Maria Beatriz Fortunato Trotta

**Mecanismos inflamatórios e imunológicos na
síndrome de Down**

**Tese apresentada a Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências**

Área de concentração: Cardiologia

**Orientador: Dr. João Batista Costa
Carvalho de Serro Azul**

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Trotta, Maria Beatriz Fortunato
Mecanismos inflamatórios e imunológicos na síndrome de Down / Maria
Beatriz Fortunato Trotta / Maria Beatriz Fortunato Trotta. -- São Paulo, 2009.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Cardio-Pneumologia.
Área de concentração: Cardiologia.
Orientador: João Batista Costa Carvalho de Serro Azul.

Descritores: 1.Síndrome de Down 2.Envelhecimento 3.Processos do sistema
imunológico 4.Inflamação 5.Citocinas 6.Expressão gênica

USP/FM/SBD-413/09

*Tudo tem sua ocasião própria e há tempo
para todo o propósito debaixo do céu:*

*Há tempo de nascer e tempo de morrer, tempo
de plantar e tempo de colher;*

(Eclesiastes 3: 1-2)

Dedicatória

Aos meus pais Giovanni e Lucía que foram e sempre serão os meus alicerces e a minha força.

As minhas filhas Gabriella e Camila que são os meus amores e que me fazem pensar em nunca desistir dos meus sonhos.

Ao meu marido querido, Aurélio que esteve sempre presente, com carinho, amor, estímulo e compreensão em todos os momentos da minha vida.

Ao meu irmão Francesco que é meu maior e melhor amigo.

Agradecimentos

Nesta hora é muito difícil agradecer a todas as pessoas que me ajudaram da forma que elas realmente merecem.

Algumas atitudes não têm preço. Uma palavra de estímulo em um momento de desânimo, uma ajuda que você não esperava receber. O término foi difícil, o aprendizado foi longo, mas as amizades e a gratidão nunca serão esquecidas.

Ao meu orientador Dr. João Batista Costa Carvalho de Serro Azul que teve a paciência, a atenção e a compreensão necessárias para me orientar mesmo nos momentos de maior dificuldade.

Ao Prof. Dr. Maurício Wajngarten que de maneira clara e objetiva me impulsionou a aprimorar meus conhecimentos e foi decisivo para conclusão da minha tese.

A Profa. Dra. Anna Carla Goldberg pela confiança depositada e oportunidade de realizar minha tese e de discutir os resultados;

Ao Prof. Dr. Jorge Kalil pela oportunidade de iniciar e desenvolver o meu projeto no Laboratório de Imunologia;

Ao Prof. Dr. Edecio Cunha Neto, Profa. Dra. Luíza Guglielmi, Profa. Dra. Verônica Coelho pelo carinho e atenção dispensados;

Aos meus amigos:

Símone Gonçalves Fonseca por sua extrema competência como pesquisadora, pelo auxílio constante e agora mesmo a distância sempre disponível para ajudar;

María Lucía C. Marín pessoa que em muitas horas mostrou um enorme espírito de doação e a quem devo muito do que aprendi no laboratório;

Luciana Nogueira Gabriel que de forma carinhosa me auxiliou em muitos momentos difíceis e em passos primordiais da minha tese;

Sandra Maria Monteiro e Sandra Emiko sempre dispostas a ajudar e amigas por quem tenho profunda gratidão;

Adriana Coutinho que esteve muitas vezes ao meu lado para realização dos experimentos e discussão dos meus resultados;

A Solange Sousa Andrade amiga presente em todos os momentos na caminhada pela pós - graduação;

Profa. Dra. Neusa Forti pela orientação em um momento de dificuldade;

A Maria Alice Fortes Gatto que me ajudou de forma afetuosa e paciente a esclarecer pontos importantes que não se apresentavam com clareza.

A minha cunhada Érica pelo apoio e incentivo;

A minha amiga “irmã” Lillian pelo apoio incondicional e pelos cuidados dispensados as minhas filhas, nas minhas inúmeras ausências;

Aos amigos do laboratório Rosemeire, Carla, Lín, Simone Correa, Carol, Georgía, Bía Stolf, Iolanda, Simoninha, Eliane, Dra. Cristina, Santa Popp, D. Elza, Maria Ruth, Marcelo, Carlos, Lea, S. Jaír, Sônia, Raimunda, D. Aurora e a todos que pelo esforço e empenho me ensinaram o respeito pela pesquisa;

A Dra. Ana Andreí, Catia, Rosana pelo carinho e incentivo nessa caminhada;

*A Dra. Vera, Dra. Lara pela força e carinho,
no final da tese;*

*Ao Dr. Alexandre Costa Pereira pelo auxílio
na realização dos exames de cariotipagem;*

*A Neuza, Eva e Juliana presentes em todas as
fases de aprimoramento;*

*Aos pacientes da Associação de Pais e Amigos
dos Excepcionais que compareceram as
consultas e colaboraram com este estudo.*

*Ao auxílio dos serviços de Genética e
Assistência Social da APAE-SP e aos técnicos
de coleta do Laboratório Central HCFMUSP.*

*Este projeto teve o apoio FAPESP (Fundação
de Amparo a Pesquisa do Estado de São
Paulo).*

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

Lista de Tabelas

Lista de Gráficos

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1 Introdução.....	1
1.1 Epidemiologia	2
1.2 Resposta imune e genética.....	5
1.3 Regulador de calcineurina(RCAN1).....	8
1.4 Aterosclerose	16
2 Objetivos.....	20
3 Métodos.....	22
3.1 Casuística	23
3.1 Critérios de Exclusão.....	23
3.2 Metodologia.....	24
3.2.1 Hemograma.....	24
3.2.2 Sorologias.....	25
3.2.2.1 Dosagem de Imunoglobulinas (IgG, IgM e IgA).....	25
3.2.2.2 Dosagem de complemento (C3, C4).....	26
3.2.2.3 Antiestreptolisina O (ASLO).....	26
3.2.2.4 Proteína- C- reativa (PCR).....	27
3.2.2.5 Sorologia para mononucleose infecciosa.....	27

3.2.2.6 Sorologia para rubéola.....	27
3.2.2.7 Sorologia para citomegalovírus.....	28
3.2.2.8 Sorologia para sarampo.....	28
3.2.2.9 Sorologia para toxoplasmose.....	28
3.2.2.10 Sorologia para hepatite B.....	29
3.2.3 Separação de células mononucleares do sangue periférico.....	30
3.2.3.1 Cultura de células mononucleares de sangue periférico.....	31
3.2.3.2 Armazenamento de células para extração de RNA.....	31
3.2.3.3 Concentração de citocinas.....	32
3.2.3.4 Congelamento e descongelamento de células para realização de citometria	34
3.2.3.5 Imunofenotipagem.....	35
3.2.4 Expressão quantitativa de RCAN1.....	41
3.2.4.1 Extração do RNA.....	41
3.2.4.2 Quantificação de RNA e tratamento com DNase.....	42
3.2.4.3 Transcrição reversa em DNA complementar (cDNA).....	44
3.2.4.4 PCR (Reação de Polimerização em Cadeia).....	45
3.2.4.5 Expressão Gênica do RCAN1.....	46
3.2.4.5.1 Confeção dos primers.....	46
3.2.4.5.2 Reação de PCR quantitativo em tempo real.....	47
3.2.4.5.3 Concentração de uso dos primers.....	48
3.2.4.5.4 Especificidade e adequação dos primers.....	49
3.2.4.5.5 Cálculo da eficiência.....	49
3.2.5 Análise estatística.....	52
4. Resultados.....	53
4.1 Avaliação clínica dos pacientes.....	54

4.2 Hemograma.....	56
4.3 Sorologias.....	58
4.3.1 Dosagem de Imunoglobulinas (IgG, IgM e IgA).....	58
4.3.2 Dosagem de complemento (C3 e C4).....	59
4.3.3 Antiestreptolisina O (ASLO).....	59
4.3.4 Proteína- C-reativa (PCR).....	59
4.3.5 Sorologia para mononucleose infecciosa.....	60
4.3.6 Sorologia para rubéola.....	60
4.3.7 Sorologia para citomegalovírus.....	60
4.3.8 Sorologia para sarampo	61
4.3.9 Sorologia para toxoplasmose	61
4.3.10 Sorologia para hepatite B.....	61
4.4 Separação de células mononucleares.....	62
4.4.1 Concentração de citocinas.....	62
4.4.1.1 Citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IFN γ , IL-2).....	63
4.4.1.2 Citocinas reguladoras (IL-4,IL-5,IL-10).....	65
4.4.2 Descongelamento de células para citometria.....	66
4.4.3 Imunofenotipagem.....	67
4.5 Expressão gênica do RCAN1.....	71
5. Discussão.....	72
6. Conclusões.....	81
7. Anexos.....	83
8. Referências Bibliográficas.....	99
9. Apêndices.....	133

Lista
de Abreviaturas
Símbolos e Siglas

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

APC	Célula apresentadora de antígeno
AP-1	Proteína de ativação 1
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (designação de grupos)
cDNA	DNA complementar
CD4	Subpopulação de linfócitos T restrita a MHC classe II
CD8	Subpopulação de linfócitos T restrita a MHC Classe I
CD16	Subpopulação de células Natural Killer
CD19	Subpopulação de linfócitos B
CD56	Subpopulação de células Natural Killer
CD16+,CD56+ CD3-	População de células Natural killer
CD36	Subpopulação expressa em plaquetas, monócitos e macrófagos
CD40L	Subpopulação expressa em células T ativadas, células B em repouso, granulócitos, timócitos
CMV	Citomegalovírus
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
CTR	Grupo de deficientes mentais do grupo controle
DAG	Diacilglicerol
DEPC	Dimetil pirocarbonato
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Ácido desoxirribonucléico

DSCR1	“Down Síndrome critical region” 1
DYRK1A	“Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A”
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	Forward Scatter
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
Hsp	“Heat Shock protein”
HUVEC	veia de cordão umbilical humana
ICAM-1	“Inter-Cellular Adhesion Molecule” 1
IgA	Imunoglobulina A
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
IκB	Inibidor de κB
IL	Interleucina
IL-10	Interleucina-10
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-2	Interleucina-2
IL-10R	Receptor de Interleucina 10
IL-22	Interleucina-22
IFN-α	Interferon α
IMVE	Índice de massa de ventrículo esquerdo
INFγ	Interferon γ

IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
IKK	I κ B kinase
IκB/NF-κB	Complexo I κ B e fator nuclear κ B
Linfócitos Th1	Linfócitos T helper perfil pró- inflamatório
Linfócitos Th2	Linfócitos T helper perfil regulador
MAPK	“Mitogen-Activated Protein Kinase”
MHC	Molécula de histocompatibilidade
Min	minutos
MMP-9	Metaloproteinase-9
mRNA	RNA mensageiro
NFAT	Fator nuclear ativado
NF-κB	Fator nuclear κ B
PCR	Proteína-C-reativa
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PE	Ficoeritrina
PECy5	Ficoeritrina e Indotricarbocianina
PHA	fitohemaglutinina
PIP2	Fosfatidil inositol 4,5- bifosfato
PLCy1	Fosfolipase C
PP2B:	Serina treonina-fosfatase calcineurina
P- selectina	Molécula de adesão do leucócito ao endotélio; plaquetas
PTKs	Proteínas tirosina quinases
QR	Quantificação Relativa
qRT-PCR	Reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real

q.s.p.	quantidade suficiente para
RAS	Membro da família de proteína de ligação de nucleotídeos de guanina
RCAN 1	Regulador de calcineurina 1
RCT	Receptor de célula T
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Deoxiribonuclease
rpm	rotações por minuto
SD	síndrome de Down
SSC	Side Scatter
Th	Linfócito T helper
TL	Trissomia livre do cromossomo 21
TNFα	Fator de necrose tumoral α
VCAM-1	Molécula de adesão vascular 1
VEGF	Fator de crescimento de endotélio vascular

*Lista de
Tabelas*

Lista de Tabelas

Tabela 1. Descrição e identificação dos genes estudados, sequência dos primers utilizados e características do produto de amplificação.....	46
Tabela 2. Características clínicas e laboratoriais dos grupos SD e CTR..	55
Tabela 3. Hemograma no grupo SD e CTR.....	57
Tabela 4. Imunofenotipagem nos grupos síndrome de Down (SD), Controle (CTR) e saudável.....	68

Lista de
Gráficos

Lista de Gráficos

Gráfico 1. Controle negativo para as citocinas..... **33**

Gráfico 2. Representa a positividade para IL-10 e $\text{TNF}\alpha$ **33**

Lista de
Figuras

Lista de Figuras

Figura 1. Diagrama esquemático do DNA genômico.....	8
Figura 2. Mecanismo de Inibição da calcineurina pelo RCAN1.....	14
Figura 3. Resposta imune e aterosclerose.....	18
Figura 4. Controle negativo da imunofenotipagem.....	36
Figura 5. Titulação do anti CD3 CY5 (1:25, 1:50, 1:100).....	36
Figura 6. Titulação do anti CD19 PE (1:25, 1:50, 1:100).....	37
Figura 7. Titulação do anti CD4 PE (1:25, 1:50, 1:100).....	37
Figura 8. Titulação do anti CD8 FITC (1:25, 1:50, 1:100).....	37
Figura 9. Titulação do anti CD16 FITC (1:25, 1:50, 1:100).....	38
Figura 10. Titulação do anti CD56 PE (1:25, 1:50, 1:100).....	38
Figura 11. Titulação do anti CD14 PE (1:25, 1:50, 1:100).....	39
Figura 12. Avaliação da integridade das amostras de RNA por eletroforese em gel de agarose	42
Figura 13. Avaliação dos produtos da PCR (96pb) para o gene β actina.....	45
Figura 14. Cálculo da eficiência para os genes RCAN1 e GAPDH.....	51
Figura 15. Concentração de INF γ , TNF α e IL-2.....	64
Figura 16. Concentração de IL-10.....	65
Figura 17. Expressão de linfócitos T CD3, CD4, CD8 no grupo síndrome de Down (SD), grupo controle (CTR) e saudável	69
Figura 18. Relação da população de linfócitos T CD4 e CD8 no grupo síndrome de Down (SD).....	69
Figura 19. População de células NK(CD16+/CD56+/CD3-) no grupo síndrome de Down (SD), controle (CTR) e saudável.....	70

Figura 20. População de linfócitos B CD19 no grupo síndrome de Down (SD), grupo controle (CTR) e grupo saudável.....	70
Figura 21. Expressão relativa de RCAN1 em síndrome de Down (SD) e do grupo controle (CTR).....	71

Resumo

Mecanismos inflamatórios e imunológicos na síndrome de Down

Trotta MBF. Mecanismos inflamatórios e imunológicos na síndrome de Down [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

Resumo

Nos últimos anos houve um aumento da expectativa de vida de indivíduos com síndrome de Down, com causas de morte que diferem da população em geral. Alguns estudos mostraram que a resposta imunológica difere ao longo da vida com alterações relacionadas ao envelhecimento. O gene RCAN1 (regulador de calcineurina tipo 1), localizado na região q22.12 no cromossomo 21 é descrito como responsável pelo fenótipo da SD. O gene RCAN1 inibe a ação da calcineurina, responsável pela desfosforilação do fator nuclear de células T ativadas (NFAT), uma etapa essencial para a ativação de genes responsáveis pela expressão de citocinas. A consequência é uma possível diminuição da resposta imune efetora. Em adultos com síndrome de Down as respostas imunes humoral e celular têm sido pouco investigadas. Apesar da superexpressão do gene RCAN1 já ter sido descrita em diversos tecidos, sua expressão em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de adultos não foi ainda avaliada. Os objetivos deste estudo foram avaliar aspectos humorais e celulares da resposta imune, avaliar a expressão quantitativa do gene RCAN1 e relacionar os achados com a produção de citocinas. O grupo de estudo foi composto de adultos com síndrome de Down (SD) com cariótipo de trissomia livre (n=24), um grupo controle (CTR) composto de deficientes mentais com outras etiologias (n=21) e um grupo de indivíduos saudáveis (n=8), como parâmetros para alguns experimentos. Os grupos SD e CTR convivem na Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE-SP). Foram realizados hemogramas e sorologias para detecção de hepatite B, citomegalovírus, mononucleose infecciosa, toxoplasmose, rubéola, sarampo, PCR, fração de complemento C3, C4, antistreptolisina O e dosagem de imunoglobulinas IgG, IgM e IgA. Células mononucleares foram obtidas por gradiente de Ficoll-Hypaque e submetidas à cultura celular, análise quantitativa de expressão gênica de RCAN1 e avaliação imunofenotípica por citometria de fluxo. Os sobrenadantes da cultura foram coletados para dosagem das citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF α e INF γ . Os resultados deste estudo mostraram que a frequência de sorologias positivas para os vários agentes infecciosos e os demais parâmetros imunológicos foram comparáveis nos dois grupos de doentes mentais. A análise imunofenotípica dos indivíduos com SD mostrou aumento de células NK, de linfócitos TCD8+, alteração na relação CD4:CD8 (1:1) e diminuição de linfócitos B (CD19+) quando comparados ao grupo controle (p<0,05). A produção espontânea de INF γ , TNF α e IL-10 foi maior no grupo SD em relação ao grupo CTR (p<0,05). Porém, quanto à expressão do gene RCAN1, não foi observada diferença entre os dois grupos analisados. O estudo do perfil imunológico humoral e celular de adultos com síndrome de Down provenientes da APAE-SP permitiu concluir que não houve diferenças quanto aos aspectos humorais avaliados nos dois grupos (SD e CTR). Quanto aos aspectos celulares, a imunofenotipagem sugere um possível sinal de envelhecimento precoce do sistema imune e a produção de citocinas um predomínio de perfil pró-inflamatório. Contudo, o perfil de citocinas não apresenta relação com o nível de expressão do gene RCAN1.

Descritores: 1. síndrome de Down 2. Envelhecimento 3. Processos do sistema imunológico 4. Inflamação 5. Citocinas 6. Expressão gênica

Summary

SUMMARY

Trotta MBF. Inflammatory and immunological mechanism in Down's syndrome [thesis]. São Paulo; "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009.

Inflammatory and Immunological mechanism in Down's syndrome

In recent years there has been an increase in life expectancy of individuals with Down's syndrome (DS), with death causes differ from the general population. Some studies have shown that the immune response differs throughout life with changes related to aging. The RCAN1 gene (regulator of calcineurin type 1), located in the q22.12 region of chromosome 21 is described as responsible for the phenotype of DS. The gene RCAN1 inhibits the calcineurin activity, responsible for the dephosphorylation of the nuclear factor of activated T cells (NFAT), an essential step for the activation of the genes responsible for cytokines expression. The consequence is a possible reduction of the effector immune response. In adults with DS, the humoral and cellular immune responses have not been thoroughly investigated. Although the overexpression of the RCAN1 gene has already been described in many tissues, its expression in mononuclear cells of peripheral blood (PBMC) of adults with DS has not been evaluated. The objectives of this study were to evaluate aspects of humoral and cellular immune response, evaluate the quantitative expression of the RCAN1 gene and correlate the findings with the production of cytokines. The study group consisted of adults with Down's syndrome (DS) with free trisomy karyotype (n = 24), a control group (CTR) composed of the mentally disabled of other etiologies (n = 21) and a group of healthy subjects (n = 8), as parameters for some experiments. The SD and CTR groups are followed in Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE-SP). It was evaluated Hemogram and serology for detection of hepatitis B, cytomegalovirus, infectious mononucleosis, toxoplasmosis, rubella, measles, cRP, complement fraction C3, C4, antistreptolysin O and IgG, IgM and IgA immunoglobulin isotypes. The mononuclear cells were obtained by Ficoll-Hypaque gradient and the cells were cultured without stimuli, analyzed for the quantitative gene expression of RCAN1 and evaluated for immunophenotyping by flow cytometry. The culture supernatants were collected for measurement of cytokines IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF α and IFN γ . The results of this study showed that the frequency of positive tests for various infectious agents and other immunological parameters were comparable in both groups (DS and CTR). Immunophenotyping of individuals with DS showed an increase in NK cells, CD8 + lymphocytes, changes in CD4: CD8 ratio (1:1) and decreased B lymphocytes (CD19 +) when compared to the control group (p < 0.05). The DS group had a spontaneous production of IFN γ , TNF α and IL-10 higher than the CTR group (p < 0.05). However, there was not any difference in RCAN1 gene expression (mRNA) between the two groups of the mentally disabled. The humoral and cellular immune profile in adults with Down's syndrome from APAE-SP showed that there was no difference in the humoral aspects assessed in both groups (SD and CTR). For the cellular aspects, the immunophenotyping suggests a possible sign of premature aging of the immune system and the cytokine production show a proinflammatory profile. Nevertheless, this cytokines profile is not associated with level of expression of the RCAN1 gene.

1. Introdução

1.1 Epidemiologia

A síndrome de Down (SD) foi primeiramente descrita por John Langdon Down em 1866. Em 1959, Lejeune *et al.* identificaram a desordem genética como trissomia do cromossomo 21. Atualmente, identificam-se três formas de trissomia do cromossomo 21: a) forma livre, em que há presença de um cromossomo 21 extra, responsável por mais de 92% dos casos, b) translocação, na qual há inserção do braço extra do cromossomo 21 em outro cromossomo mais comumente nos cromossomos 13, 14, 15, 22 e no próprio 21; c) mosaico, onde parte de células exibem cariótipos normais e outras a trissomia livre do cromossomo 21. A síndrome de Down é a causa mais comum de deficiência mental de etiologia genética, presente em aproximadamente 1 a cada 700 nascimentos (Yang *et al.*, 2002).

Os indivíduos com síndrome de Down possuem características clínicas frequentemente encontradas que variam conforme a faixa etária. Cerca de 50% das crianças com síndrome de Down são acometidas por cardiopatias congênitas. Destas as mais frequentes são: defeito do septo atrioventricular (45%), comunicação interventricular (35%), comunicação interatrial tipo “osteo secundum” (8%), persistência do canal arterial (7%), Tetralogia de Fallot (4%) e outras lesões cardíacas (1%).

Os adolescentes e adultos jovens sem diagnóstico de cardiopatia congênita podem apresentar prolapso da válvula mitral (47%) e insuficiência aórtica (17%) (American Academy of Pediatrics Committee on Genetics. Health

supervision of children with Down syndrome, 2001; Cohen *et al.*, 1999; Geggel *et al.*, 1993; Roizen 2002).

Outras condições encontradas são: problemas auditivos (38 a 78%), vícios de refração (40 a 76%), instabilidade da articulação atlantoaxial (2%), convulsões (8%) (Roizen *et al.*, 1993^a ; Pueschel *et al.*, 1991; Roizen *et al.*, 1993; Roizen *et al.*, 1994; Zachor *et al.*, 2000; Olson *et al.*, 1990) e diabetes melitus que ocorre em menos de 1% desta população (Anwar *et al.*, 1998)

As doenças autoimunes são comuns e provocam o hipotireoidismo (cerca de 20%), artrite reumatóide juvenil (1 a 2%) e doença celíaca (4 a 7%). Encontra-se positividade para pelo menos um auto anticorpo em quase 30% das crianças (Kennedy 1992; Noble *et al.*, 2000; da Rosa Utiyama *et al.*, 2008).

As alterações hematológicas são particularmente frequentes. Observa-se policitemia e macrocitose em mais de dois terços dos casos. As leucemias acometem em torno de 1 em 300 indivíduos com síndrome de Down e a prevalência diminui com o envelhecimento (Kivivuori *et al.*, 1996; Roizen *et al.*, 1993^b; Lange, 2000).

A idade de aparecimento das características sexuais secundárias é descrita como similar a população em geral, com capacidade reprodutiva normal nas mulheres, porém, diminuída nos homens. As mulheres têm menopausa em torno de 47 anos, precoce em relação à população geral (Goldstein 1988; Pueschel *et al.*, 1985).

Os distúrbios psiquiátricos aparecem em até 25% dos casos e a demência de Alzheimer é prevalente em 75% dos pacientes e surge precocemente por volta dos 40 anos de idade. (Myers *et al.*, 1991; Dalton *et al.*, 1986).

A população com síndrome de Down é acometida por uma série de infecções, principalmente, de cavidade oral, vias aéreas superiores e tecido celular subcutâneo (Ribeiro *et al.*, 2003).

Entre os pacientes com deficiência mental institucionalizados observa-se maior prevalência de infecções por hepatite B em relação à população normal, devido ao maior número de internações e transfusões sanguíneas (Holt *et al.*, 1986). A infecção por citomegalovírus (CMV) tem prevalência elevada nessa população com evidências de que indivíduos com infecção subclínica poderiam transmitir a infecção através de saliva ou urina contaminada pelo vírus CMV (do Canto *et al.*, 2002). Nos casos de sepsis prevalece o *Staphylococcus sp.*, porém a identificação do agente não é possível em mais da metade dos casos. (Garrison *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, houve um aumento significativo da expectativa de vida da população com síndrome de Down. No período entre 1983 e 1997 observou-se que a média de idade passou de 25 anos a 49 anos, em 1997 (Yang *et al.*, 2002). As causas de morte nos indivíduos com síndrome de Down que chegam à idade adulta diferem da população normal. Assim, doença de Alzheimer, cardiopatias congênitas, broncopneumonias e pneumonias aspirativas são mais frequentes, enquanto leucemias, neoplasias (Satgé *et al.*, 1998) e doenças isquêmicas do coração são menos relatadas. A mortalidade associada à leucemia apresenta importância até os dez anos, diminui com a idade e torna-se irrelevante após os 40 anos (Yang *et al.*, 2002).

1.2 Resposta imune e genética

Os dados epidemiológicos provocam dúvidas sobre as eventuais influências genéticas da síndrome de Down na fisiopatologia de várias afecções. Como várias delas tem a inflamação um fator de implicação comum, surge o desafio de entender a relação entre genética e inflamação, passando pela resposta imune.

Estudos avaliaram a resposta imune as infecções, vírus das hepatites A e B, pneumococo (Ferreira *et al.*, 2002; Nurmi *et al.*, 1982) e vacinas de tétano, difteria, caxumba, varicela, rubéola, influenza A e influenza B (Hawkes *et al.*, 1978). Mostraram resposta normal a antígenos do vírus de hepatite A (Ferreira *et al.*, 2004), todavia, diminuída em relação à vacina do vírus influenza A, pólio, pertussis acelular, tétano e pneumococo (Philip *et al.*, 1986; McKay *et al.*, 1978; Li Volte *et al.*, 1996; Epstein *et al.*, 1987; Costa-Carvalho *et al.*, 2006).

Os padrões destas respostas tanto humoral como celular diferem ao longo da vida nos pacientes com síndrome de Down.

As crianças acima de seis anos apresentam níveis elevados de IgG e IgA. Na adolescência há diminuição de IgM e ao longo do envelhecimento, há queda de linfócitos B (CD19), com aumento de linfócitos T CD8 que desequilibra a relação das subpopulações de linfócitos T CD4: CD8 (Burgio *et al.*, 1975, Nishida *et al.*, 1978; Bălăiță *et al.*, 1992; Nespoli *et al.*, 1993).

Alguns estudos mostram apoptose acelerada e prejuízo da função dos granulócitos, com maior susceptibilidade a infecções (Ugazio *et al.*, 1990;

Burgio et al., 1975; Burgio *et al.*, 1983; Yasui *et al.*, 1999).

As alterações das populações de linfócitos de indivíduos com síndrome de Down comparados a adultos normais sugerem perfil de *envelhecimento precoce* do sistema imunológico, todavia esse perfil foi pouco estudado.

O envelhecimento do sistema imune envolve a preservação do sistema imune “*ancestral*” inato e modificações importantes do sistema “*sofisticado*” adquirido (Cossarizza *et al.*, 1990).

A resposta imune inata predomina no envelhecimento. Há aumento de células Natural Killer (NK) que são subpopulações de linfócitos derivadas da medula óssea, distintas das células T ou B e se caracterizam por moléculas CD16+, CD56+ e CD3-. As células NK possuem mecanismos líticos diretos para destruir as células infectadas ou microorganismos por meio da secreção de interferon γ (INF γ) (Sansoni *et al.*, 2008; Cuadrado *et al.*, 1996; Cossarizza *et al.*, 1991).

Por outro lado, as alterações do sistema imune adquirido são constituídas pela diminuição do número de linfócitos B que expressam CD19 na superfície e também dos valores absolutos de linfócitos T CD3+, expressos na superfície de células T, envolvendo as subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+.

A relevância clínica destas alterações, principalmente em relação às infecções, tumores e aterosclerose não está clara, tanto para o envelhecimento em geral como para os pacientes com SD (Cuadrado *et al.*, 1996).

As alterações na resposta imune podem ser influenciadas por genes expressos na trissomia do cromossomo 21, no qual, foram descritos mais de 225 genes (Hattori *et al.*, 2000). Neste sentido, atraem atenção, entre outros,

os genes: a) SOD1 (superóxido dismutase), com papel no estresse oxidativo
b) CBS (cistationa β -sintetase), responsável pela degradação da homocisteína (Roizen *et al.*, 2003); c) AML1 (*acute myeloid leukemia 1*), regulador da hematopoiese normal, envolvido em 25% dos casos de leucemia linfóide aguda e 15% dos casos de leucemia mielóide aguda em crianças (Dixon *et al.*, 2006); d) AIRE (*autoimmune polyglandular disease*); e) receptores de citocinas: IFN- γ IL-10R, IL-22, IFN- α ; f) DSCAM1 (*Down syndrome cell adhesion molecule 1*) g) RCAN1 (*regulador de calcineurina 1*), descrito como um dos responsáveis pelo fenótipo característico da síndrome de Down e fisiologicamente responsável pela inibição da calcineurina (Fuentes *et al.*, 1995).

1.3 Regulador de calcineurina (RCAN1)

O gene RCAN1 teve sua nomenclatura alterada várias vezes. Inicialmente, isolado no genoma de hamster foi nomeado Adapt 78 (Crawford *et al.*, 1997; Leahy *et al.*, 1999). Identificado como pertencente à região crítica da síndrome de Down foi denominado “*Down syndrome critical region 1*” (DSCR1) (Fuentes *et al.*, 1995). Posteriormente isolado em músculo, foi denominado “*myocyte-enriched calcineurin-interacting protein*” (MCIP1) (Rothermel *et al.*, 2000) e calcipressina (Genesca *et al.*, 2003).

Recentemente, houve a tentativa de padronização da nomenclatura. O novo nome já aprovado pelas comissões “HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC)” e “Mouse Genomic Nomenclature Committee (MGNC)”, pretende uniformizar e fornecer uma informação a respeito da função do gene, como regulador de calcineurina. (Davies *et al.*, 2007).

O RCAN 1 se localiza na região cromossômica 22q12 e consiste de 7 exons separados por 6 íntrons. Os exons 1 ao 4 apresentam “*splicing*” alternativos constituindo 4 isoformas diferentes permanecendo constantes dos exons 5 ao 7, presente em todas as isoformas (**Figura 1**).

**Figura 1 - Diagrama esquemático do DNA genômico
Isoformas do RCAN1
Adaptado de Ermak *et al.*, 2002.**

A maioria das isoformas relatadas compreende a isoforma 1, 4 e mais recentemente descrita a isoforma 1L, versão mais longa da isoforma 1. A isoforma 2 só está presente em tecido fetal (Ermark *et al.*, 2002).

Em adultos, o RCAN1 isoforma 1 é altamente expresso no coração, cérebro, músculo e pâncreas enquanto a isoforma 4 está mais expressa no coração, fígado, músculo, placenta e rins (Harris *et al.*, 2005). A isoforma RCAN1 1L quando superexpressa protege a célula contra o estresse oxidativo e a isoforma 1.4 inibe a hipertrofia cardíaca e muscular esquelética, além de atenuar resposta inflamatória e angiogênese (Fuentes *et al.*, 1997; Hesser *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006; Minami *et al.*, 2004). Em tecido nervoso de hamster a superexpressão transitória do RCAN1 ocasionou a diminuição do estresse oxidativo mediado por cálcio. Essa superexpressão quando prolongada parece estar relacionada à presença de demência do tipo Alzheimer (Ermark *et al.*, 2002)

O fato do RCAN1 regular negativamente a calcineurina da mesma forma que os imunossupressores, ciclosporina e o FK506 (Fruman *et al.*, 1992) desencadeou grande interesse no estudo de outros mecanismos nas terapêuticas imunossupressoras, com menos efeitos colaterais.

A importância do gene RCAN1 em leucócitos estaria no papel de inibir a calcineurina, impedir a transcrição de genes responsáveis pela produção de citocinas e desempenhar um mecanismo imunossupressor.

A calcineurina é uma serina treonina-fosfatase (PP2B), enzima dependente de cálcio, importante na via de transdução de sinal em células eucarióticas (Liu *et al.*, 1991; Leathy *et al.*, 1999) e desempenha um papel

importante na estimulação da resposta imune e na transdução de sinal durante a ativação de células T (Clipstone *et al.*, 1992).

Na resposta imune, as células T reconhecem o antígeno via receptor de célula T (RCT) e a ligação do receptor de célula T e de seus co-receptores (CD28) aos complexos peptídeos antigênicos – moléculas de histocompatibilidade (MHC), nas células apresentadoras de antígenos (APCs). Esta ligação inicia eventos de sinalização proximal que resultam na ativação de proteínas tirosina quinases (PTKs), ocorrendo ativação da fosfolipase C (PLC γ 1) que catalisa a hidrólise de um fosfolípido de membrana plasmática chamado fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP $_2$) gerando dois produtos de degradação do PIP $_2$, o diacilglicerol (DAG) e o inositol 1,4,5-trifosfato (IP $_3$).

Esses dois produtos de degradação ativam duas vias distintas de sinalização nas células T. O DAG é hidrofóbico e permanece na membrana onde ativa as proteínas quinases (PKCs). A ativação destes fatores durante a estimulação de célula T pode ser induzida por sinais que são transmitidos diretamente por diferentes vias, tal como a via da proteína quinase (RAS-MAPK) e a via da (PKC), que são ativadas por estímulos do RCT e outros receptores. O segundo produto do PIP $_2$, o IP $_3$ produz dentro de minutos de ativação da célula T, um rápido aumento de Ca $^{2+}$ (Macian, 2005).

O Ca $^{2+}$ citosólico livre se liga à calmodulina, uma proteína reguladora dependente de Ca 2 . Os complexos cálcio-calmodulina ativam várias enzimas, inclusive a calcineurina, que é responsável pela ativação de um fator de transcrição nuclear das células T ativadas (NFAT) (Northrop *et al.*, 1994). Após sua entrada no núcleo o NFAT interage com a proteína de ativação 1 (AP1) e outros fatores transcricionais que promovem a transcrição gênica necessária

para expressão de citocinas, destacando entre elas, a IL-2.

O fator nuclear κB (NF- κB) também influe na transcrição de citocinas. Ele permanece no citoplasma na forma inativa ligada a proteínas inibidoras (I κB). O estímulo via receptor de células T induz à fosforilação da serina do (IKK) e posterior degradação que impede ligação dela com o NF- κB . Este, ao ser liberado, transloca-se para o núcleo onde contribue para a ativação transcricional de múltiplos genes e receptores de citocinas (Macian, 2005) **(Figura 1)**.

As citocinas têm importância crucial no desenvolvimento, diferenciação e regulação do sistema imune. As células T CD4 se diferenciam em no mínimo duas subpopulações: Th1 e Th2. As células T helper (Th) podem produzir citocinas com perfil predominante Th1, pró- inflamatório e citocinas com perfil predominante Th2, regulador.

A resposta imune pode indicar uma produção de citocinas equilibrada ou desequilibrada com predomínio de resposta pró-inflamatória sobre a reguladora ou vice-versa.

Entre as citocinas com perfil pró-inflamatório, destaca-se, a IL-2 que é uma citocina produzida pelas células T ativadas via receptor de células T e CD28, é responsável por estimular a proliferação de células T antígeno específica, células NK e células B.

A IL-2 promove também a sobrevivência das células pela indução de proteínas antiapoptóticas. Além de estimular a expansão clonal de células T e a produção de INF γ e TNF α , a IL-2 induz a diferenciação de células Th2 que produzem IL-4. O INF γ é uma citocina pró-inflamatória produzida pelos linfócitos T e pelas células matadoras naturais (NK), cuja principal função é

ativar os macrófagos nas respostas imunes inatas e adquiridas mediadas por células.

O fator de necrose tumoral (TNF) é outra citocina pró-inflamatória produzida principalmente por fagócitos mononucleares ativados, estimula o recrutamento de neutrófilos e de monócitos para os sítios de infecção na tentativa de erradicá-la. O TNF é capaz de estimular as células do endotélio vascular a expressar moléculas de adesão, induzir os macrófagos e células endoteliais a secretarem quimiocinas e promover apoptose das células-alvo. Nas infecções graves há uma alta produção de $\text{TNF}\alpha$ com efeito sistêmico (Abbas, 2002).

Da mesma forma que há um mecanismo inicial para a produção de citocinas pró-inflamatórias há a produção de citocinas com perfil regulador da resposta imune.

A IL-4 é uma citocina produzida principalmente pela subpopulação Th2 (reguladora) das células T CD4 auxiliares e funciona como um fator de crescimento autócrino para células Th2 diferenciadas. Ela antagoniza os efeitos do $\text{INF}\gamma$ pelos macrófagos e desse modo inibe as reações imunes mediadas pela célula. A IL-4 é a principal citocina que, na cadeia pesada de imunoglobulinas, estimula a troca de classe pelo isotipo IgE na célula B.

Outra citocina com perfil Th2 regulador é a IL-5. Ela é uma citocina produzida pelas células T CD4 do tipo Th2 e por mastócitos ativados que estimulam o crescimento e a diferenciação dos eosinófilos e ativação dos eosinófilos maduros. Estimula a produção de células B e a produção de anticorpos IgA. Outra citocina reguladora é a IL-10, produzida pelos macrófagos e por algumas células T auxiliares com a principal função de inibir

os macrófagos ativados e manter o controle das reações imunes inatas e mediadas por células. (Abbas, 2002; O'Shea *et al.*, 2001).

O RCAN1 em leucócitos inibe a subunidade A da calcineurina (Hubbard *et al.*, 1989) e impede a defosforilação de fatores nucleares ativados (NFAT). O NFAT se mantém na forma inativa no citosol e não migra para o núcleo e promove uma diminuição de ativação das células T e conseqüentemente da produção de citocinas, principalmente a IL-2. A inibição da calcineurina por via indireta impede a defosforilação do complexo (IKK) I κ B/NF- κ B e a ativação do NF- κ B à medida que inibe a sua translocação para o núcleo e mantém o complexo inativo mais estável (Kim *et al.*, 2006; Parry *et al.*, 2003; Aubareda *et al.*, 2006) **(Figura 2)**.

Figura 2- Mecanismo de Inibição da calcineurina pelo RCAN1
Figura adaptada de Macian, 2005.

Além de participar no mecanismo de ativação de células T, a calcineurina participa na resposta celular a vários estímulos extracelulares e estresses ambientais. Tem papel importante na via de regulação da apoptose (Shibasaki *et al.*, 1995; Krebs *et al.*, 1998; Asai *et al.*, 1999; Honig *et al.*, 2000; Kayyali *et al.*, 1997; Zhuo *et al.*, 1999), em processos adaptativos bem como na diferenciação e no crescimento muscular tanto cardíaco como esquelético (Mansuy *et al.*, 1998; Winder *et al.*, 1998, Chin *et al.*, 1998, Hughes 1998).

Os efeitos da inibição da calcineurina pelo RCAN1 são demonstrados em outros tecidos. Em tecido nervoso a superexpressão transitória do gene RCAN1 é responsável por impedir o estresse oxidativo e mediado por cálcio e a superexpressão crônica está relacionada à doença de Alzheimer (Ermak *et al.*, 2002). No coração de modelo animal, verifica-se inibição de hipertrofia (Leinwand 2001) e importância no desenvolvimento cardíaco e da válvula (Wu *et al.*, 2007).

No endotélio, a inibição da calcineurina já demonstrou resposta anti-inflamatória (Qin *et al.*, 2006). Em endotélio de veia de cordão umbilical humana (HUVEC) tratada com fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) e trombina há inibição do NFAT (Minami *et al.*, 2004) com regulação negativa do RCAN1 em genes de trombina e de moléculas de adesão vascular (VCAM) ocasionando um mecanismo anti-inflamatório (Minami *et al.*, 2006). Além disso, o gene RCAN1 interage fisicamente com as integrinas e regula negativamente genes inflamatórios das células endoteliais (Kim *et al.*, 2006), envolvidos no mecanismo de angiogênese e possivelmente na metástase de tumores (Lizuka *et al.*, 2004; Hesser *et al.*, 2004).

1.4 Aterosclerose

Com a observação da influência do RCAN1 em mecanismos inflamatórios e no sistema cardiovascular cabe especular sobre uma relação entre a expressão desse gene e a “proteção” contra aterosclerose em indivíduos com SD. A aterosclerose na população com síndrome de Down é mal conhecida e promove controvérsias. Alguns estudos sugerem “proteção” contra aterosclerose (Murdoch *et al.*, 1977) mas outros discordam dessa afirmativa (Zamorano *et al.*, 1991; Salo *et al.*, 1979). Os dados, porém, indicam menor acometimento por doenças isquêmicas do coração (Morrison *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2002).

Quanto aos fatores de risco para aterosclerose descreve-se: a) prevalência elevada de sobrepeso, obesidade e sedentarismo; b) perfil lipídico diferenciado e potencialmente de risco (elevação das taxas de triglicérides, apoliproteína B, colesterol total, LDL colesterol com expressão do receptor de LDL reduzida) (Nishida *et al.*, 1977; Salo *et al.*, 1979; Pueschel *et al.*, 1992; Corsi *et al.*, 2005), assim como perfil inespecífico, semelhante a indivíduos portadores de outras formas de deficiência mental e mesmos hábitos de vida (Lacko *et al.*, 1983; Dorner *et al.*, 1984, Gorska *et al.*, 1976). c) redução dos níveis de pressão arterial (Morrison *et al.*, 1996), do inibidor do ativador plasminogênio tecidual (PAI-1) e homocisteína (Hopkins *et al.*, 2000; Nordstrom *et al.*, 1992).

A fisiopatologia da aterosclerose envolve inflamação e resposta imune tanto inata quanto adquirida.

No envolvimento da *imunidade inata* (**Figura 3A**), o LDL circulante sofre

oxidação no subendotélio e é englobado pelo macrófago por meio do receptor CD36 (Ohgami, *et al.*, 2001). O macrófago que expressa na sua superfície a molécula de CD14, torna-se célula espumosa e passa a liberar uma série de fatores inflamatórios citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Esses fatores são responsáveis pelo aumento da expressão de moléculas de adesão que levam ao recrutamento e rolamento de mais células inflamatórias, tais como, células NK, monócitos e células B1. As citocinas promovem a liberação hepática de proteínas de fase aguda; proteína-C-reativa (PCR), interleucina-6 (IL-6), fibrinogênio, complemento e ferritina, entre outras.

Na resposta *imune adquirida* (**Figura 3B**), antígenos como “Heat shock protein” (Hsp), outros antígenos infecciosos e LDL oxidado são processados por APCs (macrófagos, células dendríticas e células B) e são apresentados aos linfócitos T por meio de moléculas MHC de classes I ou II. Os linfócitos T helper são ativados (via segundo sinal) por moléculas B7-1 e B7-2 e se diferenciam em linfócitos T com resposta pró-inflamatória (Th1) ou resposta reguladora (Th2).

Por outro lado, o antígeno pode ativar as células B direta e indiretamente. A ativação direta promove diferenciação e produção de anticorpos e a ativação por via indireta ocorre via ligação linfócito T que expressa na superfície o CD40 com a molécula de superfície CD40L, do linfócito B. Esta cascata de processos libera uma série de citocinas e diferencia o padrão de resposta imune (Getz, 2005; Nilsson 2005).

Figura 3 - Resposta imune e aterosclerose

A. Imunidade Inata

B. Imunidade adquirida

Adaptada de Getz *et al.*, 2005.

A inflamação caracteriza todas as fases da aterosclerose e promove a fisiopatologia do início com a formação da placa até a ruptura que leva a oclusão do vaso e o infarto. No caso da doença aterosclerótica crônica alguns marcadores inflamatórios podem fornecer informações que auxiliam a prever evento aterotrombótico futuro. Na prática clínica, a proteína-C-reativa é utilizada com frequência e há outros marcadores menos usados que são: Fibrinogênio, IL-6, IL-18, TNF α , ICAM-1, VCAM-1, P-selectina, CD40L e matrix metaloproteinase-9 (MMP-9) (Ridker *et al.*, 2004).

O predomínio na produção de citocinas reguladoras ocasiona melhor evolução e prognóstico nas síndromes coronarianas agudas. No estudo

CAPTURE “C7E3 Anti Platelet Therapy in Unstable Refractory angina” foi observado um melhor prognóstico quando houve um predomínio de IL-10, citocina reguladora (Heeschen *et al.*, 2003) e no estudo CARE “Cholesterol And Recurrent Events” sobre prevenção secundária, o fato de haver altos níveis de TNF α citocina pró-inflamatória foi associado a recorrência de infarto agudo do miocárdio e risco elevado de morte de causa cardiovascular (Ridker *et al.*, 2000).

O presente estudo foi motivado pela necessidade de se aprofundar os conhecimentos gerais sobre as peculiaridades da resposta imune humoral e celular em adultos com síndrome de Down e particularmente avaliar os mecanismos de ação do gene RCAN1.

2. Objetivos

Objetivos do Estudo

2.1 Analisar os aspectos do perfil imunológico humoral e celular nos indivíduos adultos com síndrome de Down e comparar com os deficientes mentais sem síndrome de Down.

2.2 Analisar a expressão quantitativa do gene RCAN1 e relacionar os achados com a produção de citocinas na síndrome de Down.

3. Métodos

3.1 Casuística

3.1.1 População do estudo

a) Grupo síndrome de Down (SD): Foram incluídos 24 indivíduos com cariótipo de trissomia livre do cromossomo 21 (TL). A amostra de 24 indivíduos com idade média de $38,21 \pm 8,33$ anos foi composta por 16 indivíduos do sexo masculino e 8 do sexo feminino (**Anexo A**).

b) Grupo controle (CTR): Foram incluídos 21 indivíduos com deficiência mental e cariótipo normal ou com exclusão pelo exame citogenético de trissomia do cromossomo 21, com idade média de $43,19 \pm 8,46$ anos composto por 15 indivíduos do sexo masculino e 6 do sexo feminino (**Anexo B**).

c) Grupo saudável (SAUDÁVEL):

Foram incluídos 8 indivíduos voluntários saudáveis, com média de idade de $39,50 \pm 6,84$ anos composto por 6 mulheres e 2 homens. Este grupo foi utilizado como referência em alguns experimentos realizados (**Anexo C**).

3.1.2 Critérios de exclusão

Indivíduos com síndrome de Down com cariótipo de mosaico ou de translocação do cromossomo 21.

3.2. Metodologia

Foram convocados semanalmente três pacientes provenientes da APAE SP, acompanhados no Ambulatório de Cardiogeriatría do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A escolha do grupo controle visa manter pareamento quanto a fatores externos e ambientais, pela convivência dos dois grupos na APAE-SP.

Após o contato com a Assistente Social da APAE-SP e o agendamento, os pacientes compareceram a consulta, onde foi realizada a anamnese e exame físico completo e assinatura do TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) pelo responsável. Os pacientes foram encaminhados ao Laboratório Central (HCFMUSP) onde foram coletados aproximadamente 25 mL de sangue periférico e realizados os exames laboratoriais para os seguintes procedimentos:

3.2.1 Hemograma

O hemograma foi realizado em contador automatizado a partir de 2 mL de sangue anticoagulado em tubo com EDTA. Foram considerados normais valores de hemoglobina (g/dL) e de hematócrito (%) 13-18 g/dL e 40 a 52% no homem, 12-16 g/dL e 35-47% na mulher, respectivamente. Os valores de referência para volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram 80 a 100 micra³, 27 a 32 pg e 32 a 37 g/dL, respectivamente. Os

leucócitos têm valor de referência que variam de 4 a 11 mil/mm³; neutrófilos de 2 a 7 mil/mm³, linfócitos de 0,5 a 3,4 mil/mm³, eosinófilos de 0 a 0,7 mil/mm³, basófilos de 0 a 0,2 mil/mm³, monócitos de 0,1 a 1,0 mil/mm³ e os valores normais de plaquetas foram de 140 a 450 mil/mm³.

3.2.2 Sorologias

3.2.2.1 Dosagem de imunoglobulinas (IgG, IgM e IgA)

O método utilizado foi de Imunoturbidimetria. Esta metodologia permite a determinação quantitativa de IgM, IgG e IgA no soro humano por imunoprecipitação, na presença de um polímero ativador que aumenta a sensibilidade e a velocidade do ensaio. As imunoglobulinas do soro do paciente formam, com o antisoro específico um complexo insolúvel, produzindo turbidez, cuja intensidade aumenta a absorbância que foi proporcional a concentração de IgA, IgG e IgM da amostra. Os valores adotados como normais para adultos foram para IgA: 69 a 382 mg/dL; IgG: 700 a 1600 mg/dL e IgM: 40 a 230 mg/dL.

3.2.2.2 Dosagem de complemento (C3, C4)

A dosagem de complemento foi realizada pelo método de Nefelometria que é baseado na medida da intensidade de luz dispersada pela presença de partículas em suspensão quando um feixe de luz passa através da sua célula de fluxo (ou de reação). As partículas são formadas por uma reação de imunoprecipitação que ocorre quando um anticorpo específico entra em contato com seu antígeno específico. O método foi realizado de forma automatizada no aparelho BN-II (Dade Behring, Alemanha). O método utilizou cerca de 1 mL de soro e foram dosadas a fração C3 e C4 do complemento e foram considerados como valores de referência, respectivamente: 90 a 180 mg/dL e 10 a 40 mg/dL.

3.2.2.3 Antiestreptolisina O (ASLO)

A análise do ASLO foi realizada por Nefelometria automatizada no aparelho BN-II (Dade Behring, Alemanha) e o valor considerado normal foi < 200 UI/mL. O princípio do método foi descrito no item 3.2.2.2.

3.2.2.4 Proteína-C-Reativa (PCR)

A dosagem do PCR foi realizada por Nefelometria automatizada (como descrito no item 3.2.2.2) no aparelho BN-II (Dade Behring, Alemanha) com valor normal menor que 3 mg/L. Pelo método nefelométrico, a aglutinação das partículas recobertas por anticorpos anti-PCR foi mensurada pela intensidade da luz refletida, utilizando-se o equipamento BN-II.

3.2.2.5 Sorologia para mononucleose infecciosa

O método padronizado foi ELISA (Enzimaimunoensaio); (PanBio, Austrália). Os valores de referência foram para IgM : (negativo <0,9 UA/mL e positivo $\geq 1,1$ UA/mL) e para IgG: (negativo < 0,9 UA/mL e positivo $\geq 1,1$ UA/mL).

3.2.2.6 Sorologia para rubéola

O método utilizado foi ELISA (Enzimaimunoensaio) automatizado no aparelho Cobas Core II (Roche Diagnostics, Suíça). Os valores de referência para IgM foram: negativo quando densidade ótica (DO) ($= 0,01$), menor que o controle negativo da reação ($= 0,07$), inconclusivo $\pm 10\%$ do controle negativo da reação, positivo DO maior que o controle negativo da reação. Para IgG valor negativo <10 UI/mL e positivo ≥ 10 UI/mL.

3.2.2.7 Sorologia para citomegalovírus

O método utilizado foi ELISA (Enzimaimunoensaio) automatizado no aparelho Cobas Core II (Roche Diagnostics, Suíça). Os valores de referência considerados para IgM foram: negativo quando DO ($=0,08$) menor que o controle negativo da reação ($=0,25$), inconclusivo $\pm 1\%$ do controle negativo da reação e positivo DO maior que controle negativo da reação. Para IgG o valor negativo foi $< 0,5$ UI/mL, inconclusivo de $0,5$ a $0,7$ UI/mL e positivo foi $> 0,7$ UI/mL.

3.2.2.8 Sorologia para sarampo

O método utilizado foi a Imunofluorescência Indireta (IFI) (Hemagen/Virgo, EUA). Os valores de referência para IgM e IgG foram: positivo e negativo.

3.2.2.9 Sorologia para toxoplasmose

O método utilizado foi ELISA (Enzimaimunoensaio) automatizado no aparelho Cobas Core II (Roche Diagnostics, Suíça). Os valores de referência para IgM foram: negativo DO ($=0,07$) menor que o controle negativo da reação ($=0,32$), inconclusivo $\pm 10\%$ do controle negativo, positivo DO maior que o controle negativo. O valor de IgG foi negativo $<$ que 6 UI/ml e positivo $>$ que 6 UI/mL.

3.2.2.10 Sorologia para hepatite B

A sorologia foi realizada pelo método de ensaio imunoenzimático em micropartículas (MEIA) automatizado no aparelho AxSYM (Abbott, EUA).

O valor de anti HBc total (MEIA competitivo) determinado foi: negativo (índice $>1,0$) e positivo (índice $\leq 1,0$) e para o antígeno AgHBs foi: negativo (índice $<2,0$) e positivo (índice $\geq 2,0$). O anti HBs tem valor negativo < 10 UI/mL e positivo ≥ 10 UI/mL.

3.2.3 Separação de células mononucleares do sangue periférico

As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram obtidas por meio de separação por gradiente de Ficoll Hypaque (densidade 1,078 g/mL) (Boyum, 1974). Aproximadamente 20 mL de sangue coletado com heparina, foi diluído na proporção 1:2 com solução salina 0,9% estéril e 9 mL desta solução foi adicionada sobre um volume de 3 mL de solução de Ficoll Hypaque. Após 25 minutos de centrifugação a 1.800 rpm, formou-se uma “nuvem”, que são as células mononucleares localizadas entre a interface do Ficoll Hypaque e o plasma diluído. Esta camada foi retirada com uma pipeta “Pasteur” e transferida para um tubo “Falcon” de 50 mL que teve o volume completado com solução salina (0,9%). Seguiu-se com centrifugação por 8 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi aspirado com uma pipeta “Pasteur” acoplada a vácuo e o botão celular foi ressuspensionado em 10 mL de solução salina (0,9%) e centrifugado por 8 min a 1800 rpm. O sobrenadante foi aspirado e o botão celular foi ressuspensionado em 10 mL de solução salina (0,9%) e novamente centrifugado por 8 min a 1100 rpm para retirada de plaquetas. O sobrenadante foi aspirado e o botão celular foi ressuspensionado em 3 mL de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) adicionado a 10% de Soro fetal bovino. O total de células obtidas foi avaliado por contagem em câmara de Neubauer.

3.2.3.1 Cultura de células mononucleares de sangue periférico

A cultura celular foi realizada em placa de fundo U e foi utilizado 5×10^5 células mononucleares ressuspensas em DMEM por poço. O volume final por poço foi de 200 μ L, completado com DMEM adicionado a soro fetal bovino 10%. As CMSP foram mantidas em cultura por 48h em estufa CO₂ a 27°C. Após este período, a placa foi centrifugada por 8 min a 1800 rpm para a retirada do sobrenadante. Um total de 100 μ L foi transferido para um Eppendorf de 1,5 mL e armazenado em freezer a -80°C.

3.2.3.2 Armazenamento de células para extração de RNA e para imunofenotipagem

Parte das CMSP foram reservadas para extração de RNA e para congelamento em nitrogênio para realização de imunofenotipagem, ou seja, para caracterização de subpopulações celulares por citometria de fluxo. As CMSP (5×10^6 células) foram conservadas em 1 mL de solução de Trizol (Invitrogen) e mantidas em freezer a -80°C para posterior extração de RNA e transcrição para cDNA para realização de qRT-PCR (PCR em tempo real) para o gene RCAN1 (**Anexos D; E e F**).

3.2.3.3 Concentração de citocinas

A detecção da concentração de citocinas foi realizada em sobrenadante de cultura celular, descritas no item 3.2.3.5 por meio de citometria de fluxo utilizando o kit CYTOMETRIC BEAD ARRAYS (CBA).

A concentração de citocinas foi baseada em uma curva padrão, obtida por meio de diluição da amostra padrão do kit (conjunto de todas as citocinas). Foram realizadas diluições seriadas de 1:2 a 1:256, que correspondeu a concentração de 5000 a 20 pg/mL.

Foi adicionado 50 µL da mistura de beads de captura de citocinas para cada tubo da amostra e curva padrão e foi adequado o volume de cada bead de acordo com o necessário. Foi adicionado 50 µL do reagente de detecção Th₁/Th₂ PE (Ficoeritrina) do tubo B, nos tubos contendo amostra e curva padrão com exceção do controle negativo. Em seguida foi incubado por 3 horas em T⁰A (temperatura ambiente) ao abrigo da luz. Após a incubação, foi adicionado 1 mL de tampão de lavagem em cada tubo e o material foi centrifugado a 1500 rpm por 5 min. O sobrenadante foi retirado por inversão e adicionado 300 µL do tampão de diluição da amostra em cada tubo para aquisição em citômetro. Previamente a aquisição foi realizada a calibração do citômetro. Para isso, 50 µL de beads setup (tubo D) foram adicionados em três tubos, nomeados A, B e C. Foi adicionado 50 µL de controle FITC (Isotiocianato de Fluoresceína) ao tubo B e 50 µL de controle PE (Ficoeritrina) ao tubo C. Seguiu-se com incubação por 30 min em T⁰A (temperatura ambiente) ao abrigo da luz. Após incubação foi adicionado 450 µL de tampão

de lavagem ao tubo A e 400 μ L de tampão de lavagem aos tubos B e C. A aquisição e análise foram realizadas pelo programa FKAP (*Becton & Dickison*). A leitura da curva de aquisição começou a partir de 20 até 5000 pg/mL e de acordo com a diluição da curva padrão os valores abaixo e acima destes podem passar por leitura, porém, não tem grau de confiabilidade dado pelo método. Todos os valores abaixo de 20 foram considerados (<20) e acima de 5000, (>5000). Os Gráficos 1 e 2 são exemplos de gráficos de aquisição.

Gráfico 1 - Controle negativo para as citocinas.

Gráfico 2 - Representa a positividade para IL-10 e $TNF\alpha$.

3.2.3.4 Congelamento e descongelamento de células para realização de citometria

Congelamento: A suspensão de células mononucleares obtidas por gradiente de Ficoll - Hypaque foram centrifugadas por 8 minutos a 1800 rpm e em seguida após remoção do sobrenadante o botão celular foi ressuspendido em 1000 µL de solução de congelamento (90% de soro fetal bovino adicionado de 10% de DMSO (dimethyl sulfoxide - *Sigma*) e armazenado no nitrogênio líquido.

Descongelamento: O tubo contendo as células foi imediatamente imerso em banho-maria a 37 °C e antes do descongelamento completo, a suspensão foi transferida para um tubo contendo 10 mL de DMEM completo adicionado de 10% de soro fetal bovino. As células foram centrifugadas a 1800 rpm por 8 minutos e ressuspensas em DMEM. Em seguida foi verificada a viabilidade celular com Tripan-blue e realizada a contagem de células com câmara de Neubauer.

3.2.3.5 Citometria de Fluxo – IMUNOFENOTIPAGEM

Para realização de Imunofenotipagem foram utilizadas concentrações celulares que variaram de 4 a 6×10^6 células. As subpopulações celulares foram caracterizadas pela técnica de imunofluorescência por meio de citometria de fluxo, que determina e quantifica a expressão de moléculas de superfície ou intracelulares, mediante a utilização de anticorpos marcados com substâncias fluorescentes ou fluorocromos. Para caracterização fenotípica foi utilizado o marcador para linfócito T total que é o CD3 (*cluster of differentiation*). A caracterização de linfócitos CD3⁺ incluiu a quantificação das subpopulações CD4 e CD8. O marcador utilizado para caracterização de linfócitos B foi o CD19 e para monócito foi o CD14. A quantificação de células "natural killer" (NK) se fez pela identificação de CD16 e CD56. A presença de um ou dois destes marcadores em células CD3 negativas caracterizou a população NK. Os anticorpos monoclonais utilizados foram: o anti-CD3 marcado com ficoeritrina e Indotricarbocianina (PE CY5), anti-CD4 marcado com ficoeritrina (PE), anti-CD8 marcado com isocianato de fluoresceína (FITC), anti CD16 marcado com FITC, anti CD40L marcado com FITC, o anti CD56 marcado com PE, anti-CD14 marcado com PE e anti CD19 marcado com PE (*Becton & Dickison*). Todos os anticorpos utilizados na imunofenotipagem foram previamente titulados utilizando as seguintes concentrações: 1:25; 1:50 e 1:100. A aquisição e análise das amostras foi feita no FACSCALIBUR com o programa CELLQUEST.

Os resultados das titulações dos anticorpos monoclonais estão demonstrados nas Figuras 4 a 11.

Figura 4 - Controle Negativo da imunofenotipagem

A. Avaliação de tamanho *Forward Scatter* (FSC) e granulosidade *Side Scatter* (SSC).

B. Controle negativo para as fluorescências.

Figura 5 - Titulação do anti CD3 CY5 (1:25, 1:50, 1:100)

A. Anti CD3 CY5 1:25 com 29,50% de positividade.

B. Anti CD3 CY5 1:50 com 67,97% de positividade.

C. Anti CD3 CY5 1:100 com 57,45% de positividade.

Figura 6 - Titulação do anti CD19 PE (1:25, 1:50, 1:100)

A. Anti CD19 PE 1:25, com 9,93% de positividade.

B. Anti CD19 PE 1:50, com 9,55% de positividade.

C. Anti CD19 PE 1:100, com 10,48% de positividade.

Figura 7 - Titulação do anti CD4 PE (1:25, 1:50, 1:100)

A. Anti CD4 PE 1:25, com 49,22% de positividade.

B. Anti CD4 PE 1:50, com 50,92% de positividade.

C. Anti CD4 PE 1:100, com 51,18% de positividade.

Figura 8 - Titulação do anti CD8 FITC (1:25, 1:50, 1:100)

A. Anti CD8 PE 1:25, com 27,89% de positividade.

B. Anti CD8 PE 1:50, com 23,76% de positividade.

C. Anti CD8 PE 1:100, com 21,42% de positividade.

Figura 9 - Titulação do anti CD16 FITC (1:25, 1:50, 1:100)

- A.** Anti CD16 FITC 1:25 com 4,82% de positividade.
- B.** Anti CD16 FITC 1:50, com 4,03% de positividade.
- C.** Anti CD16 FITC 1:100, com 4,50% de positividade.

Figura 10 - Titulação do anti CD56 PE (1:25, 1:50, 1:100)

- A.** Anti CD56 PE 1:25, com 9,08% de positividade.
- B.** Anti CD56 PE 1:50, com 7,37% de positividade.
- C.** Anti CD56 PE 1:100, com 7,09% de positividade.

Figura 11 - Titulação do anti CD14 PE (1:25, 1:50, 1:100)

A. Para esta análise é traçada uma região de monócitos (R2).

B. Anti CD14 PE 1:25, com 91,55% de positividade.

C. Anti CD14 PE 1:50, com 87,95% de positividade.

D. Anti CD14 PE 1:100, com 87,78% de positividade.

De acordo com a titulação prévia realizada, foi optado por utilizar a concentração 1:25 para os anticorpos anti CD4 PE, CD8 FITC, CD16 FITC, CD19 PE e CD56 PE, 1:50 para os anticorpos anti CD14 PE e CD40L FITC e 1:10 para o anticorpo anti CD3 PECY5.

As células foram distribuídas na concentração de 2×10^5 /poço em placa de polipropileno com 96 poços de fundo U (*Becton & Dickison*). As placas foram centrifugadas a 4 °C (Sorvall) a 1800 rpm durante 5 minutos. Os sobrenadantes foram desprezados e os botões celulares homogeneizados em agitador de placa. Em seguida, as células foram incubadas durante 30 minutos a 4 °C ao abrigo da luz, com 25 µL dos anticorpos monoclonais marcados e nas diluições específicas. Após o período de incubação, as células foram lavadas três vezes em tampão FACS por centrifugação a 1800 rpm por 5 minutos. Em seguida foram ressuspendidas em 400 µL de solução de paraformaldeído 2% com 0,02% de azida sódica e mantidas a 4°C até o momento da aquisição. As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo (FACSCALIBUR), utilizando um controle negativo contendo só células, um controle positivo para cada fluorescência. Foram adquiridas 10000 células na região específica de linfócitos e monócitos (*gate*). Após aquisição seguiu-se a análise de resultados conforme tamanho e granulosidade das células.

3.2.4 Expressão quantitativa do gene RCAN1

3.2.4.1 Extração do RNA

Este método de extração é baseado no protocolo de Chomzynski e Sacchi (1987) que utiliza Trizol (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) para isolamento de RNA total de células ou tecidos. O Trizol é uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, que rompe a célula mantendo a integridade do RNA. Em média, 3 a 6×10^6 células mantidas em cultura foram ressuspensas em 1 mL de Trizol. Esta solução foi homogeneizada e então incubada por 5 minutos a temperatura ambiente, para permitir completa dissociação de complexos de nucleoproteínas. Em seguida foi adicionado 0,2mL de clorofórmio, seguido de agitação vigorosa por aproximadamente 15 segundos e posterior incubação por 2 a 3 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12000 rpm a 4°C para obtenção de três fases (aquosa, interfase e orgânica). A fase aquosa foi para um novo tubo contendo 0,5 mL de álcool isopropílico seguido de incubação por 10 min a temperatura ambiente, para precipitação do RNA. Foi realizada nova centrifugação a 12000 rpm por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi removido e ao “pellet” de RNA foi adicionado 1mL de etanol 75% em água DEPC (Dimetil pirocarbonato) seguido de centrifugação a 7500 rpm por 5 minutos a 4°C. Em seguida manteve-se o tubo aberto por 5 a 10 min para total evaporação do etanol e o RNA foi ressuspensado com 10 µL de água tratada com DEPC, seguindo-se com a leitura da concentração (**Anexos G; H; I**).

3.2.4.2 Quantificação de RNA e Tratamento com DNase

Após extração, o RNA obtido foi quantificado por meio de leitura no espectrofotômetro (Nanodrop) nos comprimentos de onda (λ) de 260 nm (RNA) e 280 nm (proteína). O grau de pureza da amostra foi avaliado através da relação das leituras 260 e 280 nm, sendo considerados ideais os valores entre 1,8 e 2,0. Os resultados foram obtidos em ng/ μ L onde o valor de densidade ótica (DO) igual a 1, no comprimento de onda de 260 nm correspondeu a 40 μ g de RNA (Sambrook 1989). Uma alíquota do RNA foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1% para visualização da integridade das amostras observando as subunidades do RNA ribossômico, 18S e 28S, e também possíveis contaminações com DNA (**Figura 12**).

Figura 12 - Avaliação da integridade das amostras de RNA por eletroforese em gel de agarose. 1 μ g de RNA de cada amostra foi carregado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL) e submetido à corrida eletroforética a 100 V durante 40 minutos. Ao início da figura observa-se o marcador de peso molecular de 100pb (Ladder 100bp, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Para evitar possíveis contaminações com DNA, o RNA foi tratado com rDNase, de acordo com a recomendação do fabricante. Adicionou-se para cada 1 µg de RNA total 1 unidade de rDNase I (DNase recombinante bovina Usb, USA), 1 µL de tampão 10x rDNase e água DEPC q.s.p. para 9 µL, e a reação foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos. Após o tempo de incubação foi adicionado 1 µL da solução de inativação da enzima para cada 1 µg de RNA total, e incubou-se por 10 minutos a 65°C. Para avaliar a qualidade do RNA após o tratamento com DNase I, 1µg de RNA tratado foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1%. As amostras foram consideradas adequadas quando as bandas de 28S e 18S se mostraram íntegras e nenhum traço de DNA genômico foi detectado.

3.2.4.3 Transcrição reversa em DNA complementar (cDNA)

Após constatação da qualidade e pureza do RNA e do tratamento do RNA total com DNase, foi feita a transcrição reversa de 5µg de RNA total para cDNA utilizando a enzima transcriptase reversa Super-script II™ Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Para este protocolo foi adicionado ao RNA 1µL de oligodT (500 µg/mL), 1µL de dNTP (10mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e água DEPC *q.s.p.* 20µL. Esta mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos em termociclador (MJ research, Inc. Watertown, MA, USA). Em seguida foram adicionados ao tubo de reação 4µL de tampão de transcrição 5x, 2µL de DTT 0,1M e 1µL de inibidor de RNase (40U/µL) (RNase OUT™, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As amostras foram então colocadas em termociclador a 42°C por 2 minutos. Por último foi adicionado 1µL da enzima transcriptase reversa (200U/µL), e esta solução foi colocada novamente em termociclador a 42°C por 50 minutos seguidos de 70°C por 15 minutos. Ao final da transcrição o cDNA foi mantido a -20°C.

3.2.4.4 PCR (Reação de Polimerização em Cadeia)

Para confirmação da eficiência da transcrição, foi realizada uma reação de PCR para o gene β -actina. Para este protocolo foi adicionado cDNA correspondente aproximadamente 5% do transcrito, tampão para enzima (10mM Tris-HCl, 50KCl), 1,5mM $MgCl_2$, 2 μ M de DNTP, 1 μ M cada *primer* 1U de Taq polimerase (5U/ μ L)(Invitrogen) e água milliQ estéril *q.s.p.* 20 μ L. Esta reação foi aquecida em termociclador (MJ research, Inc. Watertown, MA, USA a 94°C por 2 minutos, 94°C por 1minuto (35 ciclos), 53°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e por último, uma extensão a 72°C por 5 minutos. A detecção dos produtos amplificados foi feita em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio (5 μ g/mL) (**Figura 13**).

Figura 13 - Avaliação dos produtos da PCR (96pb) para o gene β actina. Foi carregado 5 μ L do produto da PCR em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL) e submetido à corrida eletroforética a 100 V durante 40 minutos. Ao início da figura observa-se o marcador de peso molecular de 100pb (Ladder 100bp, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

3.2.4.5 Expressão Gênica - PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

3.2.4.5.1 Confeção dos primers

Os primers utilizados nas reações de qRT-PCR foram desenhados pelo programa *Primer Express* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O tamanho dos *primers* variou de 18 a 23 bases e o “melting point” de 59 a 61°C. O desenho das seqüências de primers para o gene RCAN1 foi realizado abrangendo os exons 5, 6 e 7 que são constantes em todas as isoformas para o gene (Tabela 1).

Tabela 1: Descrição e identificação dos genes estudados, seqüência dos primers utilizados e características do produto de amplificação

Gene Bank nº Acesso Gene Bank	Seqüência 5' → 3'	Tam Ampl	Tm Ampl	Concent/ Diluição	E
RCAN1 NM_203417	(F): CAGTTTCTGATCTCCCCTCC	127pb	81°C	100nM / 1:10	2,0
	(R): TCATACTTTTCCCCTGGCCC				
GAPDH NM_002046	(F): TGGTCTCCTCTGACTTCA	117pb	82°C	200nM / 1:10	2,0
	(R): AGCCAAATTCGTTGTCAT				

O número de acesso foi obtido no banco de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>). Tam Ampl - tamanho do produto de amplificação; pb - pares de base; Tm Ampl - temperatura do produto amplificado; Concent. / diluição - concentração de uso do primer e diluição de uso de cDNA; E – eficiência.

3.2.4.5.2 Reação de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

As reações de PCR em tempo real (RT-PCR) foram realizadas em triplicata, em placas específicas de 96 poços (Applied Biosystems) no equipamento “Perkin-Elmer ABI Prism 7500 sequence detection system”, usando o sistema para detecção de produtos de amplificação “SYBR-Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems, USA). A reação foi realizada em 40 ciclos de: 15 segundos a 94°C e 1 minuto a 60 °C, de acordo com o manual de instruções do fabricante ABI PRISM 7500. A determinação da intensidade de fluorescência na reação foi feita pelo cálculo do ΔRn ($\Delta Rn = Rn^+ - Rn^-$), onde Rn^+ = intensidade de emissão do SYBR Green / intensidade de emissão do ROX em um dado momento da reação, e Rn^- = intensidade de emissão do SYBR Green / intensidade de emissão do ROX, antes da amplificação. O composto ROX foi utilizado como controle interno passivo, pois a fluorescência que emite tem intensidade constante durante toda a reação. Durante os ciclos iniciais da reação não há acúmulo de produtos de amplificação e os valores de ΔRn permaneceram na linha de base (fluorescência do ROX > SYBR Green). Na fase logarítmica da reação há acúmulo dos produtos de amplificação e o ΔRn ultrapassou a linha de base. Para a quantificação relativa é estabelecido um valor de ΔRn , que correspondeu a uma linha de corte (*Threshold*) para cada curva de amplificação de um dado par de primers. O número do ciclo em que a ΔRn cruza o *threshold* corresponde ao Ct (*cycle threshold*) da amostra, que é o ciclo em que a reação atinge a fase exponencial. O valor de Ct é preditivo da quantidade de RNAm alvo presente na amostra e quanto menor o seu valor, maior é a quantidade de RNAm presente na amostra. O cálculo da

quantificação relativa foi feito pelo método de aproximação de Pfaffl (Pfaffl et al, 2001), utilizando como gene de referência (endógeno) GAPDH (D-gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase). Foram considerados os valores de $QR \geq 2$ genes regulados positivamente e $QR \leq 0,5$ genes regulados negativamente em relação a amostras de indivíduos saudáveis. A fórmula utilizada para a quantificação relativa (QR) é:

$$QR = 2^{-\Delta\Delta Ct}, \text{ onde } \Delta Ct = Ct_{\text{alvo}} - Ct_{\text{referência}}, \text{ e } \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{amostra}} - \Delta Ct_{\text{Controle}}$$

3.2.4.5.3 Concentração de uso dos primers

A concentração de uso de cada par de seqüências de primers foi inicialmente padronizada. Em reações de qRT-PCR foi utilizado um *pool* de cDNA de todas as amostras de miocárdio (CCC e CNI), onde foram testadas as concentrações de 100nM, 200nM, 300nM, 400nM e 500nM para cada par de seqüência de primers. Após as reações de qRT-PCR foram comparados os valores de Ct de cada par de primers em cada concentração e foi escolhida a concentração com base no valor de Ct, de forma que a concentração de primer não fosse um fator limitante da reação. Na **Tabela 1** é descrita a seqüência e características dos primers que foram utilizados nas reações de qRT-PCR.

3.2.4.5.4 Especificidade e adequação dos primers

A especificidade dos primers desenhados foi avaliada pela curva de dissociação. Para isso, após a reação, a placa foi submetida a um segundo programa: 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 95°C por 1 minuto. A curva de dissociação consiste na monitoração da fluorescência das amostras em relação ao aumento de temperatura. A fluorescência das amostras é proporcional à abundância de duplas fitas, nas quais se intercala o SYBR-Green e, portanto, decresce com o aumento da temperatura. Quando observamos somente um pico de fluorescência em uma dada temperatura significa que houve amplificação de um produto específico. Esta temperatura é a temperatura de anelamento do produto de amplificação (*amplicon*).

3.2.4.5.5 Cálculo da Eficiência

O cálculo da eficiência de cada par de primers foi realizado como sugerido em Pfaffl *et al.*, (2001). A avaliação da eficiência indica a real cinética de amplificação da sequência de primer testada, bem como sua reprodutibilidade e exatidão. Para calcularmos o valor da eficiência de cada par de primers (*F* e *R*), utilizou-se um *pool* de todas as amostras estudadas (*pool* cDNA). Em seguida diluiu-se esse pool em diluições seriadas (1:10 a 1:1250), e foram realizados ensaios de qRT-PCR, com cada primer de interesse, já padronizado quanto a sua concentração de uso. Após a reação de qRT-PCR, as médias dos valores de Ct das triplicatas de cada diluição foram utilizadas no cálculo da

eficiência. Para cada sequência de primers construímos um gráfico com base no valor logaritmo das diluições testadas (log ng RNA; eixo X), e pelos valores da média de Ct (eixo Y). O valor da inclinação da reta (slope) foi utilizado para determinar a eficiência dos primers para cada gene de interesse, com base na fórmula:

$$E = (10^{-1/\text{slope}}) - 1$$

Valores de eficiência entre 1,8 e 2,2 (100%) significam reprodutibilidade e exatidão na cinética de amplificação (Pfaffl, 2001^a; Pfaffl, 2001^b; Meijerink *et al.*, 2001). Através das curvas de eficiência também se determina a diluição de cDNA das amostras que são utilizadas nas reações de qRT-PCR para determinar a expressão de cada gene. Na **Tabela 1** é descrito o valor de eficiência de cada primer. O valor da eficiência, o gráfico da eficiência, a amplificação das amostras e a curva de dissociação são apresentadas na **Figura 14**. Após verificar que os experimentos preencheram todos os critérios de validação para qRT-PCR (eficiência e especificidade) e determinar a diluição cDNA a ser usada para quantificar cada gene de interesse, foram iniciados os experimentos de quantificação da expressão gênica.

Figura 14. Cálculo da eficiência para os genes RCAN1 e GAPDH.

A. Gráfico da eficiência onde são mostrados a equação da reta e o valor do coeficiente de angulação (slope -y) utilizado para o cálculo da eficiência.

B. Curva de Amplificação utilizada para verificar a eficiência de amplificação dos primers e no quadro interno a curva de dissociação mostrando a amplificação de um único fragmento para os primers testados. Quantidade de RNA presente em cada diluição: 1 cDNA diluído 1/10 (500ng RNA); 2 cDNA diluído 1/50 (100ng RNA); 3 cDNA diluído 1/250 (20ng RNA); 4 cDNA diluído 1/1250 (4ng RNA).

3.2.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo programa estatístico Graphpad Prism versão 3.0 e SPSS 15.0 for windows.

As variáveis contínuas foram representadas por meio de média e desvio padrão para distribuição normal e para as variáveis que não mostraram distribuição normal, a representação foi por meio de medianas e valores extremos. As variáveis categóricas foram representadas pela frequência de dados obtidos.

Foi considerada significância estatística quando $p < 0,05$.

O teste t student não pareado foi utilizado para análise de variáveis contínuas com distribuição normal e para os dados que não tiveram distribuição normal foi realizado o teste de Mannn Whitney.

A análise de mais de duas variáveis contínuas com distribuição Gaussiana normal foi realizada por análise de variância (ANOVA) e a análise posterior com o teste de Bonferroni. Quando os dados não tiveram distribuição normal foi realizado o teste de Kruskall Wallis com análise posterior pelo teste de Dunnett.

Alguns dados para melhor análise foram transformados em variáveis categóricas por meio de tabela de contingência. Nestes casos foram realizados os testes de Qui Quadrado (X^2) e o teste Exato de Fisher.

4. Resultados

4.1 Avaliação clínica dos pacientes

Os 45 indivíduos deficientes mentais incluídos no estudo (SD e CTR) foram avaliados clinicamente e os dados laboratoriais e ecodopplercardiográficos foram coletados de seus prontuários.

Os grupos SD e CTR apresentaram índice de massa corpórea compatíveis com sobrepeso, entretanto, sem diferenças significativas. Os valores de circunferência abdominal avaliados no sexo feminino e masculino não mostraram diferenças significativas. O grupo SD apresentou níveis de pressão arterial sistólica e diastólica que foram em média inferior ao do grupo CTR. Os valores de glicemia de jejum, colesterolemia total, LDL colesterol, HDL colesterol e trigliceridemia não mostraram diferenças nos dois grupos avaliados. O Índice de massa de ventrículo esquerdo analisado pelo ecodopplercardiograma apresentou parâmetros dentro da normalidade, no entanto, foi inferior no grupo SD comparado ao CTR com diferenças significativas (**Tabela 2**).

O ecodopplercardiograma do grupo SD mostrou 26% de prolapso da válvula mitral em (6/23) pacientes, 9% de insuficiência aórtica leve em (2/23) pacientes, 4% estenose pulmonar sem repercussão hemodinâmica em (1/23) pacientes. Foi verificada uma prevalência de 44% de hipotireoidismo no grupo SD.

Tabela 2 - Características clínicas e laboratoriais dos grupos síndrome de Down (SD) e Controle (CTR)

Variáveis Clínicas	Síndrome de Down SD (n=24) 8 ♀	Controle CTR (n=21) 6 ♀	p Teste t
IMC* (kg/m ²)	29,20 ± 5,97	27,99 ± 5,67	0,49
Circunferência abdominal ♀ (cm) ♂	89,38 ± 6,47 93,79 ± 16,46	88,08 ± 19,52 102,10 ± 11,46	0,86 0,20
Pressão arterial sistólica (mmHg)	113,60 ± 13,76*	126,30 ± 14,66*	<0,01
Pressão arterial diastólica (mmHg)	77,08 ± 8,82*	83,52 ± 11,69*	0,04
Glicemia (g/dL)	84,04 ± 10,60	90,67 ± 23,81	0,21
Colesterolemia total (mg/dL)	198,10 ± 36,01	182,10 ± 38,59	0,15
LDL-c (mg/dL)	128,60 ± 30,28	109,70 ± 38,97	0,07
HDL-c (mg/dL)	43,54 ± 8,78	45,38 ± 15,53	0,62
Trigliceridemia (mg/dL)	129,70 ± 74,25	145,80 ± 81,70	0,48
IMVE (g/m ²)	76,32 ± 13,42*	90,00 ± 15,34*	<0,01

HDL-c - Colesterol ligado a lipoproteína de alta densidade

IMC - Índice de massa corpórea

IMVE - Índice de massa de ventrículo esquerdo

LDL-c - Colesterol ligado a lipoproteína de baixa densidade

4.2. Hemograma

A comparação das taxas de hemoglobina, hematócrito, número de leucócitos e plaquetas nos dois grupos estudados não mostraram diferenças estatisticamente significativas. Não foi encontrado anemia, plaquetopenia, e houve apenas um caso de leucopenia discreta 3,50 mil/mm³ no grupo SD.

O volume corpuscular médio e a hemoglobina corpuscular média estão dentro dos parâmetros de normalidade, entretanto, com valores mais elevados no grupo SD ($p < 0,01$). Em contraste, os valores de eosinófilos no grupo SD foram inferiores em relação ao CTR ($p < 0,01$) e permanecem dentro dos parâmetros de normalidade (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Hemograma no grupo síndrome de Down (SD) e Controle (CTR)

Exames	Síndrome de Down (SD) n=24	Controle (CTR) n=21	p
Hemoglobina g/ dL	15,20 ± 1,47	14,85 ± 1,65	0,44
VCM micra ³	94,65 ± 4,48	90,00 ± 5,10	<0,01
HCM Pg	31,97 ± 1,90	29,95 ± 1,57	<0,01
CHCM g/dL	33,65 ± 1,04	33,30 ± 1,45	0,35
Leucócitos mil/mm ³	6,14 ± 1,80	6,67 ± 1,48	0,29
Neutrófilos mil/mm ³	3,80 ± 1,50	4,20 ± 1,10	0,37
Linfócitos mil/mm ³	1,76 ± 0,70	1,84 ± 0,49	0,62
Eosinófilos mil/mm ³	0,07 ± 0,09	0,19 ± 0,18	0,01
Basófilos mil/mm ³	0,03 ± 0,05	0,02 ± 0,04	0,41
Monócitos mil/mm ³	0,39 ± 0,13	0,48 ± 0,17	0,08
Plaquetas mil/mm ³	235,10 ± 93,62	221,90 ± 57,01	0,14

VCM - Volume corpuscular médio

HCM - Hemoglobina corpuscular média

CHCM - Concentração de hemoglobina corpuscular médio

4.3 Sorologias

A proposta inicial foi à realização das sorologias em todas as amostras coletadas. Todavia, por problemas operacionais os resultados apresentados a seguir contemplam um número menor do que o proposto inicialmente.

4.3.1 Dosagem de Imunoglobulinas séricas (IgA, IgG e IgM)

a) IgA: A comparação de IgA entre indivíduos SD e CTR mostrou uma frequência de valores acima do normal em 41% (5/12) no grupo SD e 15% (3/20) no grupo CTR e não houve diferença significativa ($p=0,11$).

b) IgG: A comparação de IgG entre indivíduos SD e CTR mostrou uma frequência de valores acima do normal em 25% (3/12) no grupo SD e 5% (1/20) no grupo CTR e não houve diferença significativa ($p=0,13$).

c) IgM: A comparação de IgM entre indivíduos SD e CTR mostrou uma frequência de valores acima do normal em 9% (1/11) no grupo SD e 30% (6/20) no grupo CTR e não houve diferença significativa ($p=0,37$).

4.3.2 Dosagem de Complemento (C3 e C4)

A comparação de valores da fração C3 do complemento demonstrou uma frequência de valores acima da normalidade em 35% (5/14) no grupo SD e 50% (9/18) no grupo CTR, sem diferenças significativas ($p=0,49$). A comparação de valores da fração C4 do complemento demonstrou valores acima dos parâmetros de normalidade em 28% (4/14) no grupo SD e 11% (2/18) no grupo CTR, sem diferenças significativas ($p=0,36$).

4.3.3 Antiestreptolisina O (ASLO)

A frequência de valores acima da normalidade foi 64% (9/14) no grupo SD e 33% (7/21) no grupo CTR, com $p=0,07$, sem diferenças significativas. As médias nos grupos SD e CTR foram: $308,10 \pm 240,00$ UI/mL e $207,00 \pm 210,10$ UI/mL, respectivamente.

4.3.4 Proteína-C- Reativa (PCR)

A análise de PCR mostrou valores acima da normalidade em 21% (3/14) no grupo SD e 52% (11/21) no grupo CTR, com $p=0,06$, sem diferenças significativas. Além da análise das frequências foi observado que as médias no grupo SD e CTR foram: $6,07 \pm 4,28$ e $5,00 \pm 5,75$ mg/L, respectivamente.

4.3.5 Sorologia para mononucleose infecciosa

Nos dois grupos (SD e CTR) todos os indivíduos apresentaram sorologia negativa para mononucleose infecciosa fração IgM. A fração IgG foi positiva em 78% (11/14) no grupo SD e 90% (19/21) no grupo CTR, com $p = 0,37$, sem diferenças significativas.

4.3.6 Sorologia para rubéola

Nos dois grupos analisados (SD e CTR) todos os indivíduos apresentaram sorologia negativa para rubéola fração IgM. A fração IgG foi positiva em 71% (10/14) no grupo SD e em 89% (17/19) no grupo CTR, sem diferenças significativas com $p = 0,36$.

4.3.7 Sorologia para citomegalovírus

A sorologia para citomegalovírus fração IgM foi negativa em todos os indivíduos, nos dois grupos analisados (SD e CTR). A fração IgG foi positiva em 78% (11/14) do grupo SD e 79% (15/19) do grupo CTR e não houve diferença significativa ($p=1$).

4.3.8 Sorologia para sarampo

A comparação das sorologias de 14 indivíduos SD e 21 do grupo CTR mostrou que todos os indivíduos apresentaram fração IgM negativa e fração IgG positiva.

4.3.9 Sorologia de toxoplasmose

As 14 amostras do grupo SD e 20 do grupo CTR analisadas para toxoplasmose fração IgM foram negativas. A fração IgG, foi positiva em 35% (5/14) do grupo SD e 60% (12/20) do grupo CTR, respectivamente, com $p=0,29$, sem diferença significativa.

4.3.10 Sorologia para Hepatite B

Foram analisadas as sorologias de 14 indivíduos do grupo SD e 21 do grupo CTR. O antiHBc total foi negativo em todos os indivíduos do grupo SD e positivo em apenas 5% (1/21) do grupo CTR. O AgHBs e o Anti HBs foi analisado em 5 amostras SD e 9 CTR. O AgHBs foi negativo em todas as amostras e o AntiHBs foi positivo em 1 amostra do grupo CTR. A análise do AntiHBc total, AgHBs e AntiHBs não mostraram diferenças significativas ($p=1$).

4.4 Separação de células mononucleares do sangue periférico

As células adquiridas na separação de CMSP foram utilizadas em cultura celular, para extração RNA e citometria (**Anexos D, E e F**).

4.4.1 Concentração de citocinas

Os resultados foram obtidos por meio do programa *BD CBA software* e determinados em pg/mL. O estudo mensurou os níveis de três citocinas pró-inflamatórias (IL-2, TNF α , INF γ) e três citocinas reguladoras (IL-4, IL-5, IL-10) em sobrenadantes de cultura de 48h em CMSP.

Nos **Anexos J, K, L** estão indicados os valores de citocinas obtidos em sobrenadantes em aproximadamente 20 amostras SD, 21 CTR e os valores extremos e medianas.

4.4.1.1 Citocinas pró-inflamatórias (Perfil Th1)

a) Interferon γ (IFN γ)

Houve produção espontânea maior de IFN γ no grupo SD em relação ao CTR ($p=0,01$). As medianas na condição espontânea, no grupo SD e CTR foram: 389,20 e 43,50 pg/ mL, respectivamente (**Figura 15**).

b) Fator de Necrose Tumoral α (TNF α)

A produção espontânea de TNF α foi maior no grupo SD em relação ao CTR, com diferenças significativas ($p<0,01$). As medianas na condição espontânea, no grupo SD e CTR foram: 131,20 e 37,38 pg/mL, respectivamente (**Figura 15**).

c) Interleucina 2 (IL-2)

Os níveis de IL-2 não mostraram diferenças nos dois grupos analisados ($p=ns$). As medianas na condição espontânea no grupo SD e CTR foram: 68,40 e 29,00 pg/mL, respectivamente (**Figura 15**).

4. Resultados

4.1 Avaliação clínica dos pacientes

Os 45 indivíduos deficientes mentais incluídos no estudo (SD e CTR) foram avaliados clinicamente e os dados laboratoriais e ecocardioplcardiográficos foram coletados de seus prontuários.

Os grupos SD e CTR apresentaram índice de massa corpórea compatíveis com sobrepeso, entretanto, sem diferenças significativas. Os valores de circunferência abdominal avaliados no sexo feminino e masculino não mostraram diferenças significativas. O grupo SD apresentou níveis de pressão arterial sistólica e diastólica que foram em média inferior ao do grupo CTR. Os valores de glicemia de jejum, colesterolemia total, LDL colesterol, HDL colesterol e trigliceridemia não mostraram diferenças nos dois grupos avaliados. O Índice de massa de ventrículo esquerdo analisado pelo ecodopplercardiograma apresentou parâmetros dentro da normalidade, no entanto, foi inferior no grupo SD comparado ao CTR com diferenças significativas (**Tabela 2**).

O ecodopplercardiograma do grupo SD mostrou 26% de prolapso da válvula mitral em (6/23) pacientes, 9% de insuficiência aórtica leve em (2/23) pacientes, 4% estenose pulmonar sem repercussão hemodinâmica em (1/23) pacientes. Foi verificada uma prevalência de 44% de hipotireoidismo no grupo SD.

Tabela 2 - Características clínicas e laboratoriais dos grupos SD e CTR

Variáveis Clínicas	Síndrome de Down SD (n=24) 8 ♀	Controle CTR (n=21) 6 ♀	p Teste t
IMC* (kg/m ²)	29,20 ± 5,97	27,99 ± 5,67	0,49
Circunferência abdominal ♀ (cm) ♂	89,38 ± 6,47 93,79 ± 16,46	88,08 ± 19,52 102,10 ± 11,46	0,86 0,20
Pressão arterial sistólica (mmHg)	113,60 ± 13,76*	126,30 ± 14,66*	<0,01
Pressão arterial diastólica (mmHg)	77,08 ± 8,82*	83,52 ± 11,69*	0,04
Glicemia (g/dL)	84,04 ± 10,60	90,67 ± 23,81	0,21
Colesterolemia total (mg/dL)	198,10 ± 36,01	182,10 ± 38,59	0,15
LDL-c (mg/dL)	128,60 ± 30,28	109,70 ± 38,97	0,07
HDL-c (mg/dL)	43,54 ± 8,78	45,38 ± 15,53	0,62
Trigliceridemia (mg/dL)	129,70 ± 74,25	145,80 ± 81,70	0,48
IMVE (g/m ²)	76,32 ± 13,42*	90,00 ± 15,34*	<0,01

HDL-c - Colesterol ligado a lipoproteína de alta densidade

IMC - Índice de massa corpórea

IMVE - Índice de massa de ventrículo esquerdo

LDL-c - Colesterol ligado a lipoproteína de baixa densidade

4.2. Hemograma

A comparação das taxas de hemoglobina, hematócrito, número de leucócitos e plaquetas nos dois grupos estudados não mostraram diferenças estatisticamente significativas. Não foi encontrado anemia, plaquetopenia, e houve apenas um caso de leucopenia discreta 3,50 mil/mm³ no grupo SD.

O volume corpuscular médio e a hemoglobina corpuscular média estão dentro dos parâmetros de normalidade, entretanto, com valores mais elevados no grupo SD ($p < 0,01$). Em contraste, os valores de eosinófilos no grupo SD foram inferiores em relação ao CTR ($p < 0,01$) e permanecem dentro dos parâmetros de normalidade (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Hemograma no grupo SD e CTR

Exames	Síndrome de Down (SD) n=24	Controle (CTR) n=21	p
Hemoglobina g/ dL	15,20 ± 1,47	14,85 ± 1,65	0,44
VCM micra ³	94,65 ± 4,48	90,00 ± 5,10	<0,01
HCM Pg	31,97 ± 1,90	29,95 ± 1,57	<0,01
CHCM g/dL	33,65 ± 1,04	33,30 ± 1,45	0,35
Leucócitos mil/mm ³	6,14 ± 1,80	6,67 ± 1,48	0,29
Neutrófilos mil/mm ³	3,80 ± 1,50	4,20 ± 1,10	0,37
Linfócitos mil/mm ³	1,76 ± 0,70	1,84 ± 0,49	0,62
Eosinófilos mil/mm ³	0,07 ± 0,09	0,19 ± 0,18	0,01
Basófilos mil/mm ³	0,03 ± 0,05	0,02 ± 0,04	0,41
Monócitos mil/mm ³	0,39 ± 0,13	0,48 ± 0,17	0,08
Plaquetas mil/mm ³	235,10 ± 93,62	221,90 ± 57,01	0,14

VCM - Volume corpuscular médio

HCM - Hemoglobina corpuscular média

CHCM - Concentração de hemoglobina corpuscular médio

4.3 Sorologias

A proposta inicial foi à realização das sorologias em todas as amostras coletadas. Todavia, por problemas operacionais os resultados apresentados a seguir contemplam um número menor do que o proposto inicialmente.

4.3.1 Dosagem de Imunoglobulinas séricas (IgA, IgG e IgM)

a) IgA: A comparação de IgA entre indivíduos SD e CTR mostrou uma frequência de valores acima do normal em 41% (5/12) no grupo SD e 15% (3/20) no grupo CTR e não houve diferença significativa ($p=0,11$).

b) IgG: A comparação de IgG entre indivíduos SD e CTR mostrou uma frequência de valores acima do normal em 25% (3/12) no grupo SD e 5% (1/20) no grupo CTR e não houve diferença significativa ($p=0,13$).

c) IgM: A comparação de IgM entre indivíduos SD e CTR mostrou uma frequência de valores acima do normal em 9% (1/11) no grupo SD e 30% (6/20) no grupo CTR e não houve diferença significativa ($p=0,37$).

4.3.2 Dosagem de Complemento (C3 e C4)

A comparação de valores da fração C3 do complemento demonstrou uma frequência de valores acima da normalidade em 35% (5/14) no grupo SD e 50% (9/18) no grupo CTR, sem diferenças significativas ($p=0,49$). A comparação de valores da fração C4 do complemento demonstrou valores acima dos parâmetros de normalidade em 28% (4/14) no grupo SD e 11% (2/18) no grupo CTR, sem diferenças significativas ($p=0,36$).

4.3.3 Antiestreptolisina O (ASLO)

A frequência de valores acima da normalidade foi 64% (9/14) no grupo SD e 33% (7/21) no grupo CTR, com $p=0,07$, sem diferenças significativas. As médias nos grupos SD e CTR foram: $308,10 \pm 240,00$ UI/mL e $207,00 \pm 210,10$ UI/mL, respectivamente.

4.3.4 Proteína-C- Reativa (PCR)

A análise de PCR mostrou valores acima da normalidade em 21% (3/14) no grupo SD e 52% (11/21) no grupo CTR, com $p=0,06$, sem diferenças significativas. Além da análise das frequências foi observado que as médias no grupo SD e CTR foram: $6,07 \pm 4,28$ e $5,00 \pm 5,75$ mg/L, respectivamente.

4.3.5 Sorologia para mononucleose infecciosa

Nos dois grupos (SD e CTR) todos os indivíduos apresentaram sorologia negativa para mononucleose infecciosa fração IgM. A fração IgG foi positiva em 78% (11/14) no grupo SD e 90% (19/21) no grupo CTR, com $p = 0,37$, sem diferenças significativas.

4.3.6 Sorologia para rubéola

Nos dois grupos analisados (SD e CTR) todos os indivíduos apresentaram sorologia negativa para rubéola fração IgM. A fração IgG foi positiva em 71% (10/14) no grupo SD e em 89% (17/19) no grupo CTR, sem diferenças significativas com $p = 0,36$.

4.3.7 Sorologia para citomegalovírus

A sorologia para citomegalovírus fração IgM foi negativa em todos os indivíduos, nos dois grupos analisados (SD e CTR). A fração IgG foi positiva em 78% (11/14) do grupo SD e 79% (15/19) do grupo CTR e não houve diferença significativa ($p=1$).

4.3.8 Sorologia para sarampo

A comparação das sorologias de 14 indivíduos SD e 21 do grupo CTR mostrou que todos os indivíduos apresentaram fração IgM negativa e fração IgG positiva.

4.3.9 Sorologia de toxoplasmose

As 14 amostras do grupo SD e 20 do grupo CTR analisadas para toxoplasmose fração IgM foram negativas. A fração IgG, foi positiva em 35% (5/14) do grupo SD e 60% (12/20) do grupo CTR, respectivamente, com $p=0,29$, sem diferença significativa.

4.3.10 Sorologia para Hepatite B

Foram analisadas as sorologias de 14 indivíduos do grupo SD e 21 do grupo CTR. O antiHBc total foi negativo em todos os indivíduos do grupo SD e positivo em apenas 5% (1/21) do grupo CTR. O AgHBs e o Anti HBs foi analisado em 5 amostras SD e 9 CTR. O AgHBs foi negativo em todas as amostras e o AntiHBs foi positivo em 1 amostra do grupo CTR. A análise do AntiHBc total, AgHBs e AntiHBs não mostraram diferenças significativas ($p=1$).

4.4 Separação de células mononucleares do sangue periférico

As células adquiridas na separação de CMSP foram utilizadas em cultura celular, para extração RNA e citometria (**Anexos D, E e F**).

4.4.1 Concentração de citocinas

Os resultados foram obtidos por meio do programa *BD CBA software* e determinados em pg/mL. O estudo mensurou os níveis de três citocinas pró-inflamatórias (IL-2, TNF α , INF γ) e três citocinas reguladoras (IL-4, IL-5, IL-10) em sobrenadantes de cultura de 48h em CMSP.

Nos **Anexos J, K, L** estão indicados os valores de citocinas obtidos em sobrenadantes em aproximadamente 20 amostras SD, 21 CTR e os valores extremos e medianas.

4.4.1.1 Citocinas pró-inflamatórias (Perfil Th1)

a) Interferon γ (IFN γ)

Houve produção espontânea maior de IFN γ no grupo SD em relação ao CTR ($p=0,01$). As medianas na condição espontânea, no grupo SD e CTR foram: 389,20 e 43,50 pg/ mL, respectivamente (**Figura 15**).

b) Fator de Necrose Tumoral α (TNF α)

A produção espontânea de TNF α foi maior no grupo SD em relação ao CTR, com diferenças significativas ($p<0,01$). As medianas na condição espontânea, no grupo SD e CTR foram: 131,20 e 37,38 pg/mL, respectivamente (**Figura 15**).

c) Interleucina 2 (IL-2)

Os níveis de IL-2 não mostraram diferenças nos dois grupos analisados ($p=ns$). As medianas na condição espontânea no grupo SD e CTR foram: 68,40 e 29,00 pg/mL, respectivamente (**Figura 15**).

Figura 15 - Concentração de $\text{INF}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$ e IL-2

Detectadas pelo método CBA em sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico (48h) com as medianas das concentrações de citocinas, com produção espontânea no grupo síndrome de Down (SD) e Controle (CTR).

b) Interleucina 5 (IL-5)

A concentração de IL-5 com produção espontânea detectada se encontrou abaixo dos níveis da curva padrão (20 pg/mL) em todos os sobrenadantes analisados, com exceção de 1 indivíduo do grupo SD (20,20 pg/mL).

c) Interleucina 4 (IL-4)

Devido à detecção de níveis de IL-4 abaixo do ponto inferior da curva padrão (20 pg/mL) foram avaliadas que amostras apresentavam concentração acima da curva e foi realizada a comparação dos dois grupos. Os níveis de IL-4 apresentaram produção espontânea superior a 20 pg/mL em 6/21 (28%) dos sobrenadantes analisados no grupo SD e em 2/20 (10%) no grupo CTR e não mostraram diferenças significativas, com $p=0,26$.

4.4.2 Descongelamento de células para realização de citometria

A citometria foi realizada com células descongeladas conforme protocolo já descrito para que o método fosse realizado por um mesmo pesquisador em todas as amostras analisadas.

4.4.3 Imunofenotipagem

A imunofenotipagem utilizou a amostra de voluntários saudáveis (n=8) como parâmetro de referência em relação ao grupo SD e CTR.

Houve a constatação que os indivíduos com síndrome de Down apresentam população maior de linfócitos T CD8 ($34,38 \pm 15,38\%$), de células NK ($44,75 \pm 23,01\%$) em relação aos outros grupos estudados. A análise da população de linfócitos T CD3, CD4, linfócito CD40L e a população de CD14 (monócitos) não mostraram diferenças entre os três grupos avaliados. A relação de linfócitos T CD4 e CD8 esperada é de 2:1. No estudo encontrou-se relação de 1;1 ou seja, um linfócito T CD4 para um linfócito T CD8. A análise quantitativa de linfócito B CD19 mostrou percentagem diminuída no grupo SD ($3,63 \pm 2,54\%$) com diferença estatisticamente significativa (**Tabela 04**); (**Figuras 17 a 20**).

Tabela 4 – Imunofenotipagem de CMSP nos três grupos estudados

Imunofenótipo (%; dp)	Síndrome de Down n=19	Controle n=20	Saudável n=08	ANOVA P
CD3	69,77 ± 8,03	64,86 ± 10,53	73,53 ± 6,01	0,05
CD4	40,96 ± 12,68	43,48 ± 11,00	48,92 ± 3,88	0,23
CD8	34,38 ± 15,38	22,47 ± 8,78	22,94 ± 4,72	<0,01
NK CD16 ⁺ /CD56 ⁺ /CD3 ⁻	44,75 ± 23,01	29,19 ± 15,41	22,62 ± 15,47	0,00
CD40 L	0,09 ± 0,13	0,23 ± 0,20	0,20 ± 0,34	0,14
CD14	77,80 ± 11,60	84,10 ± 9,90	72,60 ± 30,40	0,18
CD19	3,64 ± 2,55	15,28 ± 7,86	11,75 ± 3,05	p<0,01

Figura 17 - Expressão de linfócitos T CD3, CD4, CD8 no grupo síndrome de Down (SD), grupo controle (CTR) e saudável (%). As barras representam as médias e desvios padrão. Observa-se diferença significativa na população de linfócitos T CD8 entre o grupo SD e CTR.

Figura 18 - Relação da população de linfócitos T CD4 e CD8 no grupo síndrome de Down (SD). As barras representam as médias e desvios padrão (%). Observa-se relação 1:1 entre a população de linfócitos T CD4 e linfócitos T CD8.

Figura 19 - População de Células NK(CD16⁺/CD56⁺/CD3⁻) no grupo síndrome de Down (SD), controle (CTR) e saudável. As barras representam as médias e desvios padrão com diferença significativa entre o grupo SD e CTR.

Figura 20 - População de Linfócitos B CD19 no grupo síndrome de Down (SD), grupo controle (CTR) e grupo saudável. Observa-se a representação das médias e desvios padrão com percentagem menor de CD19 no grupo SD com diferença significativa entre o grupo SD e CTR.

4.5 Expressão gênica de RCAN1

Análise da expressão relativa de RCAN1 não demonstrou diferença estatisticamente significativa em 17 amostras de indivíduos com SD em relação a 19 amostras do grupo CTR, com medianas de 1,05 e 1,08 respectivamente, ($p= 0,66$). De acordo com a quantificação relativa (QR) encontrada, não foi demonstrado tanto regulação negativa ($QR \leq 0,5$) quanto positiva ($QR \geq 2,0$) do gene RCAN1 nos grupos SD e CTR, em relação a amostras de indivíduos saudáveis.

Os cálculos detalhados para a obtenção dos valores de QR são mostrados nos itens **Anexos M, N e O**. Os valores de QR foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizados pelo gene de referência, *GAPDH*, e expressos em relação às amostras de indivíduos saudáveis ($n=5$) (**Figura 21**).

Figura 21 - Expressão relativa de RCAN1 em amostras de indivíduos com Síndrome de Down (SD) e do grupo controle (CTR). As barras horizontais representam as medianas de cada grupo; linhas pontilhadas representam valores de QR. Valores de $QR \geq 2$ (regulados positivamente) e $QR \leq 0,5$ (regulados negativamente) em relação a amostras de indivíduos saudáveis.

b) Interleucina 5 (IL-5)

A concentração de IL-5 com produção espontânea detectada se encontrou abaixo dos níveis da curva padrão (20 pg/mL) em todos os sobrenadantes analisados, com exceção de 1 indivíduo do grupo SD (20,20 pg/mL).

c) Interleucina 4 (IL-4)

Devido à detecção de níveis de IL-4 abaixo do ponto inferior da curva padrão (20 pg/mL) foram avaliadas que amostras apresentavam concentração acima da curva e foi realizada a comparação dos dois grupos. Os níveis de IL-4 apresentaram produção espontânea superior a 20 pg/mL em 6/21 (28%) dos sobrenadantes analisados no grupo SD e em 2/20 (10%) no grupo CTR e não mostraram diferenças significativas, com $p=0,26$.

4.4.2 Descongelamento de células para realização de citometria

A citometria foi realizada com células descongeladas conforme protocolo já descrito para que o método fosse realizado por um mesmo pesquisador em todas as amostras analisadas.

4.4.3 Imunofenotipagem

A imunofenotipagem utilizou a amostra de voluntários saudáveis (n=8) como parâmetro de referência em relação ao grupo SD e CTR.

Houve a constatação que os indivíduos com síndrome de Down apresentam população maior de linfócitos T CD8 ($34,38 \pm 15,38\%$), de células NK ($44,75 \pm 23,01\%$) em relação aos outros grupos estudados. A análise da população de linfócitos T CD3, CD4, linfócito CD40L e a população de CD14 (monócitos) não mostraram diferenças entre os três grupos avaliados. A relação de linfócitos T CD4 e CD8 esperada é de 2:1. No estudo encontrou-se relação de 1;1 ou seja, um linfócito T CD4 para um linfócito T CD8. A análise quantitativa de linfócito B CD19 mostrou percentagem diminuída no grupo SD ($3,63 \pm 2,54\%$) com diferença estatisticamente significativa (**Tabela 04**); (**Figuras 17 a 20**).

Tabela 4 – Imunofenotipagem nos grupos síndrome de Down (SD), Controle (CTR) e saudável

Imunofenótipo (%; dp)	Síndrome de Down n=19	Controle n=20	Saudável n=08	ANOVA P
CD3	69,77 ± 8,03	64,86 ± 10,53	73,53 ± 6,01	0,05
CD4	40,96 ± 12,68	43,48 ± 11,00	48,92 ± 3,88	0,23
CD8	34,38 ± 15,38*	22,47 ± 8,78*	22,94 ± 4,72	<0,01
NK CD16 ⁺ /CD56 ⁺ /CD3 ⁻	44,75 ± 23,01*	29,19 ± 15,41*	22,62 ± 15,47	<0,01
CD40 L	0,09 ± 0,13	0,23 ± 0,20	0,20 ± 0,34	0,14
CD14	77,80 ± 11,60	84,10 ± 9,90	72,60 ± 30,40	0,18
CD19	3,64 ± 2,55*	15,28 ± 7,86*	11,75 ± 3,05	p<0,01

Figura 17 - Expressão de linfócitos T CD3, CD4, CD8 no grupo síndrome de Down (SD), grupo controle (CTR) e saudável (%). As barras representam as médias e desvios padrão. Observa-se diferença significativa na população de linfócitos T CD8 entre o grupo SD e CTR.

Figura 18 - Relação da população de linfócitos T CD4 e CD8 no grupo síndrome de Down (SD). As barras representam as médias e desvios padrão (%). Observa-se relação 1:1 entre a população de linfócitos T CD4 e linfócitos T CD8.

Figura 19 - População de Células NK(CD16⁺/CD56⁺/CD3⁻) no grupo síndrome de Down (SD), controle (CTR) e saudável. As barras representam as médias e desvios padrão com diferença significativa entre o grupo SD e CTR.

Figura 20 - População de Linfócitos B CD19 no grupo síndrome de Down (SD), grupo controle (CTR) e grupo saudável. Observa-se a representação das médias e desvios padrão com percentagem menor de CD19 no grupo SD com diferença significativa entre o grupo SD e CTR.

4.5 Expressão gênica de RCAN1

Análise da expressão relativa de RCAN1 não demonstrou diferença estatisticamente significativa em 17 amostras de indivíduos com SD em relação a 19 amostras do grupo CTR, com medianas de 1,05 e 1,08 respectivamente, ($p=0,66$). De acordo com a quantificação relativa (QR) encontrada, não foi demonstrado tanto regulação negativa ($QR \leq 0,5$) quanto positiva ($QR \geq 2,0$) do gene RCAN1 nos grupos SD e CTR, em relação a amostras de indivíduos saudáveis.

Os cálculos detalhados para a obtenção dos valores de QR são mostrados nos itens **Anexos M, N e O**. Os valores de QR foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizados pelo gene de referência, *GAPDH*, e expressos em relação às amostras de indivíduos saudáveis ($n=5$) (**Figura 21**).

Figura 21 - Expressão relativa de RCAN1 em amostras de indivíduos com Síndrome de Down (SD) e do grupo controle (CTR). As barras horizontais representam as medianas de cada grupo; linhas pontilhadas representam valores de QR. Valores de $QR \geq 2$ (regulados positivamente) e $QR \leq 0,5$ (regulados negativamente) em relação a amostras de indivíduos saudáveis.

5. Discussão

Os resultados apresentados mostram aspectos gerais do perfil imune humoral e celular de adultos com síndrome de Down de uma amostra populacional que buscou minimizar a influência de fatores externos e ambientais. Os níveis pressóricos reduzidos no grupo SD corroboram com um estudo realizado em 114 indivíduos, vivendo institucionalizados ou em ambiente domiciliar (Morrison *et al.*, 1996).

O índice de massa de ventrículo esquerdo no grupo SD dentro dos parâmetros de normalidade, entretanto, menor que do grupo CTR, é concordante com demonstrações de que a superexpressão do RCAN1 no músculo cardíaco teria implicação na inibição do processo de hipertrofia por regulação da ativação da calcineurina (Sanna *et al.*, 2006; Vega *et al.*, 2002).

Outros achados ecodopplercardiográficos confirmam uma possível ocorrência aumentada de prolapso de válvula mitral (14%) e Insuficiência aórtica (6%) em adultos com síndrome de Down (Goldhaber *et al.*, em 1985).

A falta de alterações hematológicas como leucopenia, anemia, policitemia, macrocitose e plaquetose na população estudada, frequentes nos mais jovens com síndrome de Down, é coerente com a influência de mecanismos adaptativos ao longo da vida (Akin *et al.*, 1988; Roizen 1993^b; Dixon *et al.*, 2006).

Um exemplo desses mecanismos é a macrocitose na ausência de anemia atribuída a um “turnover” acelerado das hemácias relacionado a um envelhecimento precoce desta população celular (Wachtel *et al.*, 1991).

Outro exemplo é a relativa eosinopenia observada no presente estudo,

de acordo com o relato que constatou maior apoptose e redução de 30% da sobrevivência de granulócitos em pacientes com síndrome de Down (Yasui *et al.*, 1999).

O perfil imune humoral nos dois grupos analisados com médias semelhantes e acima dos limites normais de Antiestreptolisina O e Proteína-C-Reativa sugere que estes pacientes podem ser mais expostos a infecção no ambiente que convivem.

A semelhança dos níveis das imunoglobulinas séricas, IgG , IgA e IgM bem como das frações C3 e C4 nos dois grupos analisados corroboram com estudos realizados em mais jovens, que mostraram parâmetros dentro da normalidade (Seger *et al.*, 1977; Hann *et al.*, 1979; Cocchi *et al.*, 2007).

Como a maioria dos indivíduos com SD vivem institucionalizados e são descritos como susceptíveis a infecção, houve estímulo ao estudo da resposta frente à vacinação para estabelecer diretrizes (Troisi *et al.*, 1985).

No presente estudo, o grupo SD mostrou sorologias com perfil semelhante ao grupo CTR, a antígenos virais e vacinais; hepatite B, sarampo, rubéola, mononucleose, citomegalovírus e toxoplasmose.

Esta resposta semelhante também foi encontrada em estudos que avaliaram respostas contra o citomegalovírus e vacinas do tétano, toxóide diftérico, influenza A, influenza B, sarampo, rubéola, caxumba e hepatite B (Hawkes *et al.*, 1978; Troisi *et al.*, 1985; Canto *et al.*, 2000). Apenas um estudo em uma amostra de 36 indivíduos institucionalizados com síndrome de Down demonstrou níveis de anticorpos contra sarampo abaixo dos detectados na população controle (Oda *et al.*, 1993).

Portanto, é lícito admitir que o perfil humoral encontrado em adultos com

SD conta com a participação de mecanismos adaptativos a fim de manter uma resposta eficaz e que as infecções decorrem de fatores independentes da resposta imune, como ambiente e hábitos de vida.

O perfil encontrado pela imunofenotipagem no grupo SD com maior percentagem de células NK e da população de linfócitos T CD8, com modificação da relação CD4: CD8 = 1:1, além da menor percentagem de linfócitos B (CD19) é compatível com padrão relacionado a predomínio da resposta imune inata.

Perfil semelhante foi caracterizado em 28 crianças não institucionalizadas e 9 adultos provenientes de pequenas instituições, nos quais se encontrou diminuição de linfócitos B CD19, aumento de células NK e nas crianças inversão da relação CD4: CD8 (Cossarizza *et al.*, 1991).

As alterações encontradas na subpopulações de linfócitos T podem estar relacionadas a anormalidades no timo (Murphy *et al.*, 1990). Estudos em timo de indivíduos com síndrome de Down sugerem deleção de timócitos com diminuição da proporção de células T maduras (Giannone *et al.*, 2004; Cossarizza *et al.*, 1989; Weerkamp *et al.*, 2005). A análise do desenvolvimento de timo fetal em modelo animal (trissomia do cromossomo 16) para a trissomia do cromossomo 21 demonstrou haver somente 20 a 30% da proporção de células T em comparação a um timo normal no mesmo estágio (Ewart *et al.*, 1992). A maturação das células T virgens (CD4⁺CD45RA) no timo parece sofrer uma alteração demonstrada pela redução da emigração delas (Murphy *et al.*, 1992; Murphy *et al.*, 1995; Barrena *et al.*, 1993). Além disso, crianças com síndrome de Down apresentam maior apoptose de células B e principalmente de células T (Elsayed *et al.*, 2009).

Os dados de imunofenotipagem obtidos corroboram com a literatura que sugere “*envelhecimento precoce*” do sistema imune (Cuadrado *et al.*, 1996; Borsatto 1996). Perfil comparável foi descrito em centenários em bom estado de saúde, caracterizado por ativação de células T, diminuição de linfócitos B circulantes com aumento de algumas subclasses de IgG e de células NK (Sansoni *et al.*, 1993).

O resultado encontrado, de níveis “normais” de imunoglobulinas apesar da diminuição da percentagem de linfócitos B (CD19) concorre a favor do argumento sobre a influência de um mecanismo de adaptação.

Na imunossenescência ocorre um complexo remodelamento do sistema imune induzido pela exposição a antígenos e estresse oxidativo. Ocorre deterioração de alguns clones de células e a preservação das células relacionadas à imunidade inata. Observa-se o declínio das células T virgens “naive”, células B e diminuição do número absoluto de células T e B com preservação da imunidade inata (Kaszubowska 2008). A contínua exposição a antígenos, estresse antigênico crônico, contribue para a involução do timo, acúmulo das células T de memória e a exaustão das células T virgens “naive”. Chama a atenção na imunossenescência um estado inflamatório crônico denominado “*inflammaging*”, consequente à ativação celular e molecular, que possibilita ao organismo combater os múltiplos estresses presentes durante o processo de envelhecimento (Franceschi *et al.*, 2003).

Uma análise do comprimento do telômero em linfócitos de 140 portadores de síndrome de Down constatou neles um importante encurtamento em relação a voluntários normais denotando um envelhecimento acelerado dessas células (Vaziri *et al.*, 1993).

Além da avaliação das populações de células, a análise da produção de citocinas permitiu verificar um aspecto funcional das células mononucleares.

Foi observado um predomínio de citocinas pró-inflamatórias, $\text{TNF}\alpha$ e $\text{INF}\gamma$ em relação à citocina reguladora, IL-10. Como os sobrenadantes de citocinas foram coletados após 48h de cultura celular seria esperada elevação menor das citocinas pró-inflamatórias, pois habitualmente a produção delas é maior nas primeiras 6 horas.

As produções espontâneas elevadas de $\text{INF}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$ e IL-10 são possivelmente atribuídas a outras células, células NK, macrófagos e não as células T. Em contraste, com a IL-2, IL-4 e IL-5 que são produzidas principalmente por células T e não mostraram produção espontânea expressiva (Park *et al.*, 2000).

O predomínio de $\text{INF}\gamma$ de ação pró-inflamatória (Th1) já foi descrito em adultos com SD (Franciotta *et al.*, 2006). Além disso, em crianças com a síndrome também se verificou um predomínio de citocinas pró-inflamatórias tais como, $\text{INF}\gamma$, IL-2, $\text{TNF}\beta$ em relação às citocinas reguladoras, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 (Nespoli *et al.*, 1993).

Esses resultados reforçam os indícios de imunossenescência do sistema imune no grupo SD com um desequilíbrio na produção de citocinas aparentemente sem evidência de estímulo antigênico e com predomínio da resposta inata (De Martinis *et al.*, 2005; Licastro *et al.*, 2005).

A produção de citocinas está intimamente relacionada com a ativação de células T e a regulação dos fatores de transcrição.

O gene RCAN1 foi estudado em fetos, em endotélio de cordão umbilical, em tecido nervoso, em modelo animal, (Minami *et al.*, 2004; Minami *et al.*,

2006)

Até o momento nenhum estudo demonstrou a expressão do RNAm do gene RCAN1 em células mononucleares do sangue periférico “in vivo” em adultos com síndrome de Down.

A hipótese de que uma expressão quantitativa elevada de RNAm do RCAN1 poderia justificar a inibição da calcineurina pelo gene e um efeito imunossupressor relacionado a IL-2 não se confirmou.

A expressão quantitativa do RNAm do RCAN1, em torno de 1, encontrada pelo modelo adotado neste estudo sugere que o gene não tem envolvimento com uma regulação positiva ou negativa da calcineurina. Contudo, na população de SD a regulação positiva do gene RCAN1 poderia justificar a produção inexpressiva de IL-2 pelas células T, visto que houve produção elevada de duas citocinas pró-inflamatórias TNF α e INF γ , sem que fossem acompanhadas pela elevação de IL-2.

Os achados levantam algumas questões sobre a dependência eventual de algum estímulo celular específico para a expressão do RCAN1 e sobre os modelos empregados em estudos sobre este gene.

Os mecanismos implicados na expressão de genes do cromossomo 21 na SD, não estão bem esclarecidos (Patterson 2009).

O fenótipo da síndrome de Down é resultado de um desequilíbrio em decorrência do cromossomo extra em que alguns genes estão superexpressos e outros compensados, ou seja, não apresentam expressão acima da basal (Saran *et al.*, 2003; Shapiro *et al.*, 2001). Um estudo estabeleceu uma classificação e determinou que os genes com expressão acima de 1,5x em relação aos controles teriam influências direta no fenótipo (Aït Yahya-Graison

et al., 2007).

O gene pode ser superexpresso em alguns tecidos e em outros apresentar expressão basal. A superexpressão foi demonstrada em modelo experimental em tecido nervoso com envolvimento na doença de Alzheimer (Fuentes *et al.*, 2000), em tecido fetal, músculo cardíaco com inibição de hipertrofia, em células tumorais e em endotélio com comprovado efeito anti-inflamatório (Yamamoto *et al.*, 1999; Casas *et al.*, 2001; Minami *et al.*, 2004; Minami *et al.*, 2009).

De fato, quando o modelo elaborou a superexpressão destes genes em (1,5x) a inibição do NFAT era demonstrada (Arron *et al.*, 2006; Ermak *et al.*, 2004). O fragmento responsável pela inibição do NFAT no gene RCAN1 pertence ao exon 7, que possui um sítio de ligação com a calcineurina, semelhante a uma sequência do fator nuclear ativado (NFAT) (Chan *et al.*, 2005). Por isso, o presente estudo buscou desenhar um primer com o fragmento constante do gene em todas as isoformas, ou seja, dos exons 5 ao 7 (Ermak *et al.*, 2002; Fuentes *et al.*, 2000, Gorlach *et al.*, 2000, Rothermel *et al.*, 2000).

A eventual dependência de estímulo para a expressão do gene tem sido investigada. Há uma ação sinérgica do RCAN1 com outros genes. Um estudo experimental em ratos elaborou um modelo matemático que demonstrou a ação sinérgica dos genes RCAN1 e DYRK1A “dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A.

Em estudos experimentais, o RNAm do RCAN1 foi induzido por uma série de estímulos; calcio ionophoro, peróxido de hidrogênio, brefeldina, ácido ciclopiazônico e forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (Crawford *et al.*, 1997;

Leahy *et al.*, 1999). Em linhagens celulares de astroglioma U251 e Hela (células epiteliais), a indução de níveis de RNAm do RCAN1 foi estimulada por peróxido de hidrogênio e por aumento de cálcio intracelular (Michtalik *et al.*, 2004).

Além do estímulo executado em estudos experimentais, foi comprovado que o gene pode ser visto em vários estados de fosforilação e inducibilidade. (Hilioti *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2003). Esse fato levou às discussões sobre a estabilidade do gene RCAN1 e gerou controvérsias quanto às reais influências da fosforilação do RCAN1 na habilidade de inibir a calcineurina, (Genescà *et al.*, 2003; Pfister *et al.*, 2000).

Portanto, é crucial encontrar modelos de estudo éticos e viáveis em seres humanos com SD que permitam chegar a resultados mais incisivos. Os resultados obtidos fornecem subsídios para a elaboração de estudos que incluam a aplicação de estímulos para a indução da expressão do gene RCAN1 e avaliem eventuais interações dele com outros genes.

6. Conclusões

Conclusões

O estudo do perfil imunológico humoral e celular de adultos com síndrome de Down provenientes da APAE-SP permitiu concluir que eles apresentam:

6.1 Um perfil de resposta humoral semelhante à resposta de deficientes mentais sem a síndrome que convivem na mesma instituição;

6.2 Um padrão de envelhecimento imunológico precoce, segundo sugerido pelos dados dos marcadores celulares na imunofenotipagem;

6.3 Um perfil pró-inflamatório, sinalizado pelo aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias por produção celular espontânea;

6.4 Ausência de expressão aumentada ou diminuída do gene RCAN1 em células mononucleares do sangue periférico segundo avaliação quantitativa do RNAm não indicando, portanto, uma possível regulação positiva ou negativa sobre o fator nuclear de células T ativadas, bem como sobre a produção de citocinas.

7. Anexos

Anexo A – Identificação, idade e cariótipo dos indivíduos SD

Nº de pacientes	Data	Nome	Registro Incor	Idade	Sexo	Cariótipo
01	27/4/2005	MAS	5275278G	31	F	TL
02	04/5/2005	CAHS	5296801F	30	M	TL
03	04/5/2005	DT M	5262994I	49	M	TL
04	19/5/2005	E FS	5257999G	32	M	TL
05	19/5/2005	FQM	5357400A	30	M	TL
06	19/5/2005	FASA	5266581K	45	M	TL
07	06/7/2005	ACKS	5268894E	47	M	TL
08	06/7/2005	GRM	5267351A	40	M	TL
09	06/7/2005	GCC	5268108A	33	M	TL
10	20/7/2005	M CP	5299154K	31	M	TL
11	03/8/2005	B AO	5296543C	31	F	TL
12	17/8/2005	MCF	5286886D	33	F	TL
13	17/8/2005	MRP	5290222H	51	F	TL
14	24/8/2005	OPA	5265674A	51	M	TL
15	24/8/2005	PA L B	5266580A	39	M	TL
16	19/10/2005	P P B	5352615J	32	F	TL
17	19/10/2005	V P P	5298596H	31	F	TL
18	16/11/2005	A T L	5264937C	59	M	TL
19	15/3/2006	A C	55378468B	37	M	TL
20	15/3/2006	MG S	5285688D	34	F	TL
21	15/3/2006	S X	5296208K	32	M	TL
22	05/4/2006	F J G	55378287E	33	M	TL
23	10/5/2006	RG	2694478J	33	F	TL
24	10/5/2006	M V N	2105666C	41	M	TL

Anexo B– Identificação, idade e cariótipo dos indivíduos CTR

nº de			Registro			
pacientes	Data	Nome	Incor	Idade	Sexo	Cariótipo
25	31/8/2005	ALG	5357654G	31	F	Normal
26	31/8/2005	BMJ	5284262D	40	M	Normal
27	14/9/2005	CLT	5263540F	43	F	Normal
28	14/9/2005	DM	5295343E	55	M	Normal
29	14/9/2005	JRS	5296784D	31	M	Normal
30	21/9/2005	LTM	5297547E	51	M	Normal
31	21/9/2005	LRKS	5268895D	52	M	Normal
32	21/9/2005	OR	5285211D	52	M	Normal
33	21/9/2005	RS	2057666C	37	M	Normal
34	19/10/2005	NPS	3178465B	38	M	Normal
35	26/10/2005	RMM	5280651A	43	F	Normal
36	26/10/2005	SMR	5277390F	44	F	Normal
37	26/10/2005	WB	5278659C	55	M	Normal
38	22/3/2006	JSM	5284785H	33	M	Normal
39	22/3/2006	LRG	5290232E	38	F	Normal
40	05/4/2006	GCC	5286884F	45	M	Normal
41	05/4/2006	JAS	5275769K	42	M	Normal
42	26/4/2006	BB	5287372D	55	F	Normal
43	17/5/2006	NAM	2805979B	33	M	Normal
44	14/6/2006	WCC	5363967C	39	M	Normal
45	14/6/2006	SKG	5297003H	32	F	NãoDown

Anexo C– Identificação, idade dos voluntários saudáveis

nº de pacientes	Data	Nome	Registro Incor	Idade	Sexo	Grupo
46	19/10/2006	SP	RG1	54	F	saudável
47	19/10/2006	MBF	RG2	35	F	saudável
48	19/10/2006	CRO	RG3	38	M	saudável
49	19/10/2006	MGB	RG4	38	M	saudável
50	25/10/2006	MRL	RG5	44	F	saudável
51	25/10/2006	SSA	RG6	33	F	saudável
52	02/11/2006	CA	RG7	34	F	saudável
53	02/11/2005	LC	RG8	40	F	saudável

AnexoD - Quantidade de células adquiridas na cultura celular, para extração de RNA e citometria no grupo SD com cariótipo de trissomia livre

Grupo SD N ^o	Cariótipo	Cultura	RNA	Plasma μ L	Citometria
1	TL	17,50x10 ⁶	4,50x10 ⁶	1000	5,00x10 ⁶
2	TL	12,00x10 ⁶	3,00x10 ⁶	1000	5,00x10 ⁶
3	TL	20,00x10 ⁶	5,00x10 ⁶	1000	6,00x10 ⁶
4	TL	14,00x10 ⁶	3,00x10 ⁶	1000	5,00x10 ⁶
5	TL	12,70x10 ⁶	3,50x10 ⁶	1000	5,00x10 ⁶
6	TL	14,60x10 ⁶	3,50x10 ⁶	1000	5,00x10 ⁶
7	TL	11,10x10 ⁶	3,00x10 ⁶	1000	4,00x10 ⁶
8	TL	18,00x10 ⁶	6,00x10 ⁶	1000	6,00x10 ⁶
9	TL	16,00x10 ⁶	5,00x10 ⁶	1000	5,00x10 ⁶
10	TL	17,50x10 ⁶	5,00x10 ⁶	1000	4,50x10 ⁶
11	TL	19,60x10 ⁶	5,30x10 ⁶	1000	5,30x10 ⁶
12	TL	16,80x10 ⁶	5,40x10 ⁶	1000	5,40x10 ⁶
13	TL	16,00x10 ⁶	5,00x10 ⁶	1000	5,00x10 ⁶
14	TL	26,00x10 ⁶	5,00x10 ⁶⁽²⁾	1000	5,00x10 ⁶⁽²⁾
15	TL	51,00x10 ⁶	5,20x10 ⁶⁽⁴⁾	1000	5,20x10 ⁶⁽⁴⁾
16	TL	18,00x10 ⁶	4,50x10 ⁶	1000	4,50x10 ⁶
17	TL	33,40x10 ⁶	6,00x10 ⁶⁽²⁾	1000	6,00x10 ⁶⁽²⁾
18	TL	18,00x10 ⁶	6,00x10 ⁶	1000	6,00x10 ⁶
19	TL	26,00x10 ⁶	5,00x10 ⁶⁽²⁾	1000	5,00x10 ⁶⁽²⁾
20	TL	52,00x10 ⁶	5,00x10 ⁶⁽⁴⁾	1000	5,00x10 ⁶⁽⁴⁾
21	TL	29,00x10 ⁶	5,00x10 ⁶⁽²⁾	1000	5,00x10 ⁶⁽²⁾
22	TL	60,00x10 ⁶	5,00x10 ⁶⁽⁵⁾	1000	5,00x10 ⁶⁽⁵⁾
23	TL	27,00x10 ⁶	5,25x10 ⁶⁽²⁾	1000	5,25x10 ⁶⁽²⁾
24	TL	33,00x10 ⁶	4,80x10 ⁶⁽³⁾	1000	4,8x10 ⁶⁽²⁾

Anexo E - Quantidade de células adquiridas na cultura celular, para extração de RNA e citometria no grupo CTR

Grupo CTR N ^o	Cariótipo	Cultura	RNA	Plasma μ L	Citometria
25	Normal	18,00x10 ⁶	6,00x10 ⁶	1000	6,00x10 ⁶
26	Normal	14,50x10 ⁶	4,20x10 ⁶	1000	4,20x10 ⁶
27	Normal	28,60x10 ⁶	5,60x10 ⁶⁽²⁾	1000	5,60x10 ⁶⁽²⁾
28	Normal	13,00x10 ⁶	4,50x10 ⁶	1000	4,50x10 ⁶
29	Normal	15,00x10 ⁶	4,50x10 ⁶	1000	4,50x10 ⁶
30	Normal	32,70x10 ⁶	5,90x10 ^{6 (2)}	1000	5,90x10 ^{6 (2)}
31	Normal	36,30x10 ⁶	5,70x10 ⁶⁽²⁾	1000	5,70x10 ⁶⁽²⁾
32	Normal	24,30x10 ⁶	5,10x10 ⁶⁽²⁾	1000	5,10x10 ⁶
33	Normal	24,30x10 ⁶	5,10x10 ⁶⁽²⁾	1000	5,10x10 ⁶⁽²⁾
34	Normal	28,00x10 ⁶	4,60x10 ⁶⁽²⁾	1000	4,60x10 ⁶⁽²⁾
35	Normal	34,60x10 ⁶	5,10x10 ⁶⁽³⁾	1000	5,10x10 ⁶⁽²⁾
36	Normal	21,30x10 ⁶	6,10x10 ⁶⁽²⁾	1000	6,10x10 ⁶⁽²⁾
37	Normal	31,00x10 ⁶	5,50x10 ^{6 (2)}	1000	5,50x10 ^{6 (2)}
38	Normal	31,00x10 ⁶	5,00x10 ^{6 (3)}	1000	5,00x10 ^{6 (2)}
39	Normal	14,20x10 ⁶	4,00x10 ^{6 (2)}	1000	4,00x10 ^{6 (2)}
40	Normal	30,00x10 ⁶	5,00x10 ^{6 (2)}	1000	5,00x10 ⁶⁽²⁾
41	Normal	29,00x10 ⁶	5,00x10 ⁶⁽²⁾	1000	5,00x10 ⁶⁽²⁾
42	Normal	24,50x10 ⁶	4,60x10 ^{6 (2)}	1000	4,60x10 ^{6 (2)}
43	Normal	24,50x10 ⁶	4,60x10 ^{6 (2)}	1000	4,60x10 ^{6 (2)}
44	Normal	23,00x10 ⁶	4,20x10 ^{6 (2)}	1000	4,25x10 ^{6 (2)}
45	Não Down	32,40x10 ⁶	5,70x10 ⁶⁽²⁾	1000	5,70x10 ^{6 (2)}

Anexo F - Quantidade de células adquiridas na cultura celular, para extração de RNA e citometria no grupo saudável

Grupo Saudável NºI	Cariótipo	Cultura	RNA	Citometria
46	Saudável	24,90x10 ⁶	4,70x10 ⁶⁽²⁾	4,70x10 ^{6 (2)}
47	Saudável	27,30x10 ⁶	5,30x10 ⁶⁽²⁾	5,30x10 ^{6 (2)}
48	Saudável	15,00x10 ⁶	4,50x10 ⁶	4,50x10 ⁶
49	Saudável	34,80x10 ⁶	5,40x10 ⁶⁽⁴⁾	5,40x10 ⁶⁽⁴⁾
50	Saudável	22,00x10 ⁶	5,50x10 ⁶⁽²⁾	5,50x10 ⁶⁽²⁾
51	Saudável	16,00x10 ⁶	5,00x10 ⁶	5,00x10 ⁶
52	Saudável	21,10x10 ⁶	5,50x10 ⁶⁽²⁾	5,00x10 ⁶
53	Saudável	30,00x10 ⁶	4,00x10 ⁶⁽²⁾	4,00x10 ⁶⁽²⁾

Anexo G – Resultados da extração de RNA, concentração de RNA, razão 260/280 no grupo SD com cariótipo de trissomia livre (TL)

Nome	Concentração $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	R 260/280	Cariótipo
A M S	0,53	2,13	TL
A T L	1,08	1,91	TL
ACKS	0,39	2,00	TL
AC S J	0,87	1,84	TL
B A O	0,72	2,14	TL
CA HS	0,43	2,19	TL
D T M	0,63	2,12	TL
E F S	0,96	1,79	TL
F J G	2,32	1,78	TL
F Q M	1,28	1,75	TL
FA SA	0,75	1,79	TL
GR M	0,17	2,53	TL
GC TA	1,02	1,82	TL
MGVS	2,10	1,83	TL
M V N	1,93	1,88	TL
MCP	0,83	2,01	TL
MCSF	1,42	1,84	TL
M R P	0,85	2,01	TL
OPAF	1,25	1,55	TL
P P B	1,11	1,76	TL
PALB	1,54	1,7	TL
R G	0,66	1,70	TL
S X	1,27	1,38	TL
VJAP	1,55	1,35	TL

Anexo H– Resultados da extração de RNA, concentração de RNA, razão 260/280 no grupo CTR com cariótipo normal

Nome	Concentração µg/µL	R 260/280	Cariótipo
A L G	2,78	1,90	Normal
B M J	0,61	1,70	Normal
BMR B	1,20	1,47	Normal
CL T P	1,34	1,60	Normal
D M	0,62	1,74	Normal
G C C	1,76	1,82	Normal
J S M	1,65	1,55	Normal
J A S	1,52	1,34	Normal
JR S G	1,90	1,78	Normal
L R G	2,04	1,42	Normal
LR K S	2,57	1,90	Normal
LT M	1,65	1,82	Normal
N A S	0,82	1,90	Normal
N P S	2,17	1,38	Normal
O R	2,05	1,65	Normal
RR S	1,74	1,88	Normal
RM M	0,68	1,78	Normal
SK G	1,60	1,74	Não Down
SM R	3,83	1,49	Normal
WC C	1,61	1,94	Normal
W B	1,52	1,35	Normal

Anexo I – Resultados da extração de RNA, concentração de RNA, razão 260/280 no grupo saudável

Nome	Concentração ug/ul	R 260/280	Cariótipo
M R	1,55	1,74	Normal-saudável
SSA	0,75	1,72	Normal-saudável
MBFT	0,46	1,94	Normal-saudável
SP	1,08	1,72	Normal-saudável
M B	0,89	1,57	Normal-saudável

Anexo J - Concentração de $\text{INF}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, IL-2, IL-10, IL-4 e IL-5 no grupo síndrome de Down com produção espontânea (SD) (pg/mL)

SD Pg/mL	$\text{INF}\gamma$	$\text{TNF}\alpha$	IL-2	IL-10	IL-5	IL-4
GM	3676,80	1962,20	177,20	220,90	<20,00	46,20
GC	5000,00	1719,60	104,60	420,10	<20,00	69,90
MP	1755,80	433,90	233,90	96,20	<20,00	51,70
BA	1017,30	381,10	99,10	50,90	<20,00	35,00
MR	228,00	260,10	58,90	34,00	<20,00	23,40
FG	754,10	129,70	43,10	31,80	<20,00	<20,00
RG	1749,40	135,30	122,80	59,60	<20,00	26,60
MVN	558,60	43,30	79,60	48,00	<20,00	19,70
PL	>20,00	77,10	36,80	25,20	<20,00	<20,00
DT	561,80	389,90	129,40	233,10	<20,00	<20,00
AS	487,50	613,70	80,30	209,10	<20,00	<20,00
EFS	121,60	77,50	22,90	74,50	<20,00	<20,00
FA	31,40	65,80	77,90	102,80	<20,00	<20,00
AL	>20,00	62,60	23,90	<20,00	<20,00	<20,00
PPB	290,80	132,70	80,50	<20,00	<20,00	<20,00
VP	20,00	<20,00	19,64	<20,00	<20,00	<20,00
SX	98,90	72,00	45,10	26,70	20,20	<20,00
MGV	1189,40	351,20	31,07	28,90	<20,00	<20,00
AC	49,50	45,50	<20,00	<20,00	<20,00	<20,00
MR	>20,00	41,90	<20,00	<20,00	<20,00	<20,00

Anexo K - Concentração de $\text{INF}\gamma$, IL-10, $\text{TNF}\alpha$ IL-2, IL-4 e IL-5 no grupo controle (CTR) (pg/mL) com produção espontânea

CTR Pg/mL	$\text{INF}\gamma$	$\text{TNF}\alpha$	IL-2	IL-10	IL-5	IL-4
BMJ	<20,00	<20,00	<20,00	20,00	<20,00	<20,00
WB	3263,00	1791,00	106,80	114,70	47,40	<20,00
AG	28,90	35,80	20,90	25,00	<20,00	35,70
DM	<20,00	151,00	<20,00	28,50	<20,00	<20,00
JM	74,70	448,50	<20,00	73,70	<20,00	<20,00
OR	366,10	62,66	63,10	22,10	<20,00	<20,00
GCC	58,20	<20,00	55,48	<20,00	<20,00	<20,00
WC	225,68	38,96	106,76	<20,00	<20,00	<20,00
RS	76,70	44,60	29,50	<20,00	<20,00	<20,00
NPS	77,40	<20,00	<20,00	<20,00	<20,00	<20,00
JRS	<20,00	48,90	29,00	<20,00	<20,00	<20,00
CLT	337,60	23,90	29,00	<20,00	<20,00	<20,00
SMR	641,60	154,70	231,70	26,10	<20,00	<20,00
RMM	63,20	<20,00	34,02	<20,00	<20,00	<20,00
JAS	<20,00	<20,00	<20,00	<20,00	<20,00	<20,00
SK	<20,00	<20,00	25,20	<20,00	<20,00	<20,00
LM	<20,00	24,92	21,90	<20,00	<20,00	<20,00
LR	<20,00	191,90	<20,00	404,90	<20,00	2505,71
NAS	<20,00	27,05	47,99	<20,00	<20,00	<20,00
LKS	<20,00	104,5	96,20	<20,00	<20,00	<20,00

Anexo L - Valores das medianas e valores extremos do grupo síndrome de Down (SD) e Controle (CTR) na condição Espontânea 48h

SD pg/mL	grupos	Condição	Mínimo	Mediana	Máxima	Teste Mann Whitney p
INF γ	SD	Espontânea	20,00	389,20	5000,00	0,01
	CTR		20,00	43,55	3263,00	
TNF α	SD	Espontânea	20,00	131,20	1962,00	0,007
	CTR		20,00	37,38	1791,00	
IL-10	SD	Espontânea	20,00	41,00	420,10	0,008
	CTR		20,00	20,00	404,90	
IL-2	SD	Espontânea	20,00	68,40	233,90	>0,05
	CTR		20,00	29,00	231,70	
						Teste F
IL-5	SD	Espontânea	20,00	20,00	20,20	>0,05
	CTR		20,00	20,00	47,40	>0,05
IL-4	SD	Espontânea	20,00	20,00	69,90	>0,05
	CTR		20,00	20,00	2506,00	>0,05

Anexo M- Valores provenientes da análise do qRTPCR do grupo SD

Amostra	Endógeno	Ct	Média	Alvo	Ct	média	DCt	DDCt individual	QR individual
OP	GAPDH	22,43	22,34	RCAN1	28,80	28,65	6,31	-1,21	2,33
		22,32			28,71				
		22,27			28,44				
PPB	GAPDH	19,20	19,10	RCAN1	25,93	25,70	6,60	-0,92	1,90
		19,05			25,63				
		19,04			25,54				
AKS	GAPDH	22,13	22,18	RCAN1	31,50	31,32	9,13	1,60	0,33
		22,18			31,00				
		22,25			31,46				
AL	GAPDH	19,55	19,66	RCAN1	26,91	27,11	7,45	-0,07	1,05
		19,71			27,37				
		19,72			27,06				
FQ	GAPDH	19,69	19,72	RCAN1	28,14	28,13	8,41	0,88	0,54
		19,73			28,13				
		19,73			28,13				
PL	GAPDH	24,01	23,86	RCAN1	31,27	31,15	7,28	-0,24	1,18
		23,94			31,29				
		23,71			30,89				
CH	GAPDH	23,21	23,28	RCAN1	33,94	33,28	9,99	2,46	0,18
		23,29			32,37				
		23,34			33,51				
Mgraças	GAPDH	20,37	20,39	RCAN1	27,43	27,55	7,16	-0,37	1,29
		20,39			27,66				
		20,42			27,58				
VP	GAPDH	20,86	20,85	RCAN1	27,18	27,14	6,29	-1,24	2,36
		20,91			27,12				
		20,77			27,12				
MF	GAPDH	19,41	19,46	RCAN1	26,70	26,61	7,14	-0,38	1,30
		19,57			26,66				
		19,41			26,47				
Fgato	GAPDH	20,29	20,26	RCAN1	28,07	27,58	7,32	-0,20	1,15
		20,23			27,33				
		20,24			27,34				
GCaldas	GAPDH	19,75	19,85	RCAN1	27,53	27,68	7,83	0,31	0,81
		19,85			28,11				
		19,94			27,41				
MVN	GAPDH	22,15	22,10	RCAN1	29,38	29,05	6,94	-0,58	1,50
		22,09			29,06				
		22,07			28,70				
BA	GAPDH	22,95	22,84	RCAN1	31,09	30,58	7,74	0,22	0,86
		22,82			30,63				
		22,74			30,03				
RG	GAPDH	20,35	20,52	RCAN1	29,27	29,31	8,79	1,26	0,42
		20,46			29,40				
		20,73			29,26				
AC	GAPDH	20,28	20,39	RCAN1	30,08	30,00	9,61	2,09	0,24
		20,45			30,11				
		20,43			29,80				
MR	GAPDH	24,27	24,38	RCAN1	32,51	32,81	8,42	0,90	0,54
		24,38			33,10				
		24,48							

Anexo N - Valores provenientes da análise do qRT-PCR do grupo CTR

Amostra	Endógeno	Ct	média	Alvo	Ct	média	DCt	DDCt	individual	QR individual
Bernadete	GAPDH	20,08	20,05	RCAN1	27,50	27,26	7,21	-0,31		1,24
		20,03			27,13					
		20,02			27,16					
GC	GAPDH	19,23	19,28	RCAN1	27,06	26,97	7,68	0,15		0,90
		19,28			26,93					
		19,34			26,91					
SK	GAPDH	21,38	21,34	RCAN1	30,23	29,60	8,25	0,73		0,60
		21,35			29,44					
		21,30			29,13					
RM	GAPDH	19,33	19,28	RCAN1	26,60	26,51	7,22	-0,30		1,23
		19,28			26,42					
		19,23			26,50					
LR	GAPDH	21,21	21,20	RCAN1	29,15	29,25	8,05	0,52		0,70
		21,20			29,36					
		21,20			29,24					
NA	GAPDH	19,11	19,10	RCAN1	25,98	25,72	6,61	-0,91		1,88
		19,10			25,70					
		19,10			25,49					
OR	GAPDH	24,18	24,34	RCAN1	33,24	33,32	8,98	1,46		0,36
		24,31			33,24					
		24,52			33,49					
DM	GAPDH	19,57	19,81	RCAN1	26,63	26,52	6,70	-0,82		1,77
		19,86			26,59					
		20,00			26,33					
AG	GAPDH	23,26	23,11	RCAN1	31,40	30,97	7,86	0,33		0,79
		23,21			31,04					
		22,86			30,48					
JR	GAPDH	19,92	19,69	RCAN1	27,32	27,11	7,41	-0,11		1,08
		19,70			27,14					
		19,45			26,87					
LT	GAPDH	20,36	20,26	RCAN1	28,56	28,32	8,05	0,53		0,69
		20,28			28,06					
		20,14			28,34					
BMJ	GAPDH	22,04	22,11	RCAN1	30,35	30,19	8,08	0,56		0,68
		22,10			30,12					
		22,18			30,10					
SR	GAPDH	22,03	22,14	RCAN1	28,69	28,86	6,72	-0,81		1,75
		22,12			28,97					
		22,26			28,91					
WB	GAPDH	20,40	20,41	RCAN1	28,10	28,13	7,72	0,19		0,88
		20,47			28,49					
		20,36			27,80					
NS	GAPDH	21,03	20,99	RCAN1	28,91	28,38	7,39	-0,13		1,09
		20,94			28,22					
		20,98			28,02					
JM	GAPDH	21,44	21,43	RCAN1	28,19	27,79	6,35	-1,17		2,25
		21,42			27,65					
		21,43			27,52					
WC	GAPDH	18,87	18,78	RCAN1	25,77	25,62	6,84	-0,69		1,61
		18,77			25,46					
		18,70			25,63					
RR	GAPDH	22,57	22,49	RCAN1	29,82	29,98	7,49	-0,03		1,02
		22,43			29,95					
		22,47			30,18					
JAL	GAPDH	23,97	23,98	RCAN1	30,41	31,25	7,27	-0,26		1,20
		23,93			31,76					
		24,03			31,59					

Anexo O - Valores provenientes da análise do qRTPCR do grupo saudáveis

Amostra	Endógeno	Ct	média	Alvo	Ct	média	DCt	média DCt grupo
SP	GAPDH	19,87	19,76	RCAN1	26,51	26,42	6,65	7,52
		19,72			26,34			
		19,69			26,40			
MR	GAPDH	24,41	24,49	RCAN1	31,43	31,09	6,60	
		24,43			30,75			
		24,62						
MB	GAPDH	19,56	19,47	RCAN1	27,64	27,39	7,91	
		19,49			27,30			
		19,38			27,22			
CB	GAPDH	21,10	21,02	RCAN1	30,40	29,43	8,41	
		21,03			31,11			
		20,94						
MBF	GAPDH	20,53	20,48	RCAN1	29,13	28,55	8,07	
		20,50			28,45			
		20,41			28,07			

--- 8. Referências

Bibliográficas

Abbas AK. Imunologia Celular e Molecular. 4^o Edição. Rio de Janeiro; Ed. Revinter; 2002.

American Academy of Pediatrics Committee on Genetics. Health supervision of children with Down syndrome. *Pediatrics*. 2001; 107: 442-9.

Akin K. Macrocytosis and leukopenia in Down's syndrome. *JAMA*. 1988. 12; 259: 842.

Arron JR, Winslow MM, Polleri A, Chang CP, Wu H, Gao X, Neilson JR, Chen L, Heit JJ, Kim SK, Yamasaki N, Miyakawa T, Francke U, Graef IA, Crabtree GR. NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nature*. 2006; 441: 595-600.

Aït Yahya-Graison E, Aubert J, Dauphinot L, Rivals I, Prieur M, Golfier G, Rossier J, Personnaz L, Creau N, Bléhaut H, Robin S, Delabar JM, Potier MC. Classification of human chromosome 21 gene-expression variations in Down syndrome: impact on disease phenotypes. *Am J Hum Genet*. 2007; 81: 475-91.

Aubareda A, Mulero MC, Pérez-Riba M. Functional characterization of the calcipressin 1 motif that suppresses calcineurin-mediated NFAT-dependent cytokine gene expression in human T cells. *Cell Signal*. 2006; 18:1430-8.

Anwar AJ, Walker JD, Frier BM. Type I diabetes mellitus and Down's syndrome: prevalence, management and diabetic complications. *Diabet Med* 1998; 15: 160-3.

Asai A, Qiu J, Narita Y, Chi S, Saito N, Shinoura N, Hamada H, Kuchino Y, Kirino T. High level calcineurin activity predisposes neuronal cells to apoptosis. *J Biol Chem*. 1999; 26; 274: 34450-8.

Bălăiță C, Christodorescu D, Gherghina I, Iscrulescu C. Humoral immunity in Down's syndrome. *Rom J Neurol Psychiatry*. 1992; 30: 55-61.

Barrena MJ, Echaniz P, Garcia-Serrano C, Cuadrado E. Imbalance of the CD4⁺ subpopulations expressing CD45RA and CD29 antigens in the peripheral blood of adults and children with Down syndrome. *Scand J Immunol*. 1993; 38: 323-6.

Borsatto B, Smith M. Reduction of the activity of ribosomal genes with age in Down's syndrome. *Gerontology*. 1996; 42: 147-54.

Boyum A. Separation of blood leucocytes, granulocytes and lymphocytes. *Tissue Antigens*. 1974; 4: 269-74.

Burgio GR, Ugazio AG, Nespoli L, Marcioni AF, Bottelli AM, Pasquali F. Derangements of immunoglobulin levels, phytohemagglutinin responsiveness and T and B cell markers in Down's syndrome at different ages. *Eur J Immunol*. 1975; 5: 600-3.

Burgio GR, Ugazio A, Nespoli L, Maccario R. Down syndrome: a model of immunodeficiency. *Birth Defects Orig Artic Ser*. 1983; 19: 325-7.

Casas C, Martinez S, Pritchard MA., Fuentes JJ, Nadal M, Guimerà J, Arbonés M, Flórez J, Soriano E, Estivill X, Alcántara S. Dscr1, a novel endogenous inhibitor of calcineurin signaling, is expressed in the primitive ventricle of the heart and during neurogenesis. *Mech. Dev*. 2001; 101: 289–

92.

Cocchi G, Mastrocola M, Capelli M, Bastelli A, Vitali F, Corvaglia L.

Immunological patterns in young children with Down syndrome: is there a temporal trend? *Acta Paediatr.* 2007; 96: 1479-82.

Chan B, Greenan G, Mckeen F, Ellenberg T. Identification of a peptide fragment of DSCR1 that competitively inhibits calcineurin activity in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102: 13075-80.

Chin ER, Olson EN, Richardson JA, Yang Q, Humphries C, Shelton JM, Wu H, Zhu W, Bassel-Duby R, Williams RS. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev.* 1998; 12: 2499-509.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987; 162: 156-9.

Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T- lymphocyte activation. *Nature*. 1992; 357: 695-7.

Cohen WI. Health care guidelines for individuals with Down syndrome: 1999 revision. *Down Syndrome Quar*. 1999; 4: 1–16.

Corsi MM, Malavazos AE, Passoni D, Licastro F. LDL receptor expression on T lymphocytes in old patients with Down syndrome. *Immun Ageing*. 2005; 2: 3.

Cossarizza A, Monti D, Montagnani G, Forabosco A, Dagna-Bicarelli F, Franceschi C. Fetal thymic differentiation in Down's syndrome. *Thymus*. 1989; 14: 163-70.

Cossarizza A, Monti D, Montagnani G, Ortolani C, Masi M, Zannotti M, Franceschi C. Precocious aging of the immune system in Down syndrome: alterations of B lymphocytes, T-lymphocyte subsets, and cells with natural killer markers. *Am J Med Genet Suppl*. 1990; 7: 213-8.

Cossarizza A, Ortolani C, Forti E, Montagnani G, Paganelli R, Zannotti M, Marini M, Monti D, Franceschi C. Age-related expansion of functionally inefficient cells with markers of natural killer activity in Down's syndrome. *Blood*. 1991; 77: 1263-70.

Costa-Carvalho BT, Martinez RM, Dias AT, Kubo CA, Barros-Nunes P, Leiva L, Solé D, Carneiro-Sampaio MM, Naspitz CK, Sorensen RU. Antibody response to pneumococcal capsular polysaccharide vaccine in Down syndrome patients. *Braz J Med Biol Res*. 2006; 39: 1587-92.

Crawford DR, Leahy KP, Abramova N, Lan L, Wang Y, Davies KJ. Hamster adapt78 mRNA is a Down syndrome critical region homologue that is inducible by oxidative stress. *Arch Biochem Biophys*. 1997; 342: 6-12.

Cuadrado E, Barrena MJ. Immune dysfunction in Down's syndrome: primary immune deficiency or early senescence of the immune system? *Clin Immunol Immunopathol*. 1996; 78: 209-14.

da Rosa Utiyama SR, Nisihara RM, Nass FR, Oliveira NP, Fiedler PT, de Messias-Reason IT. Autoantibodies in patients with Down syndrome: early senescence of the immune system or precocious markers for immunological diseases? *J Paediatr Child Health*. 2008; 44: 182-6.

Dalton AJ, Crapper-McLachlan DR. Clinical expression of Alzheimer disease in Down syndrome. *Psychiatr Clin North Am* 1986; 9: 959-70.

Davies KJ, Ermak G, Rothermel BA, Pritchard M, Heitman J, Ahnn J, Henrique-Silva F, Crawford D, Canaider S, Strippoli P, Carinci P, Min KT, Fox DS, Cunningham KW, Bassel-Duby R, Olson EN, Zhang Z, Williams RS, Gerber HP, Pérez-Riba M, Seo H, Cao X, Klee CB, Redondo JM, Maltais LJ, Bruford EA, Povey S, Molkentin JD, McKeon FD, Duh EJ, Crabtree GR, Cyert MS, de la Luna S, Estivill X. Renaming the DSCR1/Adapt78 gene family as RCAN: regulators of calcineurin. *FASEB J*. 2007; 21: 3023-8.

De Martinis M, Franceschi C, Monti D, Ginaldi L. Inflammageing and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. *FEBS Lett*. 2005; 579: 2035–9.

Dixon N, Kishnani PS, Zimmerman S. Clinical manifestations of hematologic and oncologic disorders in patients with Down syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2006; 142C: 149-57.

do Canto CL, Granato CF, Garcez E, Villas Boas LS, Fink MC, Estevam MP, Pannuti CS. Cytomegalovirus infection in children with Down syndrome in a day-care center in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2000; 42: 179-83.

Dörner K, Gaethke AS, Tolksdorf M, Schumann KP, Gustmann H. Cholesterol fractions and triglycerides in children and adults with Down's syndrome. *Clin Chim Acta*. 1984; 142: 307-11.

Elsayed SM, Elsayed GM. Phenotype of apoptotic lymphocytes in children with Down syndrome. . *Immun Ageing*. 2009. 6; 6: 2.

Epstein LB, Philip R. Abnormalities of the immune response to influenza antigen in Down syndrome (trisomy 21). *Prog Clin Biol Res*. 1987; 246: 163-82.

Ermak G, Harris CD, Davies KJ. The DSCR1 (Adapt78) isoform 1 protein calcipressin 1 inhibits calcineurin and protects against acute calcium-mediated stress damage, including transient oxidative stress. *FASEB J*. 2002; 16: 814-24.

Ermak G, Cheadle C, Becker KG, Harris CD, Davies KJA. *DSCR1 (Adapt78)* modulates expression of *SOD1*. *FASEB J*. 2004; 18: 62–69.

Ewart JL, Auerbach R. Defects in thymocyte differentiation and thymocyte-stromal interactions in the trisomy 16 mouse. *Dev Immunol*. 1992; 2: 215-26.

Ferreira CT, Leite JC, Tanaguchi AN, Vieira SM, Pereira-Lima J, da Silveira TR. Seroprevalence of hepatitis a antibodies in a group of normal and Down syndrome children in Porto Alegre, southern Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2002; 6: 225-31.

Ferreira CT, Leite JC, Taniguchi A, Vieira SM, Pereira-Lima J, da Silveira TR. Immunogenicity and safety of an inactivated hepatitis A vaccine in children with Down syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004; 39: 337-40.

Franceschi C, Bonafè M. Centenarians as a model for healthy aging. *Biochem Soc Trans*. 2003; 31: 457-61.

Franciotta D, Verri A, Zardini E, Andreoni L, De Amici M, Moratti R, Nespoli L. Interferon-gamma- and interleukin-4-producing T cells in Down's syndrome. *Neurosci Lett*. 2006; 395: 67-70.

Fruman DA, Klee CB, Bierer BE, Burakoff SJ. Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89: 3686-90.

Fuentes JJ, Pritchard MA, Planas AM, Bosch A, Ferrer I, Estivill X. A new human gene from the Down syndrome critical region encodes a proline-rich protein highly expressed in fetal brain and heart. *Hum Mol Genet*. 1995; 4: 1935-44.

Fuentes JJ, Pritchard MA, Estivill X. Genomic organization, alternative splicing, and expression patterns of the DSCR1 (Down syndrome candidate region 1) gene. *Genomics*. 1997; 44: 358-61.

Fuentes JJ, Genescà L, Kingsbury TJ, Cunningham KW, Pérez-Riba M, Estivill X, de la Luna S. DSCR1, overexpressed in Down syndrome, is an

inhibitor of calcineurin-mediated signaling pathways. *Hum Mol Genet.* 2000; 9: 1681-90.

Garrison MM, Jeffries H, Christakis DA. Risk of death for children with down syndrome and sepsis. *J Pediatr.* 2005; 147: 748-52.

Geggel RL, O'Brien JE, Feingold M. Development of valve dysfunction in adolescents and young adults with Down syndrome and no known congenital heart disease. *J Pediatr.* 1993; 122: 821-3.

Genescà L, Aubareda A, Fuentes JJ, Estivill X, De La Luna S, Pérez-Riba M. Phosphorylation of calcipressin 1 increases its ability to inhibit calcineurin and decreases calcipressin half-life. *Biochem J.* 2003; 374: 567-75.

Getz GS. Thematic review series: the immune system and atherogenesis. Bridging the innate and adaptive immune systems. *J Lipid Res.* 2005; 46: 619-22.

Giannone S, Strippoli P, Vitale L, Casadei R, Canaider S, Lenzi L, 'Addabbo P, Frabetti F, Facchin F, Farina A, Carinci P, Zannotti M. Gene expression profile analysis in human T lymphocytes from patients with Down Syndrome.

Ann Hum Genet. 2004; 68: 546-54.

Goldhaber SZ, Rubin IL, Brown W, Robertson N, Stubblefield F, Sloss LJ. Valvular heart disease (aortic regurgitation and mitral valve prolapse) among institutionalized adults with Down's syndrome. *Am J Cardiol.* 1986; 57:278-81.

Goldstein H. Menarche, menstruation, sexual relations and contraception of adolescent females with Down syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1988; 27: 343-9.

Görlach J, Fox DS, Cutler NS, Cox GM, Perfect JR, Heitman J. Identification and characterization of a highly conserved calcineurin binding protein, CBP1/calciressin, in *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J.* 2000; 19: 3618-29.

Górska D, Harmak E, Wehr H, Zdzienicka E. Serum lipids in Down's syndrome. *Neurol Neurochir.* 1976; 10: 463-7.

Hann HW, Deacon JC, London WT. Lymphocyte surface markers and serum immunoglobulins in persons with Down's syndrome. *Am J Ment Defic.* 1979; 84: 245-51.

Harris CD, Ermak G, Davies KJ. Multiple roles of the DSCR1 (Adapt78 or RCAN1) gene and its protein product calcipressin 1 (or RCAN1) in disease. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62: 2477-86.

Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, Watanabe H, Yada T, Park HS, Toyoda A, Ishii K, Totoki Y, Choi DK, Groner Y, Soeda E, Ohki M, Takagi T, Sakaki Y, Taudien S, Blechschmidt K, Polley A, Menzel U, Delabar J, Kumpf K, Lehmann R, Patterson D, Reichwald K, Rump A, Schillhabel M, Schudy A, Zimmermann W, Rosenthal A, Kudoh J, Schibuya K, Kawasaki K, Asakawa S, Shintani A, Sasaki T, Nagamine K, Mitsuyama S, Antonarakis SE, Minoshima S, Shimizu N, Nordsiek G, Hornischer K, Brant P, Scharfe M, Schon O, Desario A, Reichelt J, Kauer G, Blocker H, Ramser J, Beck A, Klages S, Hennig S, Riesselmann L, Dagand E, Haaf T, Wehrmeyer S, Borzym K, Gardiner K, Nizetic D, Francis F, Lehrach H, Reinhardt R, Yaspo ML; Chromosome 21 mapping and sequencing consortium. The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature.* 2000; 405: 311-9.

Hawkes RA, Boughton CR, Schroeter DR. The antibody response of institutionalized Down's syndrome patients to seven microbial antigens. *Clin Exp Immunol*. 1978; 31: 298-304.

Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, Fichtlscherer S, Boersma E, Simoons ML, Zeiher AM; CAPTURE Study Investigators. Serum level of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 is an important prognostic determinant in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. 2003; 107: 2109-14.

Hesser BA, Liang XH, Camenisch G, Yang S, Lewin DA, Scheller R, Ferrara N, Gerber HP. Down syndrome critical region protein 1 (DSCR1), a novel VEGF target gene that regulates expression of inflammatory markers on activated endothelial cells. *Blood*. 2004; 104: 149-58.

Hilioti Z, Gallagher DA, Low-Nam ST, Ramaswamy P, Gajer P, Kingsbury TJ, Birchwood CJ, Levchenko A, Cunningham KW. GSK-3 kinases enhance calcineurin signaling by phosphorylation of RCNs. *Genes Dev*. 2004; 18: 35-47.

Holt PA, Goodall B, Lees EM, Hambling MH. Prevalence of Hepatitis B markers in patients and staff in a hospital for the mentally handicapped. *Hosp infect.* 1986; 7: 26-33.

Honig LS, Rosenberg RN. Apoptosis and neurologic disease. *Am J Med.* 2000; 108: 317-30.

Hopkins WE, Fukagawa NK, Sobel BE, Schneider DJ. Plasminogen activator inhibitor type 1 in adults with Down syndrome and protection against macrovascular disease. *Am J Cardiol.* 2000; 85: 784-6.

Hubbard MJ, Klee CB. Functional domain structure of calcineurin A: mapping by limited proteolysis. *Biochemistry.* 1989; 28: 1868-74.

Hughes SM. Muscle development: electrical control of gene expression. *Curr Biol.* 1998; 8: R892-4.

Kaszubowska L. Telomere shortening and ageing of the immune system. *J o Physiol Pharmacol.* 2008; 59: 169-86.

Kayyali US, Zhang W, Yee AG, Seidman JG, Potter H. Cytoskeletal changes in the brains of mice lacking calcineurin A alpha. *J Neurochem.* 1997; 68: 1668-78.

Kennedy RL, Jones TH, Cuckle HS. Down's syndrome and the thyroid. *Clin Endocrinol.* 1992; 37: 471-6.

Kim YS, Cho KO, Lee HJ, Kim SY, Sato Y, Cho YJ. Down syndrome candidate region 1 increases the stability of the IkappaB alpha protein: implications for its anti-inflammatory effects. *J Biol Chem.* 2006; 281: 39051-61.

Kivivuori SM, Rajantie J, Siimes MA. Peripheral blood cell counts in infants with Down's syndrome. *Clin Genet.* 1996; 49: 15-9.

Krebs J. The role of calcium in apoptosis. *Biometals*. 1998; 11: 375–82.

Lacko AG, Hayes JD, McConathy WJ, Lacko I, Redheendran R. Lecithin: Cholesterol Acyltransferase in Down's Syndrome. *Clin Chim Acta*. 1983; 132: 133-41.

Lange B. The management of neoplastic disorders of haematopoiesis in children with Down's syndrome. *Br J Haematol*. 2000; 110: 512-24.

Leahy KP, Davies KJ, Dull M, Kort JJ, Lawrence KW, Crawford DR. adapt78, a stress-inducible mRNA, is related to the glucose-regulated protein family of genes. *Arch Biochem Biophys*. 1999; 368: 67-74.

Leinwand LA. Calcineurin inhibition and cardiac hypertrophy: A matter of balance. *PNAS*. 2001; 98: 2947–49.

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

Licastro F, Candore G, Lio D, Porcellini E, Colonna-Romano G, Franceschi C, Caruso C. Innate immunity and inflammation in ageing: a key for understanding age-related diseases. *Immun Ageing*. 2005; 2:8.

Lin HY, Michtalik HJ, Zhang S, Andersen TT, Van Riper DA, Davies KK, Ermak G, Petti LM, Nachod S, Narayan AV, Bhatt N, Crawford DR. *Oxidative and calcium stress regulate DSCR1 (Adapt78/MCIP1) protein*. *Free Radic Biol Med*. 2003; 35: 528-39.

Li Volti S, Mattina T, Mauro L, Bianca S, Anfuso S, Ursino A, Mollica F. Safety and effectiveness of an acellular pertussis vaccine in subjects with Down's syndrome. *Child Nerv Syst*. 1996; 12: 100–2.

Liu J, Farmer JD Jr, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*. 1991; 66: 807-15.

Lizuka M, Abe M, Shiiba K, Sasaki I, Sato Y. Down syndrome candidate region 1, a downstream target of VEGF, participates in endothelial cell migration and angiogenesis. *J Vasc Res.* 2004; 4: 334-44.

Macian F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5: 472-84.

Mansuy IM, Mayford M, Jacob B, Kandel ER, Bach ME. Restricted and regulated overexpression reveals calcineurin as a key component in the transition from short-term to long-term memory. *Cell.* 1998; 92: 39-49.

McKay E, Hems G, Massie A, Moffat MA, Phillips KM. Serum antibody to poliovirus in patients in a mental deficiency hospital, with particular reference to Down's syndrome. *J Hyg (Lond).* 1978; 81: 25-30.

Meijerink J, Mandigers C, van de Locht L, Tönnissen E, Goodsaid F, Raemaekers J. A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR.

J Mol Diagn. 2001; 3: 55-61.

Michtalik HJ, Narayan AV, Bhatt N, Lin HY, Mulligan MT, Zhang SL, Crawford DR. Multiple oxidative stress-response members of the Adapt78 family.*Free Radic Biol Med.* 2004; 37: 454-62.

Minami T, Horiuchi K, Miura M, Abid MR, Takabe W, Noguchi N, Kohro T, Ge X, Aburatani H, Hamakubo T, Kodama T, Aird WC. Vascular endothelial growth factor- and thrombin-induced termination factor, Down syndrome critical region-1, attenuates endothelial cell proliferation and angiogenesis. *J Biol Chem.* 2004; 279: 50537-54.

Minami T, Miura M, Aird WC, Kodama T. Thrombin-induced autoinhibitory factor, Down syndrome critical region-1, attenuates NFAT-dependent vascular cell adhesion molecule-1 expression and inflammation in the endothelium. *J Biol Chem.* 2006; 281: 20503-20.

Minami T, Yano K, Miura M, Kobayashi M, Suehiro J, Reid PC, Hamakubo T, Ryeom S, Aird WC, Kodama T. The Down syndrome critical region gene 1 short variant promoters direct vascular bed-specific gene expression during inflammation in mice. *J. Clin. Invest.* 2009; 119: 2257–70.

Morrison RA, McGrath A, Davidson G, Brown JJ, Murray GD, Lever AF. Low blood pressure in Down's syndrome, A link with Alzheimer's disease? *Hypertension.* 1996; 28: 569-75.

Murdoch JC, Rodger JC, Rao SS, Fletcher CD, Dunnigan MG. Down's syndrome: an atheroma-free model? *Br Med J.* 1977; 2: 226-8.

Murphy M, Lempert MJ, Epstein LB. Decreased level of T cell receptor expression by Down syndrome (trisomy 21) thymocytes. *Am J Med Genet Suppl.* 1990; 7: 234-7.

Murphy M, Epstein LB. Down syndrome (DS) peripheral blood contains phenotypically mature CD3+TCR alpha, beta+ cells but abnormal proportions of TCR alpha, beta+, TCR gamma, delta+, and CD4+ CD45RA+ cells: evidence for an inefficient release of mature T cells by the DS thymus. *Clin Immunol Immunopathol.* 1992; 62: 245-51.

Murphy M, Insoft RM, Pike-Nobile L, Epstein LB. A hypothesis to explain the immune defects in Down syndrome. *Prog Clin Biol Res.* 1995; 393: 147-67.

Myers BA, Pueschel SM. Psychiatric disorders in persons with Down syndrome. *J Nerv Ment Dis.* 1991; 179: 609-13.

Nespoli L, Burgio GR, Ugazio AG, Maccario R. Immunological features of Down's syndrome: a review. *J Intellect Disabil Res.* 1993; 37: 543-51.

Nilsson J. Regulating protective immunity in atherosclerosis. *Circ Res.* 2005; 96: 395-7.

Nishida Y, Akaoka I, Nishizawa T, Maruki M, Maruki K. Hyperlipidaemia in patients with Down's syndrome. *Atherosclerosis.* 1977; 26: 369-72.

Nishida Y, Sano Y, Akaoka I, Maruki M, Suzuki T, Maruki K. Abnormal serum immunoglobulin levels in Down's syndrome patients. *Am J Ment Defic.* 1978; 83: 16-20.

Noble SE, Leyland K, Findlay CA, Clark CE, Redfern J, Mackenzie JM, Girdwood RW, Donaldson MD. School based screening for hypothyroidism in Down's syndrome by dried blood spot TSH measurement. *Arch Dis Child.* 2000; 82: 27-31.

Nordström M, Kjellström T. Age dependency of cystathionine beta-synthase activity in human fibroblasts in homocyst(e)inemia and atherosclerotic vascular disease. *Atherosclerosis.* 1992; 94: 213-21.

Northrop JP, Ho SN, Chen L, Thomas DJ, Timmerman LA, Nolan GP, Admon A, Crabtree GR. NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation. *Nature.* 1994; 369: 497-502.

Nurmi T, Leinonen M, Häivä VM, Tiilikainen A, Kouvalainen K. Antibody response to pneumococcal vaccine in patients with trisomy -21 (Down's syndrome). *Clin Exp Immunol.* 1982; 48(2):485-90.

Oda M, Hakamada R, Ono K, Higurashi M. A seroimmunological analysis of Down syndrome. *Gerontology*. 1993; 39: 16-23.

Ohgami N, Nagai R, Ikemoto M, Arai H, Kuniyasu A, Horiuchi S, Nakayama H. CD36, a member of class B scavenger receptor family, is a receptor for advanced glycation end products. *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 947: 350-5.

Olson JC , Bender JC, Levinson JE, Oestreich A, Lovell DJ. Arthropathy of Down syndrome. *Pediatrics*. 1990; 86: 931-6.

O'Shea JJ, Ma A, Lipsky P. Cytokines and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2: 37-45.

Park E, Alberti J, Mehta P, Dalton A, Sersen E, Schuller-Levis G. Partial impairment of immune functions in peripheral blood leukocytes from aged men with Down's syndrome. *Clin Immunol*. 2000; 95: 62-9.

Parry RV, June CH. Calcium-independent calcineurin regulation. *Nat Immunol.* 2003; 4: 821 -3.

Patterson D. Molecular genetic analysis of Down syndrome. *Hum Genet.* 2009; 126: 195-214.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res. Nucleic Acids Res.* 2001^a; 29: e45.

Pfaffl MW. Quantification strategies in real-time PCR. A-Z of quantitative PCR. *Ed. SA Bustin.* 2001^b; 3:123.

Pfister SC, Machado-Santelli GM, Han SW, Henrique-Silva F. Mutational analyses of the signals involved in the subcellular location of DSCR1. *BMC Cell Biol.* 2000; 3:24.

Philip R, Berger AC, McManus NH, Warner NH, Peacock MA, Epstein LB. Abnormalities of the *in vitro* cellular and humoral responses to tetanus and influenza antigens with concomitant numerical alterations in lymphocyte subsets in Down syndrome (trisomy 21). *J Immunol.* 1986; 136: 1661-7.

Pueschel SM, Orson JM, Boylan JM, Pezzullo JC. Adolescent development in males with Down syndrome. *Am J Dis Child*. 1985; 139: 236-8.

Pueschel SM, Louis S, Mcknight P. Seizures disorders in Down syndrome *Arch Neurol*. 1991; 48: 318-20.

Pueschel SM, Craing WY, Haddow JE. Lipids and lipoproteins in persons with Down's syndrome. *J Intellect Disabil Res*. 1992; 36: 365-9.

Qin L, Zhao D, Liu X, Nagy JA, Hoang MV, Brown LF, Dvorak HF, Zeng H. Down Syndrome Candidate Region 1 Isoform 1 Mediates Angiogenesis through the Calcineurin-NFAT Pathway. *Mol Cancer Res*. 2006; 4: 811–20.

Rabinowe SL, Rubin IL, George KL, Adri MN, Eisenbarth GS. Trisomy 21 (Down's syndrome): autoimmunity, aging and monoclonal antibody-defined T-cell abnormalities. *J Autoimmun*. 1989; 2: 25-30.

Ribeiro LM, Jacob CM, Pastorino AC, Kim CA, Fomin AB, Castro AP.

Evaluation of factors associated with recurrent and/ or severe infections in patients with Down's syndrome, *J Pediatr (Rio J)*. 2003; 79: 141-8.

Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor- α and Increased risk of recurrent coronary events After myocardial Infarction *Circulation*. 2000; 101: 2149-53.

Ridker PM, Brown NJ, MD; Vaughan DE, Harrison DG, Mehta JL. Established and Emerging Plasma Biomarkers in the Prediction of First Atherothrombotic Events. *Circulation*. 2004; 109: 6 - 19.

Roizen NJ, Mets MB, Blondis TA. Ophthalmic disorders in children with Down syndrome. *Dev Med Child Neurol*. 1994; 36: 594-600.

Roizen NJ, Wolters C, Nicol T, Blondis TA. Hearing loss in children with Down syndrome. *J Pediatr*. 1993^a; 123: S9-12.

Roizen NJ, Amarose AP. Hematologic abnormalities in children with Down syndrome. *Am J Med Genet.* 1993^b; 46: 510-2.

Roizen NJ. Medical care and monitoring for the adolescent with Down syndrome. *Adolesc Med.* 2002; 13:345–58, vii.

Roizen NJ, Patterson DP. Down's syndrome. *Lancet.* 2003; 361:1281-9.

Rothermel B, Vega RB, Yang J, Wu H, Bassel-Duby R, Williams RS. A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated muscles and inhibits calcineurin signaling. *J Biol Chem.* 2000; 275: 8719-25.

Salo MK, Solakivi-Jaakkola T, Kivimaki T, Nikkari T. Plasma Lipids and Lipoproteins in Down's syndrome. *Scand J Clin Lab Invest.* 1979; 39: 485-90.

Sambrook J, Gething MJ. Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature.* 1989; 342: 224-5.

Sanna B, Brandt EB, Kaiser RA, Pfluger P, Witt SA, Kimball TR, van Rooij E, De Windt LJ, Rothenberg ME, Tschop MH, Benoit SC, Molkentin JD. Modulatory calcineurin-interacting proteins 1 and 2 function as calcineurin facilitators in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103: 7327-32.

Sansoni P, Cossarizza A, Brianti V, Fagnoni F, Snelli G, Monti D, Marcato A, Passeri G, Ortolani C, Forti E, Fagiolo U, Passeri M, Franceschi C. Lymphocyte Subsets and Natural Killer Cell Activity in Healthy Old People and Centenarians. *Blood*. 1993; 82: 2767-73.

Sansoni P, Vescovini R, Fagnoni F, Biasini C, Zanni F, Zanlari L, Telera A, Lucchini G, Passeri G, Monti D, Franceschi C, Passeri M. The immune system in extreme longevity. *Exp Gerontol*. 2008; 43: 61-5.

Saran NG, Pletcher MT, Natale JE, Cheng Y, Reeves RH. Global disruption of the cerebellar transcriptome in a Down syndrome mouse model. *Hum Mol Genet*. 2003; 12: 2013–19.

Satgé D, Sasco AJ, Carlsen NL, Stiller CA, Rubie H, Hero B, de Bernardi B, de Kraker J, Coze C, Kogner P, Langmark F, Hakvoort-Cammel FG, Beck D, von der Weid N, Parkes S, Hartmann O, Lippens RJ, Kamps WA, Sommelet

D.A lack of neuroblastoma in Down's syndrome: a study from 11 European countries. *Cancer Res.* 1998; 58: 448–52.

Seger R, Buchinger G, Ströder J. On the influence of age on immunity in Down's syndrome. *Eur J Pediatr.* 1977; 124: 77-87.

Shapiro BL Developmental instability of the cerebellum and its relevance to Down syndrome. *J Neural Transm.* 2001; 61:11–34.

Shibasaki F, McKeon F. Calcineurin functions in Ca (2+)-activated cell death in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 1995; 131: 735–43.

Troisi C L, Heiberg DA, Hollinger F B. Normal immune response to hepatitis B vaccine in patients with Down's syndrome. A basis for immunization guidelines. *JAMA.* 1985; 254: 3196-9.

Ugazio AG, Maccario R, Notarangelo LD, Burgio GR. Immunology of Down syndrome: a review. *Am J Med Genet Suppl.* 1990; 7: 204-12.

Vaziri H, Schächter F, Uchida I, Wei L, Zhu X, Effros R, Cohen D, Harley CB. Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am J Hum Genet.* 1993; 52: 661-7.

Vega RB, Yang J, Rothermel BA, Bassel-Duby R, Williams RS. Multiple domains of MCIP1 contribute to inhibition of calcineurin activity. *J Biol Chem.* 2002; 277: 30401-7.

Wachtel TJ, Pueschel SM. Macrocytosis in Down syndrome. *Am J Ment Retard.* 1991; 95: 417-20.

Weerkamp F, de Haas EF, Naber BA, Comans-Bitter WM, Bogers AJ, van Dongen JJ, Staal FJ. Age-related changes in the cellular composition of the thymus in children. *J Allergy Clin Immunol.* 2005; 115: 834-40.

Winder DG, Mansuy IM, Osman M, Moallem TM, Kandel ER. Genetic and pharmacological evidence for a novel, intermediate phase of long-term potentiation suppressed by calcineurin. *Cell*. 1998; 92: 25-37.

Wu H, Kao S, Barrientos T, Baldwin SH, Olson EN, Crabtree GR, Zhou B, Chang CP. Down Syndrome Critical Region-1 Is a Transcriptional Target of Nuclear Factor of Activated T Cells-c1 within the Endocardium during Heart development. *The Journal Biol Chem*. 2007; 282: 30673–79.

Yamamoto N, Uzawa K, Miya T, Watanabe T, Yokoe H, Shibahara T, Noma H, Tanzawa H. Frequent allelic loss/imbalance on the long arm of chromosome 21 in oral cancer: evidence for three discrete tumor suppressor gene loci. *Oncol Rep*. 1999; 6: 1223-7.

Yang Q, Rasmussen SA, Friedman JM. Mortality associated with Down's syndrome in the USA from 1983 to 1997: a population-based study. *Lancet*. 2002; 359: 1019-25.

Yasui K, Shinozaki K, Nakazawa T, Agematsu K, Komiyama A. Presenility of granulocytes in Down syndrome individuals. *Am J Med Genet*. 1999; 84: 406-12.

Zachor DA, Mroczek-Musulman E, Brown P. Prevalence of celiac disease in Down syndrome in the United States. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000; 31: 275-9.

Zamorano A, Guzmán M, Aspillaga M, Avendaño A, Gatica M. Concentrations of serum lipids in children with Down's syndrome. *Arch Biol Med Exp.* 1991; 24: 49-55.

Zhuo M, Zhang W, Son H, Mansuy I, Sobel RA, Seidman J, Kandel ER. A selective role of calcineurina alpha in synaptic depotentiation in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96: 4650-5.

9. *Apêndices*

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I- DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II- DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA. **Mecanismos imunológicos e inflamatórios na síndrome de Down**
2. PESQUISADOR: **João Batista Serro-Azul**
CARGO/FUNÇÃO: **Médico Assistente** INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **47824**
UNIDADE DO HCFMUSP: **Unidade Clínica de Cardiogeriatría – InCor/HC/FMUSP**
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
SEM RISCO X	RISCO MÍNIMO	RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO	RISCO MAIOR	
- (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : **4 anos**
-

III- REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA

1. **JUSTIFICATIVA E OS OBJETIVOS DA PESQUISA:** Adquirir mais conhecimentos sobre os mecanismos imunológicos, ou seja a defesa contra as infecções, e inflamatórios que podem influir na formação de placas de gordura nas paredes das artérias.
2. **PROCEDIMENTOS QUE SERÃO UTILIZADOS E PROPÓSITOS, INCLUINDO A IDENTIFICAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS QUE SÃO EXPERIMENTAIS:** Nós faremos uma coleta de 25 ml de sangue para realização de vários exames incluindo a contagem de glóbulos vermelhos, de glóbulos brancos e de plaquetas, a dosagem dos fatores de defesa para vários tipos de infecções, os chamados anticorpos, a avaliação minuciosa dos glóbulos brancos por meio de cultura celular e a verificação dos tipos de glóbulos brancos. A partir da cultura dos glóbulos brancos, iremos fazer a avaliação genética (código da célula) e observar a resposta contra as infecções e relacioná-la com a formação de placa de gordura nas artérias. Conforme o tipo de resposta, o organismo pode favorecer a formação de placas de gordura nas artérias e pode reagir de diferentes formas perante a infecções. Essa coleta de sangue será realizada no dia da consulta de rotina e não serão necessários novos retornos relacionados a essa pesquisa.
3. **DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS:** Durante a coleta de sangue o paciente poderá sentir-se mal caso tenha medo de agulha ou poderá ficar com dor ou um roxo no lugar da picada.
4. **BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS:** Conhecendo os tipos de respostas imunológicas e inflamatórias poderemos iniciar novas estratégias de tratamento tanto do ponto de vista de antibióticos, para prevenir infecções, bem como saber se iremos ou não tratar fatores de risco cardiovascular, como o colesterol aumentado.
5. **PROCEDIMENTOS ALTERNATIVOS QUE POSSAM SER VANTAJOSOS PARA O INDIVÍDUO:** O paciente continuará tendo o mesmo acompanhamento clínico no Ambulatório de Cardiogeriatría, mesmo no caso de desistência da pesquisa.

IV- ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA: 1. ACESSO, A QUALQUER TEMPO, ÀS INFORMAÇÕES SOBRE PROCEDIMENTOS, RISCOS E BENEFÍCIOS RELACIONADOS À PESQUISA, INCLUSIVE PARA ESCLARECER EVENTUAIS DÚVIDAS; 2. LIBERDADE DE RETIRAR SEU CONSENTIMENTO A QUALQUER MOMENTO E DE DEIXAR DE PARTICIPAR DO ESTUDO, SEM QUE ISTO TRAGA PREJUÍZO À CONTINUIDADE DA ASSISTÊNCIA; 3. SALVAGUARDA DA CONFIDENCIALIDADE, SIGILO E PRIVACIDADE; 4. DISPONIBILIDADE DE ASSISTÊNCIA NO HCFMUSP, POR EVENTUAIS DANOS À SAÚDE, DECORRENTES DA PESQUISA; 5. VIABILIDADE DE INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS À SAÚDE DECORRENTES DA PESQUISA.

V- INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Em caso de dúvidas você poderá entrar em contacto conosco pelos telefones: 3069.5306/ 3069.5449 (DR. JOÃO BATISTA DE SERRO AZUL OU DRA MARIA BEATRIZ FORTUNATO) – Instituto do Coração/InCor-HCFMUSP

VI- OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII- CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, de de 200 .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)