\pm 0,20$ )	0,0073
		Depois	0,66 ( $\pm 0,29$ )	0,24 ( $\pm 0,14$ )	<0,0001
		valor de $p^{**}$	NS	NS	
IL-6 ( $\text{pg/mL}$ )	Antes	5,19 ( $\pm 6,79$ )	0,38 ( $\pm 0,25$ )	<0,0001	
	Depois	3,12 ( $\pm 3,35$ )	0,39 ( $\pm 0,56$ )	<0,0001	
	valor de $p^{**}$	NS	NS		
GM-CSF ( $\text{pg/mL}$ )	Antes	1,66 ( $\pm 0,50$ )	0,71 ( $\pm 0,39$ )	<0,0001	
	Depois	1,24 ( $\pm 0,70$ )	0,42 ( $\pm 0,18$ )	0,03	
	valor de $p^{**}$	0,04	NS		
IL-10 ( $\text{pg/mL}$ )	Antes	0,86 ( $\pm 0,66$ )	0,26 ( $\pm 0,13$ )	0,0052	
	Depois	0,71 ( $\pm 0,46$ )	0,20 ( $\pm 0,15$ )	0,0086	
	valor de $p^{**}$	NS	NS		
IL-17A ( $\text{pg/mL}$ )	Antes	0,54 ( $\pm 0,24$ )	0,34 ( $\pm 0,17$ )	0,03	
	Depois	0,49 ( $\pm 0,26$ )	0,14 ( $\pm 0,08$ )	0,07	
	valor de $p^{**}$	NS	NS		

$p$ -value\* = teste t de Student não pareado para avaliar diferença entre Síndrome de Down e Controle em cada período.  $p$ -value\*\* = teste t de Student pareado para avaliar cada grupo em diferentes períodos.

NS: não significante; OR: out of range

Tabela 4 – Volume de fluido gengival crevicular ( $\mu\text{L}$ ) e a concentração de citocinas ( $\text{pg/mL}$ ) encontradas nos sítios saudáveis dos grupos estudados antes e depois do tratamento

		Síndrome de Down	Controle	valor de $p^*$	
Sítios Saudáveis	Fluido gengival crevicular ( $\mu\text{L}$ )	Antes	0,28 ( $\pm 0,21$ )	0,25 ( $\pm 0,15$ )	<i>NS</i>
		Depois	0,29 ( $\pm 0,19$ )	0,25 ( $\pm 0,17$ )	<i>NS</i>
		valor de $p^{**}$	<i>NS</i>	<i>NS</i>	
	IL-12 (p70) ( $\text{pg/mL}$ )	Antes	0,11 ( $\pm 0,06$ )	<OR	-
		Depois	0,08 ( $\pm 0,03$ )	<OR	-
		valor de $p^{**}$	<i>NS</i>	-	
	IFN- $\gamma$ ( $\text{pg/mL}$ )	Antes	1,84 ( $\pm 1,62$ )	0,66 ( $\pm 0,40$ )	0,0192
		Depois	1,40 ( $\pm 1,17$ )	0,45 ( $\pm 0,50$ )	<i>NS</i>
		valor de $p^{**}$	<i>NS</i>	<i>NS</i>	
	IL-1 $\beta$ ( $\text{pg/mL}$ )	Antes	11,04 ( $\pm 7,85$ )	11,00 ( $\pm 7,43$ )	<i>NS</i>
		Depois	9,79 ( $\pm 8,11$ )	5,53 ( $\pm 3,01$ )	<i>NS</i>
		valor de $p^{**}$	<i>NS</i>	0,0114	
	TNF- $\alpha$ ( $\text{pg/mL}$ )	Antes	0,42 ( $\pm 0,26$ )	0,32 ( $\pm 0,19$ )	<i>NS</i>
		Depois	0,35 ( $\pm 0,24$ )	0,19 ( $\pm 0,06$ )	<i>NS</i>
valor de $p^{**}$		<i>NS</i>	<i>NS</i>		
IL-6 ( $\text{pg/mL}$ )	Antes	2,40 ( $\pm 2,43$ )	0,70 ( $\pm 1,32$ )	0,0018	
	Depois	1,45 ( $\pm 2,11$ )	0,51 ( $\pm 0,65$ )	<i>NS</i>	
	valor de $p^{**}$	<i>NS</i>	<i>NS</i>		
GM-CSF ( $\text{pg/mL}$ )	Antes	0,52 ( $\pm 0,29$ )	0,43 ( $\pm 0,14$ )	<i>NS</i>	
	Depois	0,56 ( $\pm 0,32$ )	0,25 ( $\pm 0,09$ )	<i>NS</i>	
	valor de $p^{**}$	<i>NS</i>	0,009		
IL-10 ( $\text{pg/mL}$ )	Antes	0,81 ( $\pm 0,64$ )	0,43 ( $\pm 0,35$ )	<i>NS</i>	
	Depois	0,65 ( $\pm 0,43$ )	0,32 ( $\pm 0,13$ )	<i>NS</i>	
	valor de $p^{**}$	<i>NS</i>	<i>NS</i>		
IL-17A ( $\text{pg/mL}$ )	Antes	0,25 ( $\pm 0,13$ )	0,14 ( $\pm 0,1$ )	0,04	
	Depois	0,20 ( $\pm 0,1$ )	0,10 ( $\pm 0,05$ )	0,02	
	valor de $p^{**}$	<i>NS</i>	<i>NS</i>		

$p$ -value\* = teste t de Student não pareado para avaliar diferença entre Síndrome de Down e Controle em cada período.

$p$ -value\*\* = teste t de Student pareado para avaliar cada grupo em diferentes períodos.

*NS*: não significante; OR: out of range

Tabela 5 – Comparação entre os sítios doentes e sadios para volume de fluido gengival crevicular ( $\mu\text{L}$ ) e concentração de citocinas ( $\text{pg/mL}$ ) de acordo com o grupo e período de análise

		Síndrome de Down			controle		
		doente	sadio	valor de p*	doente	sadio	valor de p*
Fluido gengival crevicular( $\mu\text{L}$ )	Antes	0,95 ( $\pm 0,40$ )	0,28 ( $\pm 0,21$ )	<0,0001	0,65 ( $\pm 0,38$ )	0,25 ( $\pm 0,15$ )	0,0038
	Depois	0,70 ( $\pm 0,31$ )	0,29 ( $\pm 0,19$ )	<0,0001	0,53 ( $\pm 0,30$ )	0,25 ( $\pm 0,17$ )	NS
IL-12 (p70) (pg/mL)	Antes	0,15 ( $\pm 0,07$ )	0,11 ( $\pm 0,06$ )	NS	<OR	<OR	-
	Depois	0,16 ( $\pm 0,13$ )	0,08 ( $\pm 0,03$ )	0,022	<OR	<OR	-
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	Antes	4,04 ( $\pm 3,82$ )	1,84 ( $\pm 1,62$ )	0,006	1,74 ( $\pm 1,12$ )	0,66 ( $\pm 0,40$ )	0,01
	Depois	3,64 ( $\pm 3,00$ )	1,40 ( $\pm 1,17$ )	0,01	0,54 ( $\pm 0,55$ )	0,45 ( $\pm 0,50$ )	NS
IL-1 $\beta$ (pg/mL)	Antes	37,05( $\pm 18,32$ )	11,04( $\pm 7,85$ )	<0,0001	30,81( $\pm 18,43$ )	11,00( $\pm 7,43$ )	0,0035
	Depois	25,03( $\pm 17,39$ )	9,79 ( $\pm 8,11$ )	0,0008	11,86 ( $\pm 7,17$ )	5,53 ( $\pm 3,01$ )	0,037
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	Antes	0,78 ( $\pm 0,31$ )	0,42 ( $\pm 0,26$ )	<0,0001	0,50 ( $\pm 0,20$ )	0,32 ( $\pm 0,19$ )	NS
	Depois	0,66 ( $\pm 0,29$ )	0,35 ( $\pm 0,24$ )	0,0001	0,24 ( $\pm 0,14$ )	0,19 ( $\pm 0,06$ )	NS
IL-6 (pg/mL)	Antes	5,19 ( $\pm 6,79$ )	2,40 ( $\pm 2,43$ )	NS	0,38 ( $\pm 0,25$ )	0,70 ( $\pm 1,32$ )	NS
	Depois	3,12 ( $\pm 3,35$ )	1,45 ( $\pm 2,11$ )	0,023	0,39 ( $\pm 0,56$ )	0,51 ( $\pm 0,65$ )	NS
GM-CSF (pg/mL)	Antes	1,66 ( $\pm 0,50$ )	0,52 ( $\pm 0,29$ )	<0,0001	0,71 ( $\pm 0,39$ )	0,43 ( $\pm 0,14$ )	NS
	Depois	1,24 ( $\pm 0,70$ )	0,56 ( $\pm 0,32$ )	0,001	0,42 ( $\pm 0,18$ )	0,25 ( $\pm 0,09$ )	NS
IL-10 (pg/mL)	Antes	0,86 ( $\pm 0,66$ )	0,81 ( $\pm 0,64$ )	NS	0,26 ( $\pm 0,13$ )	0,43 ( $\pm 0,35$ )	NS
	Depois	0,71 ( $\pm 0,46$ )	0,65 ( $\pm 0,43$ )	NS	0,20 ( $\pm 0,15$ )	0,32 ( $\pm 0,13$ )	NS
IL-17A (pg/mL)	Antes	0,54 ( $\pm 0,24$ )	0,25 ( $\pm 0,13$ )	0,0002	0,34 ( $\pm 0,17$ )	0,14 ( $\pm 0,1$ )	0,01
	Depois	0,49 ( $\pm 0,26$ )	0,20 ( $\pm 0,1$ )	0,0022	0,14 ( $\pm 0,08$ )	0,10 ( $\pm 0,05$ )	NS

p-value\* = teste t de Student não pareado para avaliar os sítios doentes e sadios em cada grupo em diferentes períodos.

NS: não significante; OR: out of range

Tabela 6 – Coeficiente de correlação (valor de p) comparações das quantidades das citocinas transformadas em log10 entre os sítios doentes e saudáveis dos grupos estudados.

Citocinas	Síndrome de Down				Controle			
	doente antes x depois	sadio antes x depois	antes doente x sadio	depois doente x sadio	doente antes x depois	sadio antes x depois	antes doente x sadio	depois doente x sadio
IL-12 (p70)	0,45 (0,08)	0,16 (0,59)	0,034 (0,91)	0,09 (0,77)	-	-	-	-
IFN- $\gamma$	0,65 (0,01)	0,22 (0,86)	-0,02 (0,96)	0,16 (0,75)	-0,28 (0,55)	0,89 (0,30)	0,12 (0,78)	-0,93 (0,06)
IL-1 $\beta$	0,32 (0,15)	0,01 (0,74)	0,38 (0,07)	0,50 (0,02)	0,08 (0,85)	0,64 (0,09)	0,14 (0,67)	0,68 (0,06)
TNF- $\alpha$	0,36 (0,10)	0,18 (0,48)	0,25 (0,26)	0,38 (0,11)	-0,63 (0,13)	0,47 (0,43)	0,01 (0,98)	0,78 (0,21)
IL-6	0,29 (0,19)	0,20 (0,42)	0,45 (0,03)	0,39 (0,10)	0,32 (0,44)	0,89 (0,04)	0,44 (0,24)	0,48 (0,41)
GM-CSF	0,16 (0,52)	0,06 (0,82)	-0,11 (0,64)	0,44 (0,09)	-0,59 (0,60)	0,82 (0,18)	-0,31 (0,55)	0,96 (0,17)
IL-10	0,57 (0,01)	0,10 (0,68)	0,09 (0,69)	0,22 (0,35)	0,49 (0,27)	0,74 (0,26)	0,74 (0,02)	0,57 (0,43)
IL-17A	0,43 (0,09)	0,73 (0,03)	0,34 (0,22)	0,58 (0,08)	-0,29 (0,64)	-0,05 (0,94)	0,00 (0,99)	-0,99 (0,01)

Concentração das citocinas transformadas em log10. Distribuição normal para todas as citocinas, assim foi aplicada a correlação de Person ( $p < 0,05$ ). Em negrito, estão os valores estatisticamente significantes.



## Capítulo 3

# Proteoma salivar dos indivíduos com Síndrome de Down com doença periodontal antes e depois do tratamento periodontal não-cirúrgico\*

Marcia H. Tanaka<sup>1,2,3</sup>

Thamiris O. Rodrigues<sup>1</sup>

Yizhi Xiao<sup>3</sup>

Eduardo B. Moffa<sup>3</sup>

Raquel M. Scarel-Caminaga<sup>2</sup>

Walter L. Siqueira<sup>3</sup>

Elisa M. A. Giro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Orthodontics and Pediatric Dentistry, School of Dentistry, UNESP – Univ Estadual Paulista, Araraquara, SP, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup>Department of Morphology, School of Dentistry, UNESP – Univ Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, SP, Brazil

<sup>3</sup>Schulic School of Medicine & Dentistry, University of Western Ontario, London, Canada

***Proteoma salivar dos indivíduos com Síndrome de Down com doença periodontal antes e depois do tratamento periodontal não-cirúrgico\****

Marcia H. Tanaka<sup>1,2,3</sup>; Thamiris O. Rodrigues<sup>1</sup>; Yizhi Xiao<sup>3</sup>; Eduardo B. Moffa<sup>3</sup>; Raquel M. Scarel-Caminaga<sup>2</sup>; Walter L. Siqueira<sup>3</sup>; Elisa M. A. Giro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Orthodontics and Pediatric Dentistry, School of Dentistry, UNESP – Univ Estadual Paulista, Araraquara, SP, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup> Department of Morphology, School of Dentistry, UNESP – Univ Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, SP, Brazil

<sup>3</sup> Schulic School of Medicine & Dentistry, University of Western Ontario, London, Canada

Corresponding Author:

Elisa Maria Aparecida Giro

Department of Orthodontics and Pediatric Dentistry, Araraquara School of Dentistry, UNESP – Univ Estadual Paulista

Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, Brazil

CEP- 14801-903

Tel.: +55 16 33016336

Fax: +55 16 33016329

e-mail: [egiro@foar.unesp.br](mailto:egiro@foar.unesp.br)

## **Resumo**

A prevalência de Doença Periodontal (DP) nos indivíduos com Síndrome de Down (SD) é muito maior em comparação com indivíduos cromossomicamente normais. Uma das formas para se avaliar a progressão desta doença é a utilização da saliva. Até o momento, não há consenso na literatura sobre a influência das alterações na composição da saliva e nos altos índices de doença periodontal em indivíduos SD. Portanto, o objetivo deste trabalho é identificar as proteínas salivares pela técnica de espectrofotometria de massa e comparar os níveis destas proteínas salivares em indivíduos com SD e em indivíduos normais, ambos com doença periodontal, bem como, avaliar os efeitos do tratamento periodontal sobre esses níveis. Foram selecionados para este estudo um total de 30 indivíduos, os quais foram divididos nos seguintes grupos: Grupo 1- Síndrome de Down com Doença Periodontal (SD) (n=20) e Grupo 2- Não-sindrômicos com Doença Periodontal (Controle) (n=10), antes (I) e depois do tratamento periodontal não-cirúrgico (F). Menor fluxo salivar foi observado em indivíduos com SD em comparação com o grupo Controle mesmo depois do tratamento periodontal. Não foram observadas diferenças no pH salivar em ambos os grupos e períodos analisados. Num total de 69 diferentes proteínas identificadas 53 proteínas foram encontradas no grupo SDI, 48 proteínas no grupo SDF, 55 proteínas no grupo CI e 48 proteínas no grupo CF. Quatro proteínas foram específicas para o grupo SDI, duas proteínas para o grupo SDF, cinco proteínas para o grupo CI e apenas uma proteína para o grupo CF. Porém, a DP não pode ser quantificada por apenas um marcador protéico, considerando que o processo inflamatório tem caráter multifatorial e não tem uma progressão padronizada para todos os pacientes. Conclui-se que tais biomarcadores podem ser considerados desde que sejam utilizados num conjunto de biomarcadores para monitorar a evolução e progressão da DP que acomete os pacientes com SD, assim, podem melhorar e individualizar o tratamento periodontal para cada paciente.

**Palavra-Chave:** Síndrome de Down, Proteínas e Peptídeos Salivares, Periodontite

## **Abstract**

Subjects with Down syndrome (DS) have a high prevalence of periodontal disease (PD). Saliva is one of the major human fluids and may be useful to monitor a patient's current periodontal status. So, the aim of this study is to quantify the proteome composition of the saliva in individuals with DS and normal subjects, both with PD, in response to non-surgical periodontal therapy. Thirty individuals were divided into the following groups: Group 1 - Down syndrome with Periodontal disease (DS) (n=20) and Group 2 - Non-syndromic with Periodontal Disease (Control) (n=10) before (I) and after therapy (F). Saliva proteins were subjected to liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry for identification, characterization and quantification. No statistically significant difference was observed in the salivary pH in both groups even after periodontal therapy. The salivary flow rate of the Downs's syndrome subjects was significantly lower ( $p < 0.05$ ) than that of control group, in both periods. Sixty-nine proteins were identified; 53 proteins were detected in the DSI group, 48 in the DSF group, 55 in the CI group and 48 in the CF group. Four proteins were exclusively detected at DSI group, 2 proteins at DSF group, 5 proteins at CI group and only one protein at CF group. Some of the proteins, specially the immune response proteins, were more abundant in the Down syndrome individuals than control patients, after the periodontal therapy. However, a single marker protein can't quantify the progression of PD, whereas the inflammatory process is complex and most likely varies from individual to individual. It is

suggested that the set of biomarkers can be used to monitoring the progression of PD in Down syndrome patients and can improve and customize periodontal therapy for each patient.

**Key Words:** Down syndrome, Periodontitis, Salivary Proteins and Peptides

## **Introdução**

A saliva total é uma solução aquosa hipotônica complexa que inclui a secreção de glândulas salivares maiores e menores, fluido crevicular, secreções brônquicas, plasma, células epiteliais descamadas e bactérias<sup>60</sup>. Para a manutenção da saúde dos tecidos bucais contem proteínas, peptídeos, enzimas, fatores de crescimento e outros componentes<sup>59</sup>.

Como a saliva total é formada por constituintes originários de fontes local e sistêmica e sua coleta é realizada por métodos não invasivos e de fácil execução<sup>174</sup>, muitos de seus componentes tem sido pesquisados e estão contribuindo no diagnóstico de doenças sistêmicas, como o câncer de mama<sup>20, 174</sup>, *Diabetes Mellitus*<sup>115</sup>, Síndrome de Sjögren<sup>7, 174</sup> e Fibrose Cística<sup>89</sup>, bem como de algumas patologias bucais, como líquen plano<sup>169</sup>, câncer bucal<sup>109, 174</sup>, incluindo a cárie dentária<sup>91, 94</sup> e a doença periodontal<sup>19, 59, 64, 75, 114, 137, 166</sup>.

A prevalência de doença periodontal (DP) em adolescentes com Síndrome de Down (SD) é de 30% a 40%, sendo que em indivíduos com aproximadamente 30 anos a prevalência aumenta para cerca de 60 a 100%<sup>73, 120</sup>. Indivíduos com SD apresentam uma destruição periodontal severa quando comparados com indivíduos normais com o mesmo nível de higiene bucal<sup>29</sup>. Anormalidades no sistema imune desses indivíduos, como desbalanço nas subpopulações de linfócitos T e menor atividade de fagocitose por leucócitos resultando em uma redução na quimiotaxia de neutrófilos<sup>9, 14, 78, 88</sup>, podem contribuir para o desenvolvimento da DP, muito frequente em indivíduos com SD comparado com indivíduos saudáveis<sup>10, 121</sup>. Na saliva foram encontradas algumas alterações no metabolismo do ducto e/ou das células acinares das glândulas salivares, que reflete em maiores concentrações de sódio, proteína total e em maior capacidade tampão<sup>140</sup>. Além disso, os SD apresentam menor concentração de potássio, menor fluxo salivar e reduzida atividade das enzimas amilase e peroxidase, do que os indivíduos normais<sup>140</sup>. Contudo, não há consenso na literatura sobre essas alterações na composição da saliva e com relação a sua influência sobre os altos índices de doença periodontal nos indivíduos SD<sup>12, 22, 29, 30, 121, 138-140, 165, 170</sup>.

Apesar da saliva possuir biomarcadores tanto locais quanto sistêmicos da doença periodontal<sup>28, 59, 60, 64, 114, 125, 136, 174</sup> e de existirem vários estudos avaliando os componentes protéicos da saliva<sup>70, 75, 137, 166</sup>, a composição proteica da saliva, assim como, a sua diferença de abundância antes e depois do tratamento periodontal. em indivíduos com SD com DP ainda está incerta., Portanto, o objetivo deste trabalho é identificar as proteínas salivares e comparar os níveis destas proteínas em indivíduos com SD e indivíduos normais, ambos com doença periodontal, bem como, avaliar os efeitos do tratamento periodontal sobre esses níveis.

## **Materias e Métodos**

### **Delineamento do estudo e seleção da casuística**

Os indivíduos com SD foram selecionados em Associações de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAEs) de Araraquara e região (São Carlos, Catanduva, Matão e Taquaritinga), Associação de Síndrome de Down de

São José dos Campos (ASIN) e os não-sindrômicos, nas Clínicas de Periodontia e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr –UNESP). Todos os indivíduos selecionados para compor a casuística deste estudo tiveram seu histórico médico e odontológico avaliados. Os indivíduos com Síndrome de Down e indivíduos não sindrômicos selecionados foram de ambos os gêneros e qualquer etnia, apresentando DP.

Foram excluídos indivíduos sem autorização do cardiologista para realização de procedimento odontológico invasivo, com história de antibioticoterapia, que fizeram uso de antiinflamatórios e/ ou de imunossupressores nos últimos 3 meses, com história de tratamento periodontal nos últimos 6 meses; alteração sistêmica ou alguma doença infecciosa, gestantes, lactantes e fumantes. Foram excluídos também os indivíduos com SD do tipo mosaico.

Após explicar de maneira acessível, os objetivos da pesquisa aos indivíduos selecionados e seus responsáveis, estes foram convidados a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) aprovado pelo Comitê de Ética em Humanos da FOAr (número do protocolo 62/11- Anexo).

### **Parâmetros clínicos**

Foram selecionados para este estudo um total de 30 indivíduos, os quais foram divididos nos seguintes grupos: Grupo 1- Síndrome de Down com Doença Periodontal (SD) (n=20) e Grupo 2- Não-sindrômicos com Doença Periodontal (Controle) (n=10).

Foram considerados com doença periodontal aqueles pacientes com profundidade de sondagem (PS)  $\geq 4$ mm, presença de sangramento à sondagem (SS) e nível de inserção (NI)  $> 3$ mm em pelo menos oito sítios ou mais não adjacentes <sup>152</sup>.

Os participantes desta pesquisa foram submetidos a um exame periodontal realizado por meio de secagem prévia da região com jato de ar, e uso de uma sonda periodontal milimetrada tipo Williams (Trinity-Campo Mourão, Brazil) espelho plano e pinça clínica, devidamente esterilizados. Este exame foi realizado por um único examinador previamente calibrado e consistiu das seguintes avaliações: Índice de placa visível (IPV) <sup>3</sup>, Profundidade de sondagem (PS) <sup>95</sup>, Sangramento marginal (SM), sangramento à sondagem (SS) e Nível de inserção (NI)<sup>95</sup>.

As análises foram realizadas em 6 sítios por dente: disto-vestibular, vestibular, mesio-vestibular, disto-lingual, lingual e mesio-lingual nos parâmetros PS, NI e SS. Para os outros parâmetros clínicos como IPV e SM foram realizadas em 4 faces por dente: vestibular, lingual, mesial e distal.

Uma semana após o exame clínico periodontal foi realizada a coleta da saliva e foi iniciado o tratamento periodontal não-cirúrgico (raspagem, alisamento e polimento supragengival).

Todos os indivíduos participantes do estudo receberam tratamento periodontal básico, que foi realizado por um único cirurgião-dentista especialista em Periodontia, e receberam orientação de higiene bucal, sendo esta reforçada a cada consulta. Posteriormente à raspagem supragengival e contando com a colaboração quanto à higienização bucal, foi realizada a raspagem e alisamento radicular subgengival. Após o término do tratamento periodontal, a orientação de higiene bucal foi reforçado nas consultas de manutenção que foram agendadas a cada 15 dias, até totalizar 45 dias. Em seguida, foi realizada nova coleta da saliva e exame periodontal.

### **Coleta de Saliva para Análise das Proteínas Salivares**

Para evitar interferências devido à sondagem, as coletas da saliva foram realizadas uma semana após o exame clínico periodontal e 45 dias após o tratamento periodontal básico.

A saliva foi coletada entre 9 e 11 horas da manhã para minimizar o efeito do ciclo circadiano. Os participantes da pesquisa estavam em jejum por um período mínimo de 2 horas. A coleta foi realizada aplicando-se ligeira sucção com o auxílio de um sugador à vácuo portátil da marca ASPIRAMAX MA-520 12V<sup>®</sup> (NS Indústria De Aparelhos Médicos Ltda, São Paulo, SP, Brasil) sendo desprezada a saliva dos primeiros 10 segundos, e então foi realizada a coleta por 5 minutos para a mensuração do fluxo salivar. Após este período, a amostra foi coletada até se atingir 3,5 mL de saliva. Durante o período da coleta, o paciente estava confortavelmente sentado.

O pH salivar foi mensurado utilizando-se um pHmetro portátil digital (Qualxtron modelo 8010, São Paulo, SP, Brasil). Antes de iniciar as medições de pH, o pHmetro foi calibrado com soluções padrão de pH nos valores de 7,00 e 4,00.

A saliva foi mantida em gelo seco, transportada até o laboratório, separada em alíquotas, e armazenada a -80°C para posterior análise.

#### **Análise da Saliva**

A concentração de proteína total da saliva dos grupos estudados (SDI= Síndrome de Down inicial; SDF= Síndrome de Down 45 dias após o tratamento; CI= Controle inicial e CF= Controle 45 dias após o tratamento) foi estimada pela técnica do ácido bicinconínico (mBCA - Thermo Fisher Pierce, Rockford, IL, USA). Foi realizado um pool com quantidades iguais de proteínas de cada paciente para que totalizasse 20µg para cada grupo estudado. Em seguida, as amostras foram secas com a ajuda de um aparelho evaporador rotacional (Vacufuge<sup>™</sup>, Eppendorf AG, Barkhausenweg, HH, DEU) por 2 horas. Foi adicionado, 50 µL da solução 4M urea+10mM DTT (dithiothreitol)+50mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> com pH=7,8 e incubado por 1 hora a temperatura ambiente. A digestão foi realizada adicionando-se 150 µL de 50mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> com pH=7,8 e 5% em peso de tripsina (Promega, Madison, WI, USA) para os 4 grupos. Para otimizar a digestão, as amostras foram incubadas por um período de 24 horas a 37°C em banho maria.

#### **Cromatografia Líquida Tandem Espectrometria de Massas (LTQ-Velos, Thermo Scientific)**

A separação dos peptídeos e as análises espectrométricas foram feitas utilizando nano-HPLC Proxeon (Thermo Scientific, Sao Jose, CA, EUA), a qual permite cromatografia líquida *in-line* com a coluna capilar. Esta coluna era de 75 mm x 610 cm (Pico Tip<sup>™</sup> EMITTER, New Objective, Woburn, MA) preenchida com resina C18 com poros de 5 µm de diâmetro e 200 Å (Michrom BioResources, Auburn, CA), acoplado ao espectrômetro de massas (LTQ- Velos, Thermo Scientific, Sao Jose, CA, EUA), usando ionização por *electrospray* em modo de busca, na faixa de valores m/z 390-2000 em tandem MS/MS.

Quantidades iguais de todas as amostras já secas foram ressuspensas em 20 µL de ácido fórmico 1% e então submetidas a nLC-ESI-MS/MS. O HPLC de fase reversa *nanoflow* foi desenvolvido com um gradiente linear de 85 minutos variando de 0 a 100% de solvente B (ácido fórmico 0,1% em acetonitrila), num fluxo de

200 nL/min, com pressão máxima de 280 bar. A voltagem e temperatura do capilar de transferência de íons foram 1,8 kV e 250 °C, respectivamente. Cada espectro (MS) obtido foi seguido por seleção sequencial automatizada de sete peptídeos para CID, com exclusão dinâmica dos íons previamente selecionados.

### **Teste Imunoenzimático (ELISA)**

Este teste foi realizado para validar a diferença do nível de proteína identificada tanto da amilase quanto da serum albumin na quantificação da espectrometria de massa. Para esta técnica utilizamos as proteínas amilase e serum albumin, proteínas bem características e funcionais na cavidade oral. A microplaca (96 poços) para o teste foi preparada com 100 µL de amostras dos 4 grupos e os padrões, incubada a 37 °C por 1 hora. Em seguida, a microplaca foi lavada 3 vezes com 250 µL de solução salina tamponada (250µL Tris Buffered Saline - TBS) por poço e 200 µL TBST contendo 3% de leite (solução bloqueadora), até cobrir os sítios em cada poço e a placa foi incubada a 4°C overnight. O anticorpo primário para amilase foi o anti-alpha amylase (500µL, 1:1000 diluição, PA 1- 29115, Pierce Biotechnology, IL, USA) e para a serum albumin foi o anti-serum albumin ( 20 µL, 1:500 diluição, Cell Biolabs Inc., CA, USA) diluído em TBST com 1% de leite por 37°C por 1,5 h, lavados 3 vezes e, em seguida, incubados com o anticorpo secundário, o horse radish peroxidase (HRP) ligado ao anti-MOUSE IgG (H&L) antibody Peroxidase conjugado (100µL, 1:5000 diluição, Rockland, PA, USA) com TBST com 1% de leite. Após a incubação em ambiente escuro por 1 hora em temperatura ambiente foi adicionado o OPD (o-phenyldiamine dihydrochloride, Sigma-Aldrich, MO, USA) e o produto foi analisado no espectrofotômetro num comprimento de onda de 490nm. O experimento foi realizado em triplicata.

### **Análise Estatística**

Para analisar a normalidade dos dados demográficos e clínicos foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. O programa utilizado para as análises os dados foi GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Os dados foram categorizados em “antes” e “45 dias após o tratamento”. Os dados demográficos e clínicos tiveram uma distribuição normal, assim, foi aplicado o teste-t não pareado para analisar as diferenças entre os grupos, e o teste-t pareado para analisar os diferentes períodos em ambos os grupos. Para a variável gênero o teste Qui-quadrado foi utilizado. O nível de significância utilizada foi de 0,05.

Os dados de MS/MS foram confrontados com o banco de dados de proteínas humanas (UniProt e TrEMBL, Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland, <http://ca.expasy.org/sprot>) usando o algoritmo SEQUEST no software Proteome Discoverer 1.3 (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA). Os filtros utilizados no SEQUEST como critério aplicado aos espectros MS/MS foram: 1.5; 2.5; 3.1; 3.1; 4.5 para o Xcorr aplicado em adição ao filtro Percolator. Os resultados das buscas foram filtrados a uma taxa de falsas descobertas de 1% utilizando uma estratégia de pesquisa de banco de dados inversa.

Para análise proteômica quantitativa, três arquivos a partir dos dados –MS de cada grupo foram analisados usando o software SIEVE (Versão 2.0 *Thermo Scientific*, San Jose, CA, EUA). O processamento dos sinais foi realizado num total de 12 arquivos MS brutos. O fluxo de trabalho experimental do SIEVE foi definido como controle de comparação para as análises, onde uma classe de amostras é comparada com uma ou mais diferentes classes de amostras. Neste estudo, as amostras Controle Inicial (CI) foram comparadas com as amostras Síndrome de Down Inicial (SDI), Síndrome de Down Final (SDF) e Controle Final (CF). As amostras

do SDI, também, foram comparadas com SDF e CF. Para a etapa de alinhamento, um único arquivo MS pertencente ao grupo padrão para essa comparação foi selecionado como o arquivo de referência e todos os outros processos foram ajustados para gerar a melhor correlação a este. Após o alinhamento, os processos de detecção e integração (ou *framing*) foram realizados utilizando o nível de dados MS com um recurso denominado "quadros de MS2 Scans". Com este tipo de enquadramento (*framing*), somente os valores MS com razão massa-carga ( $m/z$ ) associados às análises MS2 foram utilizados. Quaisquer medições de  $m/z$  que não estivessem presentes em MS2 foram ignoradas. O software gerou então os quadros (*frames*), e a partir da integração foram feitas as análises estatísticas para cada quadro .

Em seguida as sequências de peptídeos obtidas a partir da pesquisa de banco de dados usando o Algoritmo SEQUEST no *Proteome Discoverer* 1.3 foram importadas para o SIEVE. O filtro Percolator foi aplicada às sequências peptídicas durante a importação, eliminando todas as sequências com q-value maiores que 1% (taxa de falsa detecção). Os peptídeos foram agrupados em proteínas e então foi calculada a relação de proteínas e o valor de p. Foi utilizada uma média ponderada das intensidades de peptídeos para o cálculo das proteínas. Desta forma, os peptídeos com menor variação em suas medições de intensidade têm maior peso na taxa global de proteínas. Isto é feito para diminuir a variância das quantidades de proteína com base no nível de variação dos peptídeos que compõem cada proteína. Somente proteínas observadas nos 4 grupos foram quantificadas. O Grupo "padrão" (CI ou SDI), como já dito, foi utilizado como grupo padrão/controle e os outros dois grupos foram comparados com este. A abundância relativa de uma proteína individual a partir do nível do Grupo "padrão" foi considerada significativamente diferente quando os valores observados foram, 0,75 para diminuição e 1,25 para aumento de abundância. Além disso, foi considerado o valor de  $p < 0.05$ , como descrito.

## **Resultados**

### **Características Demográficas e dados clínicos**

As características demográficas e os dados clínicos estão presentes na tabela 1. O grupo Controle apresenta uma idade média maior do que no grupo Síndrome de Down ( $p=0,001$ ). Em relação ao gênero, não foi observada nenhuma diferença estatística. Nota-se uma diferença no fluxo salivar dos pacientes com Síndrome de Down tanto antes quanto 45 dias depois do tratamento periodontal em comparação com o Controle ( $p=0,0254$  e  $p=0,0010$ , respectivamente). Mas para o pH não foi observada nenhuma diferença no antes e depois do tratamento. Parâmetros clínicos como profundidade de sondagem (PS) entre os grupos SD e Controle não foram observadas nenhuma diferenças estatísticas entre os momentos antes e 45 dias após o tratamento periodontal. Porém, observa-se uma redução da PS no grupo SD depois do tratamento ( $p=0.0012$ ). O nível de inserção (NI) também não apresenta diferença estatística entre os grupos, mas apresenta diferença estatística entre os períodos tanto no grupo SD quanto no grupo Controle ( $p=0,0084$  e  $p=0,0007$ , respectivamente). O índice de placa foi estatisticamente diferente em todos os momentos e em todas as comparações entre os grupos, reduzindo significativamente com o tratamento. Para o parâmetro sangramento marginal, não foi observada diferença na comparação 45 dias após o tratamento entre o grupo SD e Controle. O sangramento à sondagem não mostrou diferença entre os grupos, porém para ambos os grupos, houve redução significativa do SS após o tratamento ( $p < 0,0001$  e  $p=0,0002$ , respectivamente).

## Identificação das Proteínas

Após a coleta da saliva, quantificação das proteínas e tripsinização, quantidades iguais de peptídeos foram submetidos ao nanoflow LC-ESI-MS/MS. O cromatograma base-pico da cromatografia de fase reversa monitorada pelo espectrômetro de massas representa a intensidade de todos os íons de peptídeos da amostra em uma única corrida. Para cada grupo foram realizadas no mínimo 3 corridas, ou seja, 3 cromatogramas de cada grupo deveriam ter espectros parecidos para serem considerados bons e então utilizados para as quantificações (Figura 1). Os proteomas dos diferentes grupos mostraram uma consistente eluição de proteínas/peptídeos no intervalo de tempo que vai dos 15 aos 58 minutos de corrida. Os peptídeos encontrados foram identificados através de busca no banco de dados utilizando o algoritmo SEQUEST.

Foram encontradas 69 proteínas, sendo que todas foram identificadas por no mínimo dois peptídeos e apareceram em pelo menos três corridas de cada grupo. Dessas 34 proteínas eram semelhantes entre todos os grupos estudados (Tabela 2). Para os grupos SDI, SDF e CI e para os grupos SDI, SDF e CF foram encontradas 3 proteínas em comum; nos grupos CI, CF e SDI e nos grupos CI, CF e SDF foram encontradas 2 proteínas em comum. Para os grupos SDI e SDF foram 4 proteínas; nos grupos CI e CF foram 6 proteínas; nos grupos SDI e CI foram 3 proteínas e nenhuma proteína em comum para os grupos SDF e CF, SDI e CF ; e SDF e CI. Quatro proteínas foram específicas para o grupo SDI (Cathepsin D, Ig kappa chain V-III region HAA, Phosphatidylethanolamine binding protein 1 e Isoform 3 of Q9UGM3), duas proteínas para o grupo SDF (Fibrinogen beta chain e Vitamin D-binding protein), cinco proteínas para o grupo CI (Cystatin D, Ig kappa chain V-I region HK120, IGL@ protein, Immunoglobulin J chain e Lactoferrin) e apenas uma proteína para o grupo CF (Myeloperoxidase) (Figura 2 e Tabela 2).

Num total de 69 diferentes proteínas identificadas, quatro são antimicrobianas, 2 de coagulação, 2 de diferenciação celular, 6 de interação molecular, 2 de interação molecular desconhecida, 5 de interação proteína/proteína, 3 de lubrificação, 10 de metabolismo, 2 de organização celular, 24 da resposta imune e finalmente 9 de transporte (Tabela 2). Cinquenta e três proteínas foram encontradas no grupo SDI, 48 no grupo SDF, 55 no grupo CI e 48 no grupo CF (Tabela 2 e Figura 3).

### Razão de abundância de proteínas na quantificação relativa da saliva

Das 69 proteínas encontradas apenas 52 proteínas tiveram uma razão de abundância na quantificação relativa entre os grupos estudados e o número de vezes que cada proteína identificada foi encontrada durante as 3 corridas na espectrometria de massa (Tabela 3 e 4). Dezesete proteínas encontradas no grupo SDI foram mais abundantes em comparação ao grupo CI ( $p < 0,05$ ). A maioria das proteínas (5 proteínas) mais abundantes neste grupo eram relacionadas ao transporte, seguido pela resposta imune (3 proteínas), metabolismo (2 proteínas), diferenciação celular (2 proteínas), interação molecular (2 proteínas), lubrificação (1 proteína), ação antimicrobiana (1 proteína) e interação molecular desconhecida (1 proteína). Somente 3 proteínas foram menos abundantes no grupo SDI em comparação ao grupo CI, estas foram uma proteína antimicrobiana (Cystatin S), uma de interação molecular (Submaxillary gland androgen regulated protein 3 homolog B) e uma de organização celular (Small proline rich protein 3) ( $p < 0,05$ ). Vinte e nove proteínas foram menos abundantes no grupo CF em

comparação ao grupo CI, sendo quatro antimicrobianas, uma de diferenciação celular, uma de interação molecular, uma de interação molecular desconhecida, 3 de interação proteína/proteína, 2 de lubrificação, 5 de metabolismo, 2 de organização celular, 5 de resposta imune e 5 de transporte ( $p<0,05$ ). Apenas uma proteína de lubrificação foi mais abundante nesta comparação. Sete proteínas foram menos abundantes no grupo SDF em comparação com SDI entre elas estão 2 antimicrobianas (Cystatin B e Haptoglobin), 1 de interação molecular desconhecida (Protein UNQ773/PRO1567), 3 de metabolismo (14-3-3 protein sigma, Alpha amylase e Apolipoprotein A I) e 1 de resposta imune (Alpha 1 antitrypsin) ( $p<0,05$ ). Trinta e uma proteínas foram mais abundantes para grupo SDF em comparação ao grupo CF, duas antimicrobianas, uma de diferenciação celular, duas de interação molecular, uma de interação molecular desconhecida, uma de interação proteína/proteína, 2 de lubrificação, 7 de metabolismo, 2 de organização celular, 8 de resposta imune e 5 de transporte ( $p<0,05$ ).

### **Teste Imunoenzimático (ELISA)**

As proteínas Alpha amylase 1 e Serum albumin tiveram suas abundâncias variando de forma estatisticamente significante entre os 4 grupos estudados. Assim, para confirmar esta variância na razão de abundância entre os grupos, estas proteínas foram analisadas pela técnica de ELISA. Porém, as análises demonstraram que não há diferença estatística entre os grupos tanto para a Alpha amylase 1 e quanto para a Serum albumin (Figura3).

## ***Discussão***

Pelo fato de crianças e adolescentes com SD terem alta prevalência de gengivite e esta se manifestar rapidamente progredindo para periodontite, é de extrema necessidade o acompanhamento odontológico desses pacientes com medidas de motivação de higiene bucal (envolvendo inclusive os responsáveis e/ou cuidadores do paciente) e controle do biofilme, no intuito de prevenir e/ou conter o processo inflamatório da periodontite<sup>41, 174</sup>. Visto que, a saliva total consiste de secreções das glândulas salivares maiores e menores, fluido gengival e outros componentes, e contribui de forma significativa para a manutenção da saúde dos tecidos orais e dentais, a análise da saliva é um excelente recurso complementar para o acompanhamento odontológico.

Neste estudo, verificou-se que o pH salivar não variou nos 4 grupos estudados (SD e Controle antes e depois do tratamento). Esse achado está de acordo com estudos prévios, que não observaram diferença no pH salivar dos indivíduos com SD em comparação aos pacientes cromossomicamente normais<sup>33, 138, 140, 170</sup>. Porém, corroborando os resultados de vários autores<sup>29, 30, 138-140, 170</sup> o fluxo salivar foi menor no grupo SD em relação ao grupo Controle. Adicionalmente, neste estudo observamos que o fluxo salivar nos SD se manteve menor independente do tratamento periodontal (antes,  $p=0,0254$  e depois,  $p=0,0010$ ). O mesmo foi encontrado num estudo realizado por Yarat et al.<sup>170</sup> que independente da dentição ser mista ou permanente ( $p<0,001$ ), o fluxo salivar permanecia sempre menor nos SD em relação aos pacientes normais. Já Cogulu et al.<sup>33</sup> observaram que crianças com SD entre 7 a 12 anos de idade apresentaram um fluxo salivar muito similar a crianças cromossomicamente normais nessa mesma faixa etária.

Recentemente, Cabras et al.<sup>22</sup> estudaram a saliva de 36 indivíduos com SD pela técnica HPLC-ESI-MS (High-Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization/ Mass Spectrometry) para identificar e quantificar as proteínas salivares pareando gênero e idade com o grupo Controle. Diferentemente do grupo Controle, o grupo com SD não teve aumento da concentração de proteínas das glândulas maiores causada pela

idade e, como consequência, as concentrações de proteína rica em prolina e Cystatin S tiveram uma redução significativa em pacientes com SD em comparação com o grupo Controle. Outras proteínas, como as proteínas antimicrobianas alfa defensins e histatinas, tiveram uma aumento significativo em consequência da idade em pacientes com SD.

Neste estudo, identificamos outras proteínas antimicrobianas como Cystatin B, Cystatin S e Haptoglobin em diferentes comparações em ambos os grupos SD e Controle.

As cistatins, são inibidoras naturais de cisteína proteinase, tem um papel de proteção e regulação durante a degradação tecidual em locais com inflamação ou infecção bacteriana <sup>77</sup>. Neste estudo, a Cystatin B foi encontrada em menor quantidade em ambos os grupos depois do tratamento (SD, razão:0,55 e C, razão:0,30). Porém, os pacientes com SD tiveram uma maior abundância desta proteína em comparação com pacientes Controle depois do tratamento (razão:1,82). Cabras et al. <sup>22</sup> identificaram também uma maior quantidade desta proteína em pacientes com SD em comparação com o Controle ( $p=0,04$ ) numa faixa etária de 10-17 anos de idade. No entanto, a mesma proteína numa faixa etária de 18-50 anos de idade não possuía diferença estatisticamente significativa em ambos os grupos.

Estudos prévios encontraram uma menor quantidade de Cystatin S em pacientes com DP em comparação com pacientes periodontalmente saudáveis <sup>59, 66, 70</sup>. Entretanto, Aguirre et al. <sup>2</sup> não encontraram nenhuma diferença entre pacientes com DP e pacientes controle. Já para os indivíduos com SD, a quantidade de Cystatin S foi menor em comparação com pacientes controle ( $p=0,0004$ ) <sup>22</sup>. Neste estudo a quantidade de Cystatin S identificada também foi menor nos indivíduos com SD (SDI) em comparação com os pacientes controle (CI), antes do tratamento (razão:0,50). Porém, após o tratamento notou-se uma maior quantidade desta proteína em pacientes com SD (SDF) em comparação com o grupo controle (CF) (razão: 1,27. Isto talvez demonstre uma resposta inflamatória exacerbada e uma regulação tardia da quantidade dessa proteína nos pacientes com SD. .

A Haptoglobin é uma proteína presente na fase aguda da DP, altos níveis desta proteína tem sido encontrados no plasma de indivíduos com periodontite e os níveis correlacionam-se com a severidade da DP <sup>44</sup>. A produção desta proteína é geralmente no fígado mas ela também é produzida localmente por queratinócitos pelo aumento da condição inflamatória ou podem ser liberadas por neutrófilos durante a ativação dos mesmos <sup>154</sup>. Na fase ativa da DP, foi encontrado 3,64 vezes mais da proteína Haptoglobin em pacientes com periodontite em comparação com os pacientes periodontalmente saudáveis <sup>64</sup>. Neste estudo foi observado uma maior quantidade nos pacientes SDI (SD antes do tratamento) em comparação CI (Controle antes do tratamento) (razão:1,50) porém depois do tratamento esta quantidade ainda permanece alta nos indivíduos com SD em comparação com o grupo Controle CF (razão:1,85). A quantidade desta proteína diminui após o tratamento periodontal <sup>64</sup>. O presente estudo também observou que o tratamento periodontal determinou uma redução na quantidade de Haptoglobin na saliva em ambos os grupos (SD razão:0,65 e C razão:0,32).

A proteína Alpha 1 antitrypsin é encontrada na fase aguda da doença, principalmente inibindo a elastase (enzima proteolítica responsável pelo metabolismo do colágeno). Embora Pederson et al. <sup>110</sup> não tenham encontrado nenhuma diferença na quantidade desta proteína entre os grupos com e sem DP, Huang (2004) <sup>70</sup> mostrou que esta proteína tem sua concentração 2 a 5 vezes maior durante a fase aguda da doença. No fluido gengival e na saliva foram encontrados maiores quantidades de Alpha 1 antitrypsin em pacientes com DP em comparação com pacientes periodontalmente saudáveis <sup>70, 103</sup>. Assim, a DP provavelmente aumenta os níveis

desta proteína na saliva, concordando com os achados deste estudo, no qual os indivíduos sindrômicos com DP ativa (SDI) mostraram maiores quantidades em comparação com os pacientes tratados (SDF) (SDF/SDI razão: 0,57). Já para a comparação SDF/CF a razão de abundância foi de 1,51 vezes maior em indivíduos com SD, sugerindo que estes possam apresentar uma deficiência na regulação deste mediador inflamatório.

As mucins possuem propriedade viscoelástica na saliva, participam da proteção da mucosa bucal e, no biofilme dentário, promovem uma agregação bacteriana, além de realizarem um *clearance* na cavidade bucal. Existem 2 principais tipos de mucinas: a de peso molecular alto Mucin 5B e a mucina de peso molecular baixo Mucin7<sup>126</sup>. A mucin é comumente encontrada na saliva, porém Gonçalves et al.<sup>60</sup> estudando grupos com gengivite e periodontalmente saudáveis não encontraram nenhuma associação desta proteína com a gengivite. Porém, outros estudos encontraram uma menor quantidade de mucin na saliva de pacientes com periodontite leve em comparação com pacientes periodontalmente saudáveis<sup>126, 127</sup>. Nota-se que neste estudo, depois do tratamento periodontal, os pacientes do grupo controle possuíam uma menor quantidade de MG1e MG2 na saliva, mas para o grupo SD não foi observado nenhuma diferença em comparação ao início do tratamento, isto pode sugerir um atraso na recuperação frente aos danos causado pelo processo inflamatório.

A proteína Plastin 2, também conhecida como Lymphocyte cytosolic protein 1, tem um papel de ativar as células T e regular a adesão dos leucócitos<sup>28</sup>. Alta quantidade desta proteína é encontrada em pacientes com DP comparados com pacientes periodontalmente saudáveis<sup>19, 125</sup>. Chan et al.<sup>28</sup> encontraram também uma maior quantidade do Plastin 2 em pacientes diabéticos com periodontite em comparação com pacientes diabéticos periodontalmente saudáveis. Neste estudo, observamos que os pacientes com SD apresentavam maiores quantidades desta proteína em comparação com pacientes do grupo Controle (razão SDI:1,15 e SDF:1,74). Justifica-se pelo fato que os indivíduos com SD possuem um desbalanço nas subpopulações de linfócitos T complementada com uma ativação defeituosa dos mesmos<sup>13, 131</sup>, gerando uma maior quantidade desta proteína para compensar esta deficiência no sistema imune.

As imunoglobulins são glicoproteínas sintetizadas e excretadas pelos linfócitos B, realizando a defesa do organismo. Os resultados sobre as imunoglobulins nos indivíduos com SD são bastante controversos<sup>10, 12, 29, 30</sup>. Os dados encontrados neste estudo mostram que o grupo SD não tiveram diferença na quantidade de Ig alpha 2 chain em comparação ao grupo Controle antes do tratamento, o que está de acordo com o estudo de Barr-Agholme et al.<sup>12</sup>. Porém, após o tratamento foi observado uma maior quantidade de Ig alpha 2 chain nos indivíduos com SD em comparação com o grupo controle (razão:2,57).

A proteína 14-3-3, também é conhecida como Epithelial cell marker protein1, participa na regulação de diversos processos biológicos como desenvolvimento neuronal, controle do crescimento celular e na patogênese viral e bacteriana<sup>50</sup>. Na saliva, esta proteína tem sido encontrada em menor quantidade em pacientes com periodontite agressiva em comparação com pacientes controle<sup>166</sup>. Identificada também por suprimir as vias de sinalização de apoptose celular<sup>50</sup>, esta foi encontrada com mais frequência no fluido gengival de pacientes com periodontite crônica<sup>8, 136</sup>. Neste estudo, para os indivíduos com SD, esta proteína foi mais abundante do que no grupo Controle (SDI-razão: 1,28; SDF-razão: 2,19). Com o potencial de regulação de diversos processos biológicos, após o tratamento periodontal a sua abundância diminui em ambos os grupos (SD razão: 0,54 e C razão: 0,37).

A Alpha amylase 1, também conhecida como Salivary alpha amylase, é um componente salivar muito abundante relacionado ao metabolismo de carboidratos e possui atividade inibitória contra micro-organismos regulando a flora bacteriana normal na cavidade bucal <sup>126, 127</sup>.

Vários estudos encontraram uma maior quantidade da Alpha amylase nos pacientes com DP comparados com pacientes periodontalmente saudáveis <sup>59, 60, 127, 166</sup>. Nos pacientes com SD estudos mostram uma menor abundância desta proteína <sup>140</sup> e nenhuma diferença significativa <sup>165</sup> quando estes são comparados com pacientes periodontalmente saudáveis. Neste estudo, a quantidade desta proteína foi menor nos síndrômicos antes do tratamento. Após o tratamento, a quantidade diminuiu nos síndrômicos (razão:0,74) mas, comparando com o grupo controle, esta quantidade dobrou (razão: 1,53). Novamente, os resultados mostram um desbalanço na quantidade de proteínas como consequência de um atraso na resposta imune dos indivíduos com Síndrome de Down. No entanto, diferentemente do que foi observado na espectrometria de massa, o teste imunoenzimático não detectou nenhuma diferença estatística para Alpha amylase 1 entre os grupos estudados., (Figura 3). Os resultados do teste imunoenzimático estão de acordo com os achados de Henskens et al. <sup>66</sup> e Sánchez et al. <sup>126</sup> que também não observaram diferença estatística entre indivíduos com DP e Controle. Provavelmente, a diferença observada na espectrometria de massa não tenha sido o suficiente para que esta fosse detectada no teste imunoenzimático, durante o qual pode ter ocorrido um processo de degradação da proteína.

Sabe-se que os indivíduos com SD apresentam um risco elevado de desenvolver a doença de Alzheimer devido ao alto nível de estresse oxidativo presente <sup>26</sup>. Em busca de marcadores proteicos confiáveis, Apolipoprotein 1 é uma das proteínas amplamente estudadas em mães portadoras de fetos com SD pois desempenha propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias <sup>76, 82, 108</sup>. Porém, os resultados tem se mostrado controversos, com alguns estudos detectando uma diminuição desta proteína no plasma de mulheres grávidas de indivíduos com SD <sup>76, 82</sup>. No entanto, outros estudos mostram um aumento nos níveis da Apolipoprotein no plasma e no líquido amniótico de mulheres grávidas de indivíduos com SD em comparação aos controles <sup>102, 108</sup>. Em concordância, Neste estudo observou-se na saliva de pacientes do grupo SD depois do tratamento periodontal (SDF) uma maior quantidade desta proteína em comparação aos pacientes do grupo Controle (CF) (razão:1,92). Adicionalmente, comparando o grupo SD antes e após o tratamento periodontal verificou-se uma quantidade menor desta proteína após o tratamento (razão:0,57). (Huang et al., 2004) Verificaram que em pacientes com gengivite, os níveis desta proteína na saliva eram 2,30 vezes mais abundantes em comparação aos pacientes saudáveis ( $p < 0,01$ ) Isto sugere que o processo inflamatório da DP pode contribuir para o aumento dos níveis desta proteína na saliva de indivíduos com SD.

Outra proteína relacionada com a doença de Alzheimer é a Alpha enolase que também serve como um sensível marcador para dano tecidual pelo estresse oxidativo <sup>24, 130</sup>. Maiores quantidades desta proteína foram encontradas em cérebros de pacientes com Alzheimer em comparação com pacientes normais <sup>24, 130</sup>. Os pacientes com SD deste estudo apresentaram também uma maior quantidade de Alpha enolase em comparação com os pacientes do grupo Controle (antes do tratamento - razão:1,29 e depois do tratamento - razão: 2,26). Porém, os pacientes do grupo Controle tiveram uma menor quantidade desta proteína na saliva após o tratamento periodontal (razão:0,38). Contradizendo, os achados de Huang et al. <sup>70</sup> que observaram uma menor quantidade de Alpha enolase quando a DP estava presente em comparação com pacientes periodontalmente saudáveis.

As proteínas Small prolin rich são importantes para o sistema antioxidante criando uma proteção na

periferia das células impedindo a peroxidação lipídica<sup>159, 160</sup>. As espécies reativas de oxigênio são produzidas por células polimorfonucleares, os macrófagos e também pelos fibroblastos durante a fase inflamatória<sup>159, 160</sup>. Recentemente, Komatsu et al.<sup>83</sup> observaram maiores quantidades de biomarcadores relacionados com o estresse oxidativo em indivíduos com SD comparados com pacientes cromossomicamente normais. Entretanto, Cabras et al.<sup>22</sup> encontraram uma menor quantidade de Small prolin rich protein 3 em indivíduos com SD em comparação aos pacientes cromossomicamente normais. Neste estudo, os pacientes SD apresentaram uma menor quantidade desta proteína em comparação com o grupo Controle antes do tratamento (razão: 0,50), porém, após o tratamento esta quantidade aumentou (razão: 1,36).

A Thioredoxin pertence a família das proteínas antioxidantes reduzindo os níveis de peróxidos do organismo. Elas são encontradas abundantemente nos eritrócitos e acredita-se que tenham um papel de proteção contra os danos teciduais causados pelos agentes oxidantes<sup>112</sup>. Neste estudo, após o tratamento periodontal, a quantidade desta proteína é mais abundante nos indivíduos do grupo SD em comparação com o grupo Controle, o que pode estar relacionado com os altos níveis de estresse oxidativo apresentados por esses indivíduos e pela deficiência no seu sistema imune<sup>26, 56</sup>.

Com o aumento da proteína Thioredoxin, observa-se também um aumento no número de células vermelhas contribuindo para o aumento de proteínas como a Hemoglobina subunit alpha e beta<sup>70</sup>. As quantidades encontradas nos pacientes com SD sempre foram maiores do que nos do grupo controle mesmo depois do tratamento. Além disso, sua quantidade no grupo Controle diminuiu após o tratamento, o que está de acordo com estudos prévios<sup>59, 60, 70</sup>.

Finalmente, a Serum Albumin que age também como antioxidante e protege contra radicais livres endógenos tem se mostrado mais abundante em pacientes com DP em comparação com pacientes saudáveis periodontalmente<sup>45, 59, 166</sup>. Neste estudo, os pacientes com SD tiveram uma maior quantidade de serum albumin em comparação com os pacientes do grupo controle (antes, razão: 1,34 e depois do tratamento, razão:2,12). Para confirmar este achado, foi realizado o teste imunoenzimático que não mostrou diferença entre os 4 grupos estudados (Figura 3), resultado que está de acordo com Barr-Agholme et al.<sup>12</sup>(1998) que também não encontraram nenhuma diferença na quantidade de serum albumin nos pacientes com SD comparados com os pacientes saudáveis. Estudos com pacientes cromossomicamente normais e saudáveis periodontalmente também mostraram que a quantidade desta proteína na saliva não é significativamente maior do que nos pacientes com DP<sup>66, 114</sup>.

## ***Conclusão***

Os indivíduos com SD possuem várias proteínas não só da resposta imune mas também do metabolismo, lubrificação, antioxidantes entre outras, que estão presentes na saliva e que podem contribuir para a rápida progressão da DP nesta população. Porém, a DP não pode ser quantificada por apenas um marcador protéico, considerando que o processo inflamatório tem caráter multifatorial e não tem uma progressão padronizada para todos os pacientes. Conclui-se que tais biomarcadores podem ser considerados desde que sejam

utilizados num conjunto de biomarcadores para monitorar a evolução e progressão da DP que acomete os pacientes com SD, assim, podem melhorar e individualizar o tratamento periodontal para cada paciente.

## Referências

1. Goncalves Lda R, Soares MR, Nogueira FC, Garcia CH, Camisasca DR, et al. (2011) Analysis of the salivary proteome in gingivitis patients. *J Periodontal Res* 46: 599-606.
2. Goncalves Lda R, Soares MR, Nogueira FC, Garcia C, Camisasca DR, et al. (2010) Comparative proteomic analysis of whole saliva from chronic periodontitis patients. *J Proteomics* 73: 1334-1341.
3. Zhang A, Sun H, Wang P, Wang X (2013) Salivary proteomics in biomedical research. *Clin Chim Acta* 415: 261-265.
4. Brooks MN, Wang J, Li Y, Zhang R, Elashoff D, et al. (2008) Salivary protein factors are elevated in breast cancer patients. *Mol Med Rep* 1: 375-378.
5. Rao PV, Reddy AP, Lu X, Dasari S, Krishnaprasad A, et al. (2009) Proteomic identification of salivary biomarkers of type-2 diabetes. *J Proteome Res* 8: 239-245.
6. Baldini C, Giusti L, Ciregia F, Da Valle Y, Giacomelli C, et al. (2011) Proteomic analysis of saliva: a unique tool to distinguish primary Sjogren's syndrome from secondary Sjogren's syndrome and other sicca syndromes. *Arthritis Res Ther* 13: R194.
7. Livnat G, Bentur L, Kuzmisky E, Nagler RM (2010) Salivary profile and oxidative stress in children and adolescents with cystic fibrosis. *J Oral Pathol Med* 39: 16-21.
8. Yang LL, Liu XQ, Liu W, Cheng B, Li MT (2006) Comparative analysis of whole saliva proteomes for the screening of biomarkers for oral lichen planus. *Inflamm Res* 55: 405-407.
9. Patil A, Prabhu V, Choudhari KS, Unnikrishnan VK, George SD, et al. (2010) Evaluation of high-performance liquid chromatography laser-induced fluorescence for serum protein profiling for early diagnosis of oral cancer. *J Biomed Opt* 15: 067007.
10. Martins C, Buczynski AK, Maia LC, Siqueira WL, Castro GF (2013) Salivary proteins as a biomarker for dental caries--a systematic review. *J Dent* 41: 2-8.
11. Moi GP, Cury JA, Dombroski TC, Pauletti BA, Paes Leme AF (2012) Proteomic analysis of matrix of dental biofilm formed under dietary carbohydrate exposure. *Caries Res* 46: 339-345.
12. Bostanci N, Ramberg P, Wahlander A, Grossman J, Jonsson D, et al. (2013) Label-free quantitative proteomics reveals differentially regulated proteins in experimental gingivitis. *J Proteome Res* 12: 657-678.
13. Jehmlich N, Dinh KH, Gesell-Salazar M, Hammer E, Steil L, et al. (2013) Quantitative analysis of the intra- and inter-subject variability of the whole salivary proteome. *J Periodontal Res* 48: 392-403.
14. Range H, Leger T, Huchon C, Ciangura C, Diallo D, et al. (2012) Salivary proteome modifications associated with periodontitis in obese patients. *J Clin Periodontol* 39: 799-806.
15. Siqueira WL, Dawes C (2011) The salivary proteome: challenges and perspectives. *Proteomics Clin Appl* 5: 575-579.
16. Haigh BJ, Stewart KW, Whelan JR, Barnett MP, Smolenski GA, et al. (2010) Alterations in the salivary proteome associated with periodontitis. *J Clin Periodontol* 37: 241-247.
17. Wu Y, Shu R, Luo LJ, Ge LH, Xie YF (2009) Initial comparison of proteomic profiles of whole unstimulated saliva obtained from generalized aggressive periodontitis patients and healthy control subjects. *J Periodontal Res* 44: 636-644.
18. Reuland-Bosma W, van der Reijden WA, van Winkelhoff AJ (2001) Absence of a specific subgingival microflora in adults with Down's syndrome. *J Clin Periodontol* 28: 1004-1009.
19. Izumi Y, Sugiyama S, Shinozuka O, Yamazaki T, Ohya T, et al. (1989) Defective neutrophil chemotaxis in Down's syndrome patients and its relationship to periodontal destruction. *J Periodontol* 60: 238-242.
20. Chaushu S, Chaushu G, Zigmond M, Yefenof E, Stabholz A, et al. (2007) Age-dependent deficiency in saliva and salivary antibodies secretion in Down's syndrome. *Arch Oral Biol* 52: 1088-1096.
21. Barkin R, Weston W, Humbert J, Sunada K (1980) Phagocytic function in Down syndrome- Bactericidal activity and phagocytosis. *J Ment Defic Res* 24: 251-256.
22. Khan A, Evans H, Glass L, Skin Y, Almonte D (1975) Defective neutrophil chemotaxis in patients with Down syndrome. *J Pediatr* 87: 87-89.
23. Barroeta O, Nungaray L, Lopez-Osuna M, Armendares S, Salamanca F, et al. (1983) Defective monocyte chemotaxis in children with Down's syndrome. *Pediatr Res* 17: 292-295.

24. Lin SJ, Wang JY, Klickstein LB, Chuang KP, Chen JY, et al. (2001) Lack of age-associated LFA-1 up-regulation and impaired ICAM-1 binding in lymphocytes from patients with Down syndrome. *Clin Exp Immunol* 126: 54-63.
25. Reuland-Bosma W, van Dijk J (1986) Periodontal disease in Down's syndrome: a review. *J Clin Periodontol* 13: 64-73.
26. Barr-Agholme M, Dahllof G, Linder L, Modeer T (1992) Actinobacillus actinomycetemcomitans, Capnocytophaga and Porphyromonas gingivalis in subgingival plaque of adolescents with Down's syndrome. *Oral Microbiol Immunol* 7: 244-248.
27. Siqueira WL, Siqueira MF, Mustacchi Z, de Oliveira E, Nicolau J (2007) Salivary parameters in infants aged 12 to 60 months with Down syndrome. *Spec Care Dentist* 27: 202-205.
28. Siqueira WL, Nicolau J (2002) Stimulated whole saliva components in children with Down syndrome. *Spec Care Dentist* 22: 226-230.
29. Siqueira WL, de Oliveira E, Mustacchi Z, Nicolau J (2004) Electrolyte concentrations in saliva of children aged 6-10 years with Down syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 98: 76-79.
30. Winer RA, Chauncey HH (1975) Parotid saliva enzymes in Down's syndrome. *J Dent Res* 54: 62-64.
31. Yarat A, Akyuz S, Koc L, Erdem H, Emekli N (1999) Salivary sialic acid, protein, salivary flow rate, pH, buffering capacity and caries indices in subjects with Down's syndrome. *J Dent* 27: 115-118.
32. Barr-Agholme M, Dahllof G, Modeer T, Engstrom PE, Engstrom GN (1998) Periodontal conditions and salivary immunoglobulins in individuals with Down syndrome. *J Periodontol* 69: 1119-1123.
33. Chaushu S, Yefenof E, Becker A, Shapira J, Chaushu G (2002) Severe impairment of secretory Ig production in parotid saliva of Down Syndrome individuals. *J Dent Res* 81: 308-312.
34. Cabras T, Pisano E, Montaldo C, Giuca MR, Iavarone F, et al. (2013) Significant modifications of the salivary proteome potentially associated with complications of Down syndrome revealed by top-down proteomics. *Mol Cell Proteomics* 12: 1844-1852.
35. Chan HH, Rahim ZH, Jessie K, Hashim OH, Taiyeb-Ali TB (2012) Salivary proteins associated with periodontitis in patients with type 2 diabetes mellitus. *Int J Mol Sci* 13: 4642-4654.
36. Salazar MG, Jehmlich N, Murr A, Dhople VM, Holtfreter B, et al. (2013) Identification of periodontitis associated changes in the proteome of whole human saliva by mass spectrometric analysis. *J Clin Periodontol* 40: 825-832.
37. Silva-Boghossian CM, Colombo AP, Tanaka M, Rayo C, Xiao Y, et al. (2013) Quantitative proteomic analysis of gingival crevicular fluid in different periodontal conditions. *PLoS One* 8: e75898.
38. Huang CM (2004) Comparative proteomic analysis of human whole saliva. *Arch Oral Biol* 49: 951-962.
39. Teles RP, Likhari V, Socransky SS, Haffajee AD (2009) Salivary cytokine levels in subjects with chronic periodontitis and in periodontally healthy individuals: a cross-sectional study. *J Periodontol Res* 44: 411-417.
40. Ainamo J, Bay I (1975) Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J* 25: 229-235.
41. Mombelli A, Lang NP (1994) Clinical parameters for the evaluation of dental implants. *Periodontol* 2000 4: 81-86.
42. Desai S (1997) Down syndrome: a review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 3: 279-285.
43. Cogulu D, Sabah E, Uzel A, Ozkinay F (2006) Genotyping of Streptococcus mutans by using arbitrarily primed polymerase chain reaction in children with Down Syndrome. *Arch Oral Biology* 5: 177-182.
44. Kaufman E, Lamster IB (2000) Analysis of saliva for periodontal diagnosis--a review. *J Clin Periodontol* 27: 453-465.
45. Henskens YM, van den Keijbus PA, Veerman EC, Van der Weijden GA, Timmerman MF, et al. (1996) Protein composition of whole and parotid saliva in healthy and periodontitis subjects. Determination of cystatins, albumin, amylase and IgA. *J Periodontol Res* 31: 57-65.
46. Aguirre A, Testa-Weintraub LA, Banderas JA, Dunford R, Levine MJ (1992) Levels of salivary cystatins in periodontally healthy and diseased older adults. *Arch Oral Biol* 37: 355-361.
47. Ebersole JL, Machen RL, Steffen MJ, Willmann DE (1997) Systemic acute-phase reactants, C-reactive protein and haptoglobin, in adult periodontitis. *Clin Exp Immunol* 107: 347-352.
48. Theilgaard-Monch K, Jacobsen LC, Nielsen MJ, Rasmussen T, Udby L, et al. (2006) Haptoglobin is synthesized during granulocyte differentiation, stored in specific granules, and released by neutrophils in response to activation. *Blood* 108: 353-361.
49. Pederson ED, Stanke SR, Whitener SJ, Sebastiani PT, Lamberts BL, et al. (1995) Salivary levels of alpha 2-macroglobulin, alpha 1-antitrypsin, C-reactive protein, cathepsin G and elastase in humans with or without destructive periodontal disease. *Arch Oral Biol* 40: 1151-1155.
50. Nakamura-Minami M, Furuichi Y, Ishikawa K, Mitsuzono-Tofuku Y, Izumi Y (2003) Changes of alpha1-protease inhibitor and secretory leukocyte protease inhibitor levels in gingival crevicular fluid before and after non-surgical periodontal treatment. *Oral Dis* 9: 249-254.

51. Sanchez GA, Miozza V, Delgado A, Busch L (2011) Determination of salivary levels of mucin and amylase in chronic periodontitis patients. *J Periodont Res* 46: 221-227.
52. Sanchez GA, Miozza VA, Delgado A, Busch L (2013) Relationship between salivary mucin or amylase and the periodontal status. *Oral Dis* 19: 585-591.
53. Barrena M, Echaniz P, Garcia-Serrano C, Cuadrado E (1993) Imbalance of the CD4+ subpopulations expressing CD45RA and CD29 antigens in the peripheral blood of adults and children with Down syndrome. *Scand J Immunol* 38: 323-326.
54. Scotese I, Gaetaniello L, Matarese G, Lecora M, Racioppi L, et al. (1998) T cell activation deficiency associated with an aberrant pattern of protein tyrosine phosphorylation after CD3 perturbation in Down's syndrome. *Pediatr Res* 44: 252-258.
55. Fu H, Subramanian RR, Masters SC (2000) 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 617-647.
56. Baliban RC, Sakellari D, Li Z, DiMaggio PA, Garcia BA, et al. (2012) Novel protein identification methods for biomarker discovery via a proteomic analysis of periodontally healthy and diseased gingival crevicular fluid samples. *J Clin Periodontol* 39: 203-212.
57. Cenini G, Dowling AL, Beckett TL, Barone E, Mancuso C, et al. (2012) Association between frontal cortex oxidative damage and beta-amyloid as a function of age in Down syndrome. *Biochim Biophys Acta* 1822: 130-138.
58. Kolla V, Jenö P, Moes S, Terçanlı S, Lapaire O, et al. (2010) Quantitative proteomics analysis of maternal plasma in Down syndrome pregnancies using isobaric tagging reagent (iTRAQ). *J Biomed Biotechnol* 2010: 952047.
59. Kang Y, Dong X, Zhou Q, Zhang Y, Cheng Y, et al. (2012) Identification of novel candidate maternal serum protein markers for Down syndrome by integrated proteomic and bioinformatic analysis. *Prenat Diagn* 32: 284-292.
60. Park J, Cha DH, Jung JW, Kim YH, Lee SH, et al. (2010) Comparative proteomic analysis of human amniotic fluid supernatants with Down syndrome using mass spectrometry. *J Microbiol Biotechnol* 20: 959-967.
61. Nagalla SR, Canick JA, Jacob T, Schneider KA, Reddy AP, et al. (2007) Proteomic analysis of maternal serum in down syndrome: identification of novel protein biomarkers. *J Proteome Res* 6: 1245-1257.
62. Schonberger SJ, Edgar PF, Kydd R, Faull RL, Cooper GJ (2001) Proteomic analysis of the brain in Alzheimer's disease: molecular phenotype of a complex disease process. *Proteomics* 1: 1519-1528.
63. Castegna A, Aksenov M, Thongboonkerd V, Klein JB, Pierce WM, et al. (2002) Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part II: dihydropyrimidinase-related protein 2, alpha-enolase and heat shock cognate 71. *J Neurochem* 82: 1524-1532.
64. Vermeij WP, Backendorf C (2010) Skin cornification proteins provide global link between ROS detoxification and cell migration during wound healing. *PLoS One* 5: e11957.
65. Vermeij WP, Florea BI, Isenia S, Alia A, Brouwer J, et al. (2012) Proteomic identification of in vivo interactors reveals novel function of skin cornification proteins. *J Proteome Res* 11: 3068-3076.
66. Komatsu T, Duckyoung Y, Ito A, Kurosawa K, Maehata Y, et al. (2013) Increased oxidative stress biomarkers in the saliva of Down syndrome patients. *Arch Oral Biol* 58: 1246-1250.
67. Perluigi M, di Domenico F, Fiorini A, Cocciolo A, Giorgi A, et al. (2011) Oxidative stress occurs early in Down syndrome pregnancy: A redox proteomics analysis of amniotic fluid. *Proteomics Clin Appl* 5: 167-178.
68. Garlet TR, Parisotto EB, de Medeiros Gda S, Pereira LC, Moreira EA, et al. (2013) Systemic oxidative stress in children and teenagers with Down syndrome. *Life Sci* 93: 558-563.
69. Ebersole JL, Schuster JL, Stevens J, Dawson D, 3rd, Kryscio RJ, et al. (2013) Patterns of salivary analytes provide diagnostic capacity for distinguishing chronic adult periodontitis from health. *J Clin Immunol* 33: 271-279.

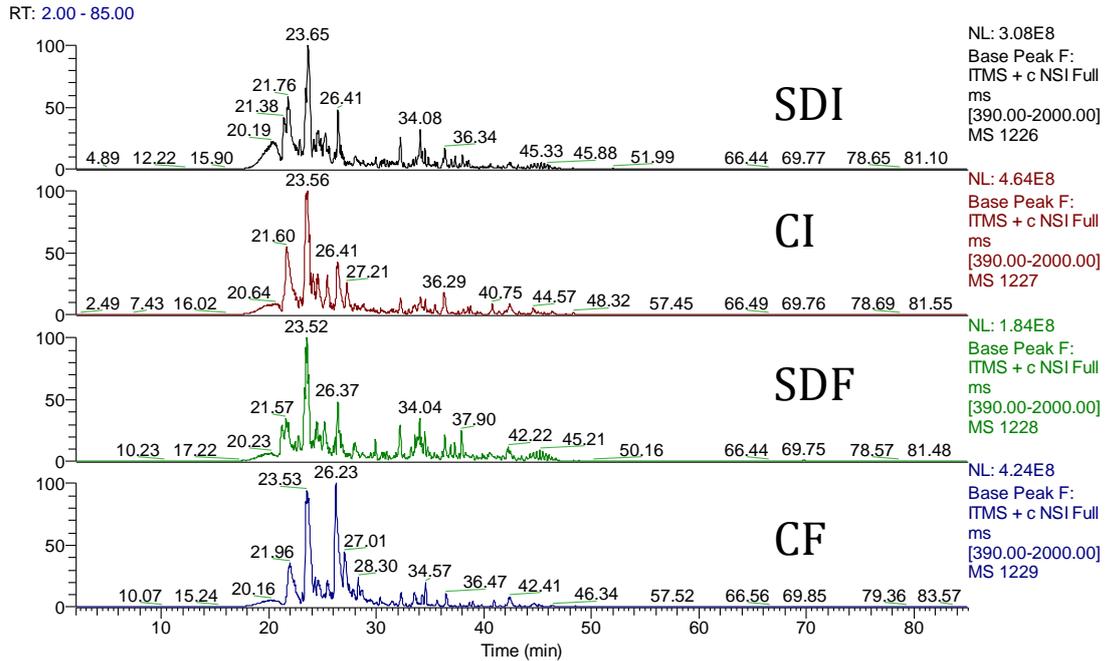


Figura 1- Cromatograma da base-pico do Grupos SDI (Síndrome de Down Inicial), CI (Controle Inicial), SDF (Síndrome de Down Final) e CF (Controle Final). A separação de peptídeos foi sucedida utilizando coluna de cromatografia líquida de fase reversa com nano fluxo, e gradiente de eluição variando de 0 a 100% de solvente B (ácido fórmico 0,1% em acetonitrila) em 85 minutos.

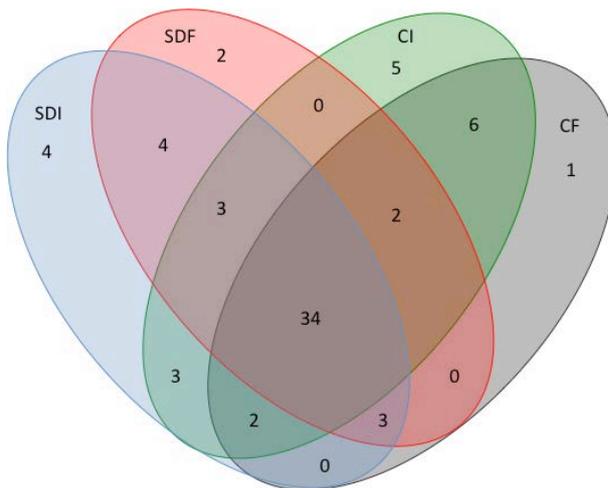


Figura 2 - Diagrama de Venn mostrando a relação do número de proteínas identificadas em cada Grupo e suas interrelações.

SDI- Síndrome de Down Inicial; SDF- Síndrome de Down Final; CI- Controle Inicial; CF- Controle Final.

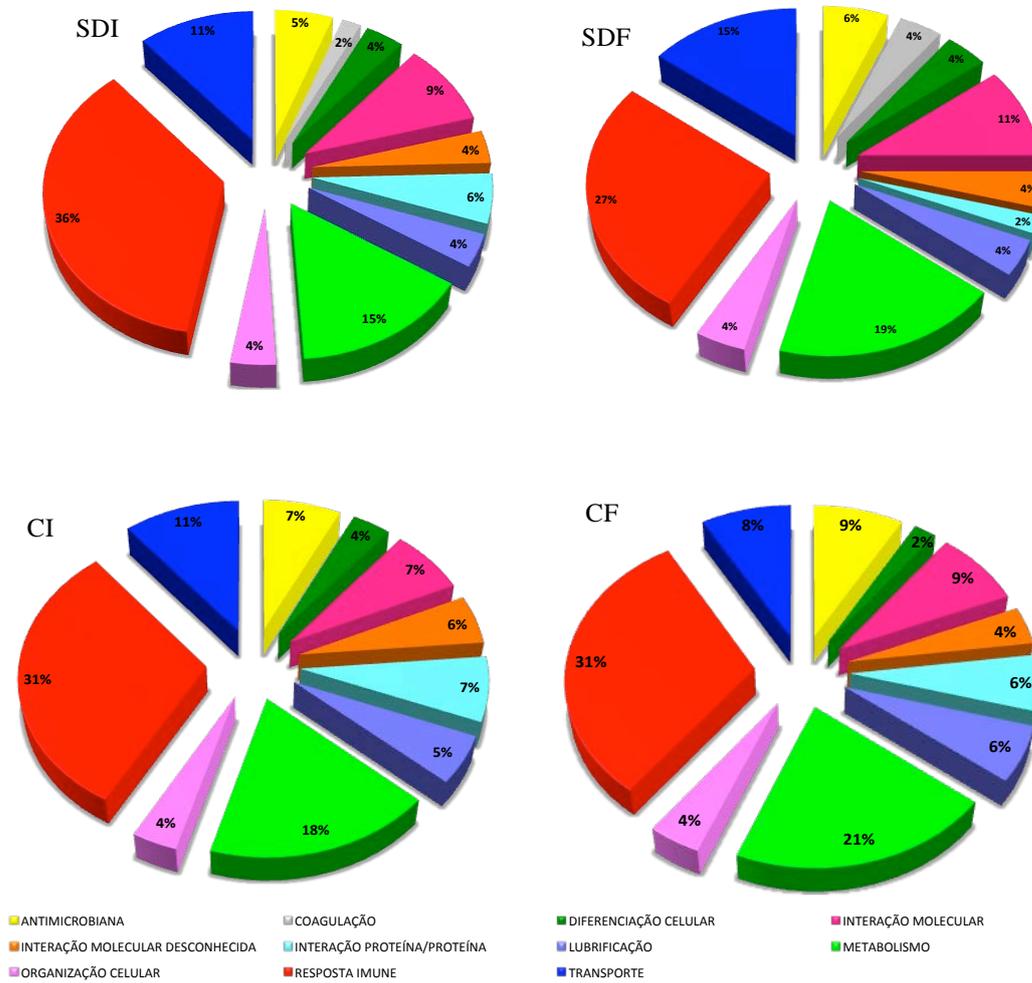


Figura 3 – Agrupamento das proteínas identificadas nos grupos estudados. SDI- Síndrome de Down Inicial; SDF- Síndrome de Down Final; CI- Controle Inicial; CF- Controle Final.

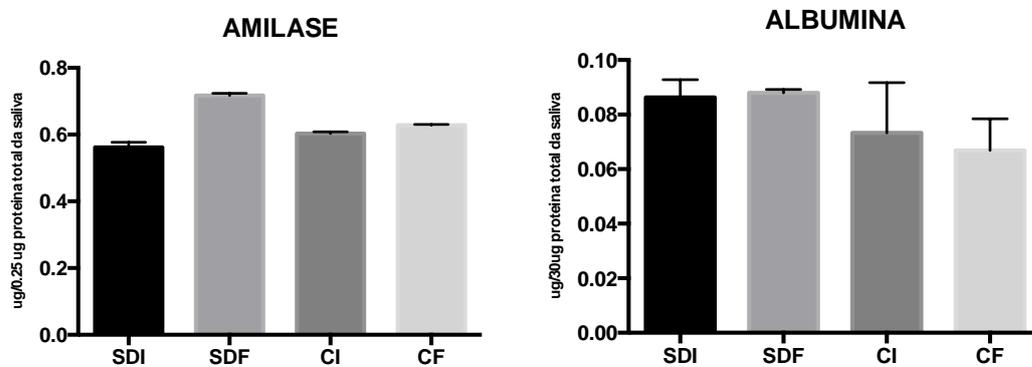


Figura 3- Teste de ELISA com os anticorpos anti-amilase e anti-serum albumin com 0,25ug e 30ug de proteína total da saliva de cada grupo estudado.

SDI: Síndrome de Down Inicial; SDF: Síndrome de Down Final; CI: Controle Inicial; CF: Controle Final. As barras representam o desvio padrão da média, calculadas a partir de 3 experimentos diferentes.

**Tabela 1. Características Demográficas e as médias ( $\pm$ DP) dos parâmetros clínicos dos grupos estudados.**

Características (valores médios $\pm$ DP)	Grupos		Valor de p*
	Síndrome de Down n=20	Controle n=10	
Idade (anos) ( $\pm$ )	31,91 ( $\pm$ 5,85)	41,25 ( $\pm$ 6,17)	0,001
Gênero (M/F)	12/8	6/4	NS
Fluxo salivar (ml/min)			
Baseline	0,21 ( $\pm$ 0,16)	0,34( $\pm$ 0,13)	0,0254
45 dias	0,16 ( $\pm$ 0,13)	0,33 ( $\pm$ 0,09)	0,0010
valor de p**	NS	NS	
pH			
Baseline	7,15 ( $\pm$ 0,53)	7,01 ( $\pm$ 0,82)	NS
45 dias	7,10 ( $\pm$ 0,56)	7,33 ( $\pm$ 0,40)	NS
valor de p**	NS	NS	
PS (mm) ( $\pm$ )			
Baseline	2,27 ( $\pm$ 0,45)	2,29 ( $\pm$ 0,45)	NS
45 dias	1,82 ( $\pm$ 0,44)	1,57 ( $\pm$ 0,21)	NS
valor de p**	0,0012	NS	
NI (mm) ( $\pm$ )			
Baseline	2,33 ( $\pm$ 0,51)	2,47 ( $\pm$ 0,48)	NS
45 dias	1,91 ( $\pm$ 0,51)	1,74 ( $\pm$ 0,34)	NS
valor de p**	0,0084	0,0007	
IPV(%faces)			
Baseline	83,76 ( $\pm$ 11,33)	48,51 ( $\pm$ 19,54)	<0,0001
45 dias	27,73 ( $\pm$ 13,33)	15,57 ( $\pm$ 10,15)	0,0158
valor de p**	< 0,0001	0,0001	
SM (%faces)			
Baseline	44,20 ( $\pm$ 21,45)	25,57 ( $\pm$ 12,10)	0,0090
45 dias	10,29( $\pm$ 11,80)	6,85 ( $\pm$ 7,40)	NS
valor de p**	< 0,0001	0,0004	
SS (%sítios)			
Baseline	39,16 ( $\pm$ 20,75)	40,46 ( $\pm$ 21,10)	NS
45 dias	12,46 ( $\pm$ 9,14)	8,76 ( $\pm$ 5,93)	NS
valor de p**	< 0,0001	0,0002	

PS: Profundidade de sondagem; NI: Nível de inserção; IPV: Índice de placa visível; SM: Sangramento marginal e SS: Sangramento à sondagem.

valor de p\* = Teste-t não pareado para analisar os grupos Síndrome de Down e Controle, exceto o gênero, o qual foi utilizado o teste Qui-quadrado.

valor de p\*\* = Teste-t pareado para analisar os grupos Síndrome de Down e Controle em diferentes períodos, exceto o gênero, o qual foi utilizado o teste Qui-quadrado.

Tabela 2 – Proteínas identificadas na saliva em pelo menos 3 corridas separadas por grupos e suas respectivas funções. SDI- Síndrome de Down Inicial; SDF- Síndrome de Down Final; CI- Controle Inicial; CF- Controle Final.

Número do acesso	Nome da proteína	SDI	SDF	CI	CF
<b>Antimicrobiana</b>					
P04080	Cystatin B	SIM	SIM	SIM	SIM
P01036	Cystatin S	SIM	SIM	SIM	SIM
P00738	Haptoglobin	SIM	SIM	SIM	SIM
P15515	Histatin 1	-	-	SIM	SIM
<b>Coagulação</b>					
P02675	Fibrinogen beta chain	-	SIM	-	-
P02679	Fibrinogen gamma chain	SIM	SIM	-	-
<b>Diferenciação celular</b>					
P62736	Actin aortic smooth muscle	SIM	SIM	SIM	-
P60709	Actin cytoplasmic 1	SIM	SIM	SIM	SIM
<b>Interação molecular</b>					
Q02487	Desmocollin 2	SIM	SIM	-	-
P32926	Desmoglein 3	SIM	SIM	-	SIM
P80303	Nucleobindin 2	-	-	SIM	SIM
P07237	Protein disulfide isomerase	SIM	SIM	SIM	-
P02814	Submaxillary gland androgen regulated protein 3 homolog B	SIM	SIM	SIM	SIM
Q96DR5	Short palate lung and nasal epithelium carcinoma associated protein 2	SIM	SIM	SIM	SIM
<b>Interação molecular desconhecida</b>					
Q6GMW4	IGL@ protein	-	-	SIM	-
Q96DA0	Protein UNQ773/PRO1567	SIM	SIM	SIM	SIM
<b>Interação proteína/proteína</b>					
P09228	Cystatin SA	-	-	SIM	SIM
P28325	Cystatin D	-	-	SIM	-
P62937	Peptidyl prolyl cis trans isomerase A	SIM	-	SIM	SIM
P30086	Phosphatidylethanolamine binding protein 1	SIM	-	-	-
P12273	Prolactin inducible protein	SIM	SIM	SIM	SIM
<b>Lubrificação</b>					
Q9Y6R7	IgGFc binding protein	-	-	SIM	SIM
Q9HC84	Mucin 5B	SIM	SIM	SIM	SIM
Q8TAX7	Mucin 7	SIM	SIM	SIM	SIM
<b>Metabolismo</b>					
P31947	14-3-3 protein sigma	SIM	SIM	SIM	SIM
P04745	Alpha amylase 1	SIM	SIM	SIM	SIM
P02647	Apolipoprotein A I	SIM	SIM	SIM	SIM
P01037	Cystatin SN	-	-	SIM	SIM
P04075	Fructose biphosphate aldolase A	SIM	SIM	SIM	SIM
P04406	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	SIM	SIM	SIM	SIM

P14618	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	SIM	SIM	SIM	SIM
P60174	Triosephosphate isomerase	SIM	SIM	SIM	SIM
P23280	Carbonic anhydrase 6	SIM	SIM	SIM	SIM
Q6FGW9	Cystatin C	-	SIM	SIM	SIM
<b>Organização celular</b>					
P13796	Plastin 2	SIM	SIM	SIM	SIM
Q9UBC9	Small proline rich protein 3	SIM	SIM	SIM	SIM
<b>Resposta imune</b>					
P01009	Alpha 1 antitrypsin	SIM	SIM	SIM	SIM
P06733	Alpha enolase	SIM	SIM	SIM	SIM
P04083	Annexin A1	SIM	-	SIM	-
P02812	Basic salivary proline rich protein 2	-	SIM	SIM	SIM
P07339	Cathepsin D	SIM	-	-	-
P01024	Complement C3	SIM	SIM	SIM	SIM
P09211	Glutathione S transferase P	SIM	SIM	SIM	SIM
P01877	Ig alpha 2 chain C region	SIM		SIM	
P01876	Ig alpha 1 chain C region	SIM	SIM	-	SIM
P01859	Ig gamma 2 chain C region	SIM	SIM		SIM
P01834	Ig kappa chain C region	-	-	SIM	SIM
Q6PIH6	Ig kappa chain V-I region HK102	-	-	SIM	-
P18135	Ig kappa chain V-III region HAH	SIM	-	-	-
P01842	Ig lambda chain C regions	SIM	SIM	SIM	SIM
P01871	Ig mu chain C region	SIM	SIM	SIM	SIM
P01591	Immunoglobulin J chain	-	-	SIM	-
P22079	Lactoperoxidase	SIM		SIM	-
P30740	Leukocyte elastase inhibitor	SIM	SIM	SIM	SIM
A1L4B8	Myeloperoxidase	-	-	-	SIM
P06702	Protein S100 A9	SIM	SIM	-	-
Q9UGM3-3	Isoform 3 of Q9UGM3	SIM	-	-	-
P29508	Serpin B3	SIM	-	SIM	SIM
P25311	Zinc alpha 2 glycoprotein	SIM	SIM	SIM	SIM
P10599	Thioredoxin	SIM	SIM	SIM	SIM
<b>Transporte</b>					
P69905	Hemoglobin subunit alpha	SIM	SIM	SIM	SIM
P68871	Hemoglobin subunit beta	SIM	SIM	SIM	SIM
Q19KS2	Lactoferrin (Fragment)	-	-	SIM	-
P31025	Lipocalin 1	SIM	SIM	SIM	-
P01833	Polymeric immunoglobulin receptor	SIM	SIM	SIM	SIM
Q56G89	Serum albumin	SIM	SIM	SIM	SIM
P20061	Transcobalamin 1	SIM	SIM	SIM	SIM
P02774	Vitamin D-binding protein	-	SIM	-	-
Q01469	Fatty acid binding protein epidermal	SIM	SIM	-	-

Tabela 3 – Razão de abundância\* de proteínas detectadas na saliva dos 4 grupos estudados e suas respectivas funções.  
SDI- Síndrome de Down Inicial; SDF – Síndrome de Down Final; CI- Controle Inicial; CF- Controle Final.

Número do acesso	Nome da proteína	Razão SDI/CI	valor de p	Razão SDF/SDI	valor de p	Razão SDF/CF	valor de p	Razão CF/CI	valor de p
<b>Antimicrobiana</b>									
P04080	Cystatin B	1,13	0,00	0,55	0,00	1,82	0,00	0,30	0,00
P01036	Cystatin S	0,50	0,00	1,14	0,00	1,27	0,00	0,40	0,00
P00738	Haptoglobin	1,50	0,00	0,65	0,00	1,85	0,00	0,32	0,00
P15515	Histatin 1	-	-	-	-	-	-	0,46	0,00
<b>Coagulação</b>									
P02679	Fibrinogen gamma chain	-	-	0,94	0,15	-	-	-	-
<b>Diferenciação celular</b>									
P62736	Actin aortic smooth muscle	1,29	0,00	0,89	0,00	-	-	-	-
P60709	Actin cytoplasmic 1	1,82	0,00	0,84	0,00	2,47	0,00	0,39	0,00
<b>Interação molecular</b>									
Q02487	Desmocollin 2	-	-	0,91	0,39	-	-	-	-
P32926	Desmoglein 3	-	-	0,89	0,25	3,08	0,00	-	-
P07237	Protein disulfide isomerase	1,29	0,00	0,97	0,94	-	-	-	-
P02814	Submaxillary gland androgen_regulated protein 3 homolog B	0,38	0,00	1,21	0,00	0,86	0,00	0,39	0,00
Q96DR5	Short palate lung and nasal epithelium carcinoma associated protein 2	1,26	0,00	0,96	0,42	1,67	0,00	-	-
<b>Interação molecular desconhecida</b>									
Q96DA0	Protein UNQ773/PRO1567	1,31	0,00	0,70	0,00	2,07	0,00	0,33	0,00
<b>Interação proteína/proteína</b>									
P09228	Cystatin SA	-	-	-	-	-	-	0,36	0,00
P62937	Peptidyl prolyl cis trans isomerase A	1,05	0,00	-	-	-	-	0,33	0,00

Q8TAX7	Mucin 7	1,01	0,15	0,90	0,12	1,50	0,03	0,31	0,00
<b>Metabolismo</b>									
P31947	14-3-3 protein sigma	1,28	0,00	0,54	0,03	2,19	0,00	0,37	0,00
P04745	Alpha amylase 1	0,84	0,00	0,74	0,02	1,53	0,00	0,35	0,00
P02647	Apolipoprotein A I	1,11	0,00	0,57	0,00	1,92	0,00	-	-
P01037	Cystatin SN	-	-	-	-	-	-	0,38	0,00
P04075	Fructose biphosphate aldolase A	0,99	0,00	0,76	0,00	1,91	0,00	-	-
P04406	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	1,28	0,00	0,99	0,89	1,77	0,00	-	-
P14618	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	1,21	0,00	0,90	0,04	2,28	0,00	-	-
P60174	Triosephosphate isomerase	1,11	0,00	0,86	0,35	2,45	0,00	-	-
P23280	Carbonic anhydrase 6	1,13	0,00	0,83	0,06	0,17	0,00	0,30	0,00
Q6FGW9	Cystatin C	-	-	-	-	-	-	0,40	0,00
<b>Organização celular</b>									
P13796	Plastin 2	1,15	0,00	0,83	0,00	2,14	0,00	0,33	0,00
Q9UBC9	Small proline rich protein 3	0,50	0,00	0,82	0,47	1,36	0,00	0,37	0,00
<b>Resposta imune</b>									
P01009	Alpha 1 antitrypsin	1,13	0,00	0,57	0,00	1,51	0,00	-	-
P06733	Alpha enolase	1,29	0,00	0,79	0,01	2,26	0,00	0,38	0,00
P01024	Complement C3	-	-	1,01	0,13	1,74	0,00	-	-
P09211	Glutathione S transferase P	0,91	0,00	0,97	0,45	1,17	0,00	0,41	0,00
P01877	Ig alpha 2 chain C region	1,07	0,00	0,89	0,44	2,57	0,00	-	-
P01842	Ig lambda chain C regions	1,16	0,00	0,85	0,00	2,18	0,00	0,34	0,00
Q6GMX2	Ig alpha 1 chain C region	-	-	0,97	0,94	-	-	-	-
Q6PI81	Ig mu chain C region	1,52	0,00	-	-	4,05	0,00	-	-
P22079	Lactoperoxidase	1,12	0,00	-	-	-	-	-	-
P30740	Leukocyte elastase inhibitor	1,39	0,00	0,93	0,32	1,95	0,00	0,36	0,00
P06702	Protein S100 A9	-	-	0,89	0,55	-	-	-	-
P29508	Serpin B3	0,75	0,00	-	-	-	-	-	-
P25311	Zinc alpha 2 glycoprotein	0,86	0,00	1,16	0,00	1,49	0,00	-	-

P10599	Thioredoxin	1,12	0,00	0,91	0,85	1,63	0,00	0,34	0,00
<b>Transporte</b>									
P69905	Hemoglobin subunit alpha	1,56	0,00	0,90	0,18	2,42	0,00	0,36	0,00
P68871	Hemoglobin subunit beta	1,39	0,00	1,00	0,00	2,37	0,00	0,43	0,00
P31025	Lipocalin 1	1,39	0,00	0,91	0,00	-	-	-	-
P01833	Polymeric immunoglobulin receptor	1,14	0,00	1,00	0,94	2,48	0,00	0,38	0,00
Q56G89	Serum albumin	1,34	0,00	0,93	0,01	2,12	0,00	0,39	0,00
P20061	Transcobalamin 1	1,29	0,00	0,98	0,70	1,73	0,00	0,33	0,00
Q01469	Fatty acid_binding protein epidermal	-	-	0,88	0,13	-	-	-	-

\*Razão de abundância de cada proteína para cada comparação estudada foi considerada significativa aquele nível de proteína com valor <0.75 para menos abundante ou >1.25 para mais abundante e com valor de p <0.05.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

## **6 Considerações finais**

A alta prevalência de doença periodontal nos indivíduos com Síndrome de Down (SD) está bem fundamentada na literatura<sup>1, 3, 4, 21-23, 52, 61, 78, 80, 85, 89</sup>. Porém, fatores locais e sistêmicos que expliquem a evolução rápida e severa da Doença Periodontal (DP) nesses indivíduos, ainda requerem mais estudos. Assim, este estudo avaliou a quantidade de periodontopatógenos e de citocinas inflamatórias no fluido gengival, bem como as proteínas salivares em indivíduos com SD com DP, comparando-os com indivíduos cromossomicamente normais, antes e 45 dias após o tratamento periodontal não-cirúrgico.

Uma melhora significativa nos parâmetros clínicos foi observada 45 dias após o tratamento periodontal não-cirúrgico em ambos os grupos (SD e Controle). Adicionalmente, observamos uma diminuição no número de periodontopatógenos, em ambos os grupos. Porém, a contagem destas bactérias continuou maior nos pacientes com SD em comparação com o grupo controle. Fato que pode ser explicado, pelo menos em parte, pela colonização que acomete os indivíduos com SD em idades precoces, quando comparados com grupos controle com condições de higiene bucal semelhantes, sendo o aumento dessas espécies bacterianas gradual com a idade<sup>3</sup>.

Todavia, a DP nos indivíduos com SD não é explicada apenas pela presença destes periodontopatógenos, mas também pela deficiência no sistema imune encontrada nestes indivíduos<sup>6, 9, 11, 21, 46, 50, 56, 72, 92, 102</sup>. Neste estudo, a quantidade de citocinas pro e anti-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-17A e IL-10) foi maior no fluido gengival nos indivíduos com SD em comparação com os do grupo controle. Vale ressaltar que, nos SD, observamos uma diminuição na concentração destas citocinas porém elas continuaram em maior quantidade em relação ao grupo controle. Assim, podemos sugerir que, o seu sistema de defesa do organismo é menos efetivo em debelar o processo inflamatório e, assim, o processo de cura se torna mais lento.

Também foram encontradas, neste estudo, maiores quantidades de proteínas com propriedades antimicrobianas, de lubrificação, metabolismo, organização celular, resposta imune e transporte em indivíduos com SD depois do tratamento periodontal. No entanto, o processo inflamatório periodontal por ser

multifatorial, não pode ser caracterizado por apenas por uma proteína relacionada com a DP, mas, por um conjunto de biomarcadores capazes de monitorar a progressão da doença.

Acredita-se que os resultados dessa pesquisa possam contribuir para uma compreensão mais aprofundada do comportamento microbiológico, imunológico e do proteoma salivar de indivíduos com SD frente à DP. Fato que pode estimular outros grupos de pesquisadores na busca de terapias mais direcionadas e eficientes em indivíduos com SD, visando proporcionar uma melhor condição da saúde bucal, com reflexos positivos na qualidade de vida dos portadores dessa síndrome, bem como dos seus responsáveis.

## REFERÊNCIAS

---

## 7 Referências\*

1. Agholme MB, Dahllof G, Modeer T. Changes of periodontal status in patients with Down syndrome during a 7-year period. *Eur J Oral Sci.* 1999; 107(2): 82-8.
2. Aguirre A, Testa-Weintraub LA, Banderas JA, Dunford R, Levine MJ. Levels of salivary cystatins in periodontally healthy and diseased older adults. *Arch Oral Biol.* 1992; 37(5): 355-61.
3. Amano A, Kishima T, Akiyama S, Nakagawa I, Hamada S, Morisaki I. Relationship of periodontopathic bacteria with early-onset periodontitis in Down's syndrome. *J Periodontol.* 2001; 72(3): 368-73.
4. Amano A, Kishima T, Kimura S, Takiguchi M, Ooshima T, Hamada S, et al. Periodontopathic bacteria in children with Down syndrome. *J Periodontol.* 2000; 71(2): 249-55.
5. Baldini C, Giusti L, Ciregia F, Da Valle Y, Giacomelli C, Donadio E, et al. Proteomic analysis of saliva: a unique tool to distinguish primary Sjogren's syndrome from secondary Sjogren's syndrome and other sicca syndromes. *Arthritis Res Ther.* 2011; 13(6): R194.
6. Baliban RC, Sakellari D, Li Z, DiMaggio PA, Garcia BA, Floudas CA. Novel protein identification methods for biomarker discovery via a proteomic analysis of periodontally healthy and diseased gingival crevicular fluid samples. *J Clin Periodontol.* 2012; 39(3): 203-12.
7. Barkin R, Weston W, Humbert J, Sunada K. Phagocytic function in Down syndrome-Bactericidal activity and phagocytosis. *J Ment Defic Res.* 1980; 24 Pt4: 251-6.
8. Barr-Agholme M, Dahllof G, Linder L, Modeer T. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque of adolescents with Down's syndrome. *Oral Microbiol Immunol.* 1992; 7(4): 244-8.
9. Barr-Agholme M, Dahllof G, Modeer T, Engstrom PE, Engstrom GN. Periodontal conditions and salivary immunoglobulins in individuals with Down syndrome. *J Periodontol.* 1998; 69(10): 1119-23.
10. Bascones A, Noronha S, Gomez M, Mota P, Gonzalez Moles MA, Villarroel Dorrego M. Tissue destruction in periodontitis: bacteria or cytokines fault? *Quintessence Int.* 2005; 36(4): 299-306.
11. Becerik S, Ozturk VO, Atmaca H, Atilla G, Emingil G. Gingival crevicular fluid and plasma acute-phase cytokine levels in different periodontal diseases. *J Periodontol.* 2012; 83(10): 1304-13.

---

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

12. Borges-Osorio MR, Robinson WM. As bases cromossômicas da hereditariedade: alterações cromossômicas. *Genética humana*. 2<sup>nd</sup> ed. Porto Alegre: Artmed; 2002. p. 68-115.
13. Bostanci N, Ramberg P, Wahlander A, Grossman J, Jonsson D, Barnes VM, et al. Label-free quantitative proteomics reveals differentially regulated proteins in experimental gingivitis. *J Proteome Res*. 2013; 12(2): 657-78.
14. Brooks MN, Wang J, Li Y, Zhang R, Elashoff D, Wong DT. Salivary protein factors are elevated in breast cancer patients. *Mol Med Rep*. 2008; 1(3): 375-8.
15. Byrne SJ, Dashper SG, Darby IB, Adams GG, Hoffmann B, Reynolds EC. Progression of chronic periodontitis can be predicted by the levels of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol*. 2009; 24(6): 469-77.
16. Cabras T, Pisano E, Montaldo C, Giuca MR, Iavarone F, Zampino G, et al. Significant modifications of the salivary proteome potentially associated with complications of Down syndrome revealed by top-down proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2013; 12(7): 1844-52.
17. Caseiro A, Ferreira R, Padrao A, Quintaneiro C, Pereira A, Marinheiro R, et al. Salivary proteome and peptidome profiling in type 1 diabetes mellitus using a quantitative approach. *J Proteome Res*. 2013;12(4):1700-9.
18. Castegna A, Aksenov M, Thongboonkerd V, Klein JB, Pierce WM, Booze R, et al. Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part II: dihydropyrimidinase-related protein 2, alpha-enolase and heat shock cognate 71. *J. Neurochem*. 2002; 82(6): 1524-32.
19. Cavalcante LB, Tanaka MH, Pires JR, Apponi LH, Aparecida Giro EM, Valentini SR, et al. Expression of the interleukin-10 signaling pathway genes in individuals with Down syndrome and periodontitis. *J Periodontol*. 2012; 83(7): 926-35.
20. Chan HH, Rahim ZH, Jessie K, Hashim OH, Taiyeb-Ali TB. Salivary proteins associated with periodontitis in patients with type 2 diabetes mellitus. *Int J Mol Sci*. 2012;13(4):4642-54.
21. Chaushu S, Chaushu G, Zigmund M, Yefenof E, Stabholz A, Shapira J, et al. Age-dependent deficiency in saliva and salivary antibodies secretion in Down's syndrome. *Arch Oral Biol*. 2007; 52(11): 1088-96.
22. Chaushu S, Yefenof E, Becker A, Shapira J, Chaushu G. Severe impairment of secretory Ig production in parotid saliva of Down Syndrome individuals. *J Dent Res*. 2002; 81(5): 308-12.
23. Cichon P, Crawford L, Grimm W. Early-onset periodontitis associated with Down's syndrome - clinical interventional study. *Ann Periodontol*. 1998; 3(1): 370-80.
24. Cogulu D, Sabah E, Uzel A, Ozkinay F. Genotyping of *Streptococcus mutans* by using arbitrarily primed polymerase chain reaction in children with Down Syndrome. *Arch Oral Biology*. 2006; 5(3): 177-82.

25. Corbi SC, Finoti LS, Anovazzi G, Tanaka MH, Kim YJ, Secolin R, et al. Clinical outcomes of periodontal therapy are not influenced by the ATC/TTC haplotype in the IL8 gene. *J Periodontal Res.* 2013 Aug 29 [Epub ahead of print].
26. Cutress TW. Periodontal disease and oral hygiene in trisomy 21. *Arch Oral Biol.* 1971; 16(11): 1345-55.
27. Desai S. Down syndrome: a review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997; 84(3): 279-85.
28. Ebersole JL, Machen RL, Steffen MJ, Willmann DE. Systemic acute-phase reactants, C-reactive protein and haptoglobin, in adult periodontitis. *Clin Exp Immunol.* 1997; 107(2): 347-52.
29. Ebersole JL, Schuster JL, Stevens J, Dawson D, 3rd, Kryscio RJ, Lin Y, et al. Patterns of salivary analytes provide diagnostic capacity for distinguishing chronic adult periodontitis from health. *J Clin Immunol.* 2013; 33(1): 271-9.
30. Feng Z, Weinberg A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontol 2000.* 2006; 40: 50-76.
31. Finoti LS, Corbi SC, Anovazzi G, Teixeira SR, Capela MV, Tanaka MH, et al. Pathogen levels and clinical response to periodontal treatment in patients with Interleukin 8 haplotypes. *Pathog Dis.* 2013 Jul 2 [Epub ahead of print]. doi: 10.1111/2049-632X.12062.
32. Franciotta D, Verri A, Zardini E, Andreoni L, De Amici M, Moratti R, et al. Interferon-gamma- and interleukin-4-producing T cells in Down's syndrome. *Neurosci Lett.* 2006; 395(1): 67-70.
33. Garlet GP, Cardoso CR, Mariano FS, Claudino M, de Assis GF, Campanelli AP, et al. Regulatory T cells attenuate experimental periodontitis progression in mice. *J Clin Periodontol.* 2010; 37(7): 591-600.
34. Genco RJ, Loe H. The role of systemic conditions and disorders in periodontal disease. *Periodontol 2000.* 1993; 2: 98-116.
35. Goncalves Lda R, Soares MR, Nogueira FC, Garcia C, Camisasca DR, Domont G, et al. Comparative proteomic analysis of whole saliva from chronic periodontitis patients. *J Proteomics.* 2010; 73(7): 1334-41.
36. Goncalves Lda R, Soares MR, Nogueira FC, Garcia CH, Camisasca DR, Domont G, et al. Analysis of the salivary proteome in gingivitis patients. *J Periodontal Res.* 2011; 46(5): 599-606.
37. Gumus P, Buduneli E, Biyikoglu B, Aksu K, Sarac F, Nile C, et al. Gingival crevicular fluid, serum levels of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand, osteoprotegerin, and interleukin-17 in patients with rheumatoid arthritis and osteoporosis and with periodontal disease. *J Periodontol.* 2013; 84(11): 1627-37.
38. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 1994; 5: 78-111.

39. Haigh BJ, Stewart KW, Whelan JR, Barnett MP, Smolenski GA, Wheeler TT. Alterations in the salivary proteome associated with periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2010; 37(3): 241-7.
40. Henskens YM, van den Keijbus PA, Veerman EC, Van der Weijden GA, Timmerman MF, Snoek CM, et al. Protein composition of whole and parotid saliva in healthy and periodontitis subjects. Determination of cystatins, albumin, amylase and IgA. *J Periodontal Res.* 1996; 31(1): 57-65.
41. Holmlund A, Hanstrom L, Lerner UH. Bone resorbing activity and cytokine levels in gingival crevicular fluid before and after treatment of periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2004; 31(6): 475-82.
42. Honda T, Domon H, Okui T, Kajita K, Amanuma R, Yamazaki K. Balance of inflammatory response in stable gingivitis and progressive periodontitis lesions. *Clin Exp Immunol.* 2006; 144(1): 35-40.
43. Hu S, Loo JA, Wong DT. Human saliva proteome analysis. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1098: 323-9.
44. Huang CM. Comparative proteomic analysis of human whole saliva. *Arch Oral Biol.* 2004; 49(12): 951-62.
45. Irwin CR, Myrillas TT. The role of IL-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *Oral Dis.* 1998; 4(1): 43-7.
46. Izumi Y, Sugiyama S, Shinozuka O, Yamazaki T, Ohyama T, Ishikawa I. Defective neutrophil chemotaxis in Down's syndrome patients and its relationship to periodontal destruction. *J Periodontol.* 1989; 60(5): 238-42.
47. Jehmlich N, Dinh KH, Gesell-Salazar M, Hammer E, Steil L, Dhople VM, et al. Quantitative analysis of the intra- and inter-subject variability of the whole salivary proteome. *J Periodontal Res.* 2013; 48(3): 392-403.
48. Kang Y, Dong X, Zhou Q, Zhang Y, Cheng Y, Hu R, et al. Identification of novel candidate maternal serum protein markers for Down syndrome by integrated proteomic and bioinformatic analysis. *Prenat Diagn.* 2012; 32(3): 284-92.
49. Kaufman E, Lamster IB. Analysis of saliva for periodontal diagnosis--a review. *J Clin Periodontol.* 2000; 27(7): 453-65.
50. Khan A, Evans H, Glass L, Skin Y, Almonte D. Defective neutrophil chemotaxis in patients with Down syndrome. *J. Pediatr.* 1975; 87(1): 87-9.
51. Khocht A, Heaney K, Janal M, Turner B. Association of interleukin-1 polymorphisms with periodontitis in Down syndrome. *J Oral Sci.* 2011; 53(2): 193-202.
52. Khocht A, Janal M, Turner B. Periodontal health in Down syndrome: contributions of mental disability, personal, and professional dental care. *Spec Care Dentist.* 2010; 30(3): 118-23.

53. Kolla V, Jenó P, Moes S, Tercanlı S, Lapaire O, Choolani M, et al. Quantitative proteomics analysis of maternal plasma in Down syndrome pregnancies using isobaric tagging reagent (iTRAQ). *J Biomed Biotechnol.* 2010; 2010: 952047. doi: 10.1155/2010/952047.
54. Konopka L, Pietrzak A, Brzezinska-Blaszczyk E. Effect of scaling and root planing on interleukin-1beta, interleukin-8 and MMP-8 levels in gingival crevicular fluid from chronic periodontitis patients. *J Periodontal Res.* 2012; 47(6): 681-8.
55. Kornman K, Crane A, Wang H, di Giovine F, Newman M, Pirk F, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1997; 24(1): 72-7.
56. Lin SJ, Wang JY, Klickstein LB, Chuang KP, Chen JY, Lee JF, et al. 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(1): 54-63.
57. Livnat G, Bentur L, Kuzmisky E, Nagler RM. Salivary profile and oxidative stress in children and adolescents with cystic fibrosis. *J Oral Pathol Med.* 2010; 39(1): 16-21.
58. Martins C, Buczynski AK, Maia LC, Siqueira WL, Castro GF. Salivary proteins as a biomarker for dental caries--a systematic review. *J Dent.* 2013; 41(1): 2-8.
59. Modeer T, Barr M, Dahllof G. Periodontal disease in children with Down's syndrome. *Scand J Dent Res.* 1990; 98(3): 228-34.
60. Moi GP, Cury JA, Dombroski TC, Pauletti BA, Paes Leme AF. Proteomic analysis of matrix of dental biofilm formed under dietary carbohydrate exposure. *Caries Res.* 2012; 46(4): 339-45.
61. Morgan J. Why is periodontal disease more prevalent and more severe in people with Down syndrome? *Spec Care Dentist.* 2007; 27(5): 196-201.
62. Mosmann TR, Kobie JJ, Lee FE, Quataert SA. T helper cytokine patterns: defined subsets, random expression, and external modulation. *Immunol Res.* 2009; 45(2-3): 173-84.
63. Murphy M, Friend D, Pike-Nobile L, Epstein L. Tumor necrosis factor-alpha and IFN-gamma expression in human thymus. Localization and overexpression in Down syndrome (trisomy 21). *J Immunol.* 1992; 149(7): 2506-12.
64. Mustacchi Z, Rozone G. Síndrome de Down. Aspectos clínicos e odontológicos. São Paulo:Ed.CID; 1990.
65. Nagalla SR, Canick JA, Jacob T, Schneider KA, Reddy AP, Thomas A, et al. Proteomic analysis of maternal serum in down syndrome: identification of novel protein biomarkers. *J Proteome Res.* 2007; 6(4): 1245-57.
66. Nibali L, Ready D, Parkar M, Brett P, Wilson M, Tonetti M, et al. Gene polymorphisms and the prevalence of key periodontal pathogens. *J Dent Res.* 2007; 86(5): 416-20.

67. Offenbacher S, Barros S, Mendoza L, Mauriello S, Preisser J, Moss K, et al. Changes in gingival crevicular fluid inflammatory mediator levels during the induction and resolution of experimental gingivitis in humans. *J Clin Periodontol*. 2010; 37(4): 324-33.
68. Orner G. Periodontal disease among children with Down's syndrome and their siblings. *J Dent Res*. 1976; 55(5): 778-82.
69. Orozco A, Gemmell E, Bickel M, Seymour GJ. Interleukin-1beta, interleukin-12 and interleukin-18 levels in gingival fluid and serum of patients with gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 2006; 21(4): 256-60.
70. Park J, Cha DH, Jung JW, Kim YH, Lee SH, Kim Y, et al. Comparative proteomic analysis of human amniotic fluid supernatants with Down syndrome using mass spectrometry. *J Microbiol Biotechnol*. 2010; 20(6): 959-67..
71. Patil A, Prabhu V, Choudhari KS, Unnikrishnan VK, George SD, Ongole R, et al. Evaluation of high-performance liquid chromatography laser-induced fluorescence for serum protein profiling for early diagnosis of oral cancer. *J Biomed Opt*. 2010; 15(6): 067007. doi: 10.1117/1.3523372.
72. Pellegrini FP, Marinoni M, Frangione V, Tedeschi A, Gandini V, Ciglia F, et al. Down syndrome, autoimmunity and T regulatory cells. *Clin Exp Immunol*. 2012; 169(3): 238-43.
73. Perozini C, Chibebe PC, Leao MV, Queiroz Cda S, Pallos D. Gingival crevicular fluid biochemical markers in periodontal disease: a cross-sectional study. *Quintessence Int*. 2010; 41(10): 877-83.
74. Range H, Leger T, Huchon C, Ciangura C, Diallo D, Poitou C, et al. Salivary proteome modifications associated with periodontitis in obese patients. *J Clin Periodontol*. 2012; 39(9): 799-806.
75. Rao PV, Reddy AP, Lu X, Dasari S, Krishnaprasad A, Biggs E, et al. Proteomic identification of salivary biomarkers of type-2 diabetes. *J Proteome Res*. 2009; 8(1): 239-45.
76. Rathnayake N, Akerman S, Klinge B, Lundegren N, Jansson H, Tryselius Y, et al. Salivary biomarkers of oral health: a cross-sectional study. *J Clin Periodontol*. 2013; 40(2): 140-7.
77. Reboul J, Gardiner K, Monneron D, Uze G, Lutfalla G. Comparative genomic analysis of the interferon/interleukin-10 receptor gene cluster. *Genome Res*. 1999; 9(3): 242-50.
78. Reuland-Bosma W. [Periodontal disease in Down's syndrome]. *Ned Tijdschr Tandheelkd*. 1990; 97(11): 468-71.
79. Reuland-Bosma W, van den Barselaar MT, van de Gevel JS, Leijh PC, de Vries-Huiges H, The HT. Nonspecific and specific immune responses in a child with Down's syndrome and her sibling. A case report. *J Periodontol*. 1988; 59(4): 249-53.

80. Reuland-Bosma W, van Dijk J. Periodontal disease in Down's syndrome: a review. *J Clin Periodontol.* 1986; 13(1): 64-73.
81. Sakellari D, Arapostathis KN, Konstantinidis A. Periodontal conditions and subgingival microflora in Down syndrome patients. A case-control study. *J Clin Periodontol.* 2005; 32(6): 684-90.
82. Salazar MG, Jehmlich N, Murr A, Dhople VM, Holtfreter B, Hammer E, et al. Identification of periodontitis associated changes in the proteome of whole human saliva by mass spectrometric analysis. *J Clin Periodontol.* 2013; 40(9): 825-32.
83. Sanchez GA, Miozza V, Delgado A, Busch L. Determination of salivary levels of mucin and amylase in chronic periodontitis patients. *J Periodontal Res.* 2011; 46(2): 221-7.
84. Sanchez GA, Miozza VA, Delgado A, Busch L. Relationship between salivary mucin or amylase and the periodontal status. *Oral Dis.* 2013 ; 19(6): 585-91.
85. Sasaki Y, Sumi Y, Miyazaki Y, Hamachi T, Nakata M. Periodontal management of an adolescent with Down's syndrome--a case report. *Int J Paediatr Dent.* 2004; 14(2): 127-35.
86. Schonberger SJ, Edgar PF, Kydd R, Faull RL, Cooper GJ. Proteomic analysis of the brain in Alzheimer's disease: molecular phenotype of a complex disease process. *Proteomics.* 2001; 1(12): 1519-28.
87. 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(2): 252-8.
88. Shaker OG, Ghallab NA. IL-17 and IL-11 GCF levels in aggressive and chronic periodontitis patients: relation to PCR bacterial detection. *Mediators Inflamm.* 2012; 2012: 174764. doi: 10.1155/2012/174764.
89. Shapira L, Wilensky A, Kinane D. Effect of genetic variability on the inflammatory response to periodontal infection. *J Clin Periodontol.* 2005; 32(6): 72-86.
90. Siqueira WL, Dawes C. The salivary proteome: challenges and perspectives. *P Proteomics Clin Appl.* 2011; 5(11-12): 575-9.
91. Siqueira WL, Siqueira MF, Mustacchi Z, de Oliveira E, Nicolau J. Salivary parameters in infants aged 12 to 60 months with Down syndrome. *Spec Care Dentist.* 2007; 27(5): 202-5.
92. Sohoel PD, Johannessen AC, Kristoffersen T, Haugstvedt Y, Nilsen R. In situ characterization of mononuclear cells in marginal periodontitis of patients with Down's syndrome. *Acta Odontol Scand.* 1992; 50(3): 141-9.
93. Spielmann N, Wong DT. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral Dis.* 2011; 17(4): 345-54.

94. Sreedevi H, Munshi AK. Neutrophil chemotaxis in Down syndrome and normal children to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Pediatr Dent*. 1998; 22(2): 141-6.
95. Streckfus CF, Mayorga-Wark O, Arreola D, Edwards C, Bigler L, Dubinsky WP. Breast cancer related proteins are present in saliva and are modulated secondary to ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer Invest*. 2008; 26(2): 159-67.
96. Swallow JN. Dental disease in children with Down's syndrome. *J Ment Defic Res*. 1964; 8:102-18.
97. Takahashi K, Azuma T, Motohira H, Kinane DF, Kitetsu S. The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2005; 32(4): 369-74.
98. Tanaka MH, Giro EM, Cavalcante LB, Pires JR, Apioni LH, Valentini SR, et al. Expression of interferon-gamma, interferon-alpha and related genes in individuals 9 with Down syndrome and periodontitis. *Cytokine*. 2012; 60(3): 875-81.
99. Teles RP, Gursky LC, Faveri M, Rosa EA, Teles FR, Feres M, et al. Relationships between subgingival microbiota and GCF biomarkers in generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2010; 37(4): 313-23.
100. Thunell DH, Tymkiw KD, Johnson GK, Joly S, Burnell KK, Cavanaugh JE, et al. A multiplex immunoassay demonstrates reductions in gingival crevicular fluid cytokines following initial periodontal therapy. *J Periodontal Res*. 2010; 45(1): 148-52
101. Tsai CC, Ku CH, Ho YP, Ho KY, Wu YM, Hung CC. Changes in gingival crevicular fluid interleukin-4 and interferon-gamma in patients with chronic periodontitis before and after periodontal initial therapy. *Kaohsiung J Med Sci*. 2007; 23(1): 1-7.
102. Tsilingaridis G, Yucel-Lindberg T, Modeer T. Enhanced levels of prostaglandin E2, leukotriene B4, and matrix metalloproteinase-9 in gingival crevicular fluid from patients with Down syndrome. *Acta Odontol Scand*. 2003; 61(3): 154-8.
103. Tsilingaridis G, Yucel-Lindberg T, Modeer T. T-helper-related cytokines in gingival crevicular fluid from adolescents with Down syndrome. *Clin Oral Investig*. 2012; 16(1): 267-73.
104. Wang J, Liang Y, Wang Y, Cui J, Liu M, Du W, et al. Computational prediction of human salivary proteins from blood circulation and application to diagnostic biomarker identification. *PLoS One*. 2013; 8(11): e80211. doi: 10.1371/journal.pone.0080211.
105. Wilcock DM, Griffin WS. Down's syndrome, neuroinflammation, and Alzheimer neuropathogenesis. *J Neuroinflammation*. 2013; 10: 84. doi: 10.1186/1742-2094-10-84.
106. Winer RA, Chauncey HH. Parotid saliva enzymes in Down's syndrome. *J Dent Res*. 1975; 54(1): 62-4.

107. Wu Y, Shu R, Luo LJ, Ge LH, Xie YF. Initial comparison of proteomic profiles of whole unstimulated saliva obtained from generalized aggressive periodontitis patients and healthy control subjects. *J Periodontal Res.* 2009; 44(5): 636-44.
108. Xiao H, Zhang L, Zhou H, Lee JM, Garon EB, Wong DT. Proteomic analysis of human saliva from lung cancer patients using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 2012; 11(2): M111.012112. doi: 10.1074/mcp.M111.012112.
109. Yang LL, Liu XQ, Liu W, Cheng B, Li MT. Comparative analysis of whole saliva proteomes for the screening of biomarkers for oral lichen planus. *Inflamm Res.* 2006; 55(10): 405-7.
110. Yoshihara T, Morinushi T, Kinjyo S, Yamasaki Y. Effect of periodic preventive care on the progression of periodontal disease in young adults with Down's syndrome. *J Clin Periodontol.* 2005; 32(6): 556-60.
111. Yucel OO, Berker E, Gariboglu S, Otlu H. Interleukin-11, interleukin-1beta, interleukin-12 and the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(5): 365-70.
112. Zhang A, Sun H, Wang P, Wang X. Salivary proteomics in biomedical research. *Clin Chim Acta.* 2013; 415: 261-5.
113. Zhang L, Henson BS, Camargo PM, Wong DT. The clinical value of salivary biomarkers for periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2009; 51: 25-37.
114. Zigmund M, Stabholz A, Shapira J, Bachrach G, Chaushu G, Becker A, et al. The outcome of a preventive dental care programme on the prevalence of localized aggressive periodontitis in Down's syndrome individuals. *J Intellect Disabil Res.* 2006; 50(7): 492-500.



## 8 Anexo

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

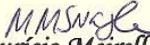
 Comitê de Ética em Pesquisa 

# Certificado

**Certificamos** que o projeto de pesquisa intitulado "*ANÁLISE CLÍNICA, MICROBIOLÓGICA E DE EXPRESSÃO GÊNICA EM INDIVÍDUOS COM SÍNDROME DE DOWN COM DOENÇA PERIODONTAL*" sob o protocolo nº 62/11, de responsabilidade do Pesquisador (a) *ELISA MARIA APARECIDA GIRO* está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FOAr, com validade de 06 (seis) anos, quando será avaliado o relatório final da pesquisa.

**Certify** that the research project titled "*CLINICAL, MICROBIOLOGICAL, IMMUNOLOGICAL AND GENE EXPRESSION ANALYSIS IN INDIVIDUALS WITH DOWN SYNDROME WITH PERIODONTAL DISEASE*", protocol number 62/11, under Dr *ELISA MARIA APARECIDA GIRO* responsibility, is under the terms of Conselho Nacional de Saúde/MS resolution # 196/96, published on May 10, 1996. This research has been approved by Research Ethic Committee, FOAr-UNESP. Approval is granted for 06 (six) years when the final review of this study will occur.

Araraquara, 14 de fevereiro de 2012.

  
**Prof. Dr. Mauricio Meirelles Nagle**  
Coordenador

Instituto  MetaSocial

AV. das Américas, 700 bl.8 lj 305 M – Barra da Tijuca, Rio de Janeiro /RJ  
Cep.22640-100  
[www.metasocial.org.br](http://www.metasocial.org.br)  
CNPJ. 06.102.026/0001-27

 SER DIFERENTE  
É NORMAL®

### AUTORIZAÇÃO DE USO DE IMAGEM

O Instituto MetaSocial, coordenador e detentor dos direitos de imagem, vídeos e filmes de toda a Campanha “Ser Diferente é Normal” , autoriza o uso da imagem de Paula de Mattos Werneck, 26 anos, garota propaganda e representante da campanha Ser diferente é Normal, para ilustrar a capa do trabalho de defesa de tese de doutorado de Márcia Tanaka a ser apresentado no dia 28/03/2014 na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Agradecemos pelo contato, desejando um bom resultado na defesa da tese.

Atenciosamente



Helena Werneck

Coordenadora Geral do Instituto MetaSocial

[helena@metasocial.org.br](mailto:helena@metasocial.org.br)

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 28/03/2017.  
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 28 de março de 2014

MARCIA HIROMI TANAKA