

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Avaliação de níveis séricos de imunoglobulinas e atividade da adenosina deaminase em eritrócitos e linfócitos de portadores de Síndrome de Down

Gabriela Nogueira Debom

Pelotas, 2014

Gabriela Nogueira Debom

Avaliação de níveis séricos de imunoglobulinas e atividade da adenosina deaminase em eritrócitos e linfócitos de portadores de Síndrome de Down

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador Acadêmico: Prof^a. Dr^a. Roselia Maria Spanevello

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

D287a Debom, Gabriela Nogueira

Avaliação de níveis séricos de imunoglobulinas e atividade da adenosina deaminase em eritrócitos e linfócitos de portadores de Síndrome de Down / Gabriela Nogueira Debom. – 47f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2014. – Orientador Roselia Maria Spanevello.

1.Biotecnologia. 2.Síndrome de Down.
3.Imunoglobulinas. 4.Adenosina deaminase. 5.Proteína C-reativa. I.Spanevello, Roselia Maria. II.Título.

Gabriela Nogueira Debom

Avaliação de níveis séricos de imunoglobulinas e atividade da adenosina deaminase em eritrócitos e linfócitos de portadores de Síndrome de Down

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Pelotas, 09 de janeiro de 2014

Banca examinadora:

Prof^a Dr^a Roselia Maria Spanevello (Orientadora)
Doutora em Ciência Biológicas-Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a Dr^a Francieli Moro Stefanello
Doutora em Ciência Biológicas-Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

M^a. Elita Ferreira da Silveira
Mestre em Bioquímica e Bioprospecção pela Universidade Federal de Pelotas

Aos meus exemplos, em todos os âmbitos da minha vida. Às pessoas que conviveram diariamente comigo durante a realização desse trabalho, que tiveram paciência e acima de tudo compreensão com os mais diferentes momentos e emoções que eu passei. Muito obrigada.

AGRADECIMENTOS:

Aos meus familiares mais próximos, em especial minha mãe Maria Laura, meu padrasto Luiz Fernando e meu irmão Rodrigo, que dividiram muitas angústias e indecisões sob o mesmo teto durante estes 4 anos e tornaram este trabalho possível pelo apoio incondicional e aconselhamento em todos os momentos.

Ao meu pai, pelo exemplo de profissional, pelo amor e carinho, e pelas diversas conversas travadas sobre assuntos polêmicos que influenciaram muito a minha formação.

À minha madrinha, Carmem Regina, por me servir de exemplo e me auxiliar com os trâmites ao longo de toda a minha graduação. Por me perguntar sempre se eu estava feliz e satisfeita com as situações.

Ao meu parceiro de todos os momentos, Matheus, pelas inúmeras palavras de conforto e por estar ao meu lado dividindo as frustrações e etapas difíceis. Essa conquista também é tua.

Aos meus colegas e amigos Emily, Jessica e Lucas, pelo apoio e companheirismo nos trabalhos de grupo. Vocês foram de grande importância da minha jornada, e contribuíram não só para o meu crescimento profissional, mas também para o meu amadurecimento pessoal.

Ao meus companheiros de laboratório, que são mais do que colegas, mas verdadeiros amigos. Ao meu colega de graduação, Carlus, que além disso se tornou colega de estágio, de laboratório, e amigo de coração. Obrigada pelas dúvidas sanadas e pelas discussões sobre bioética.

Às minhas amigas, companheiras de laboratório e de congressos, Elita e Fernanda, que me auxiliaram ao longo da minha graduação e da minha formação profissional. Muito além disso, me ajudaram em conflitos pessoais, e me mostraram que um laboratório pode ser muito mais do que um local de trabalho, mas um ambiente promissor para amizades para toda a vida.

Às minhas orientadoras, Roselia Spanevello e Elizandra Braganhol, pela dedicação à pesquisa e ajuda, tanto pelo lado profissional quanto pelo lado pessoal. Agradeço pela oportunidade de estagiar no laboratório NEUROCAN e de participar de

tantos trabalhos interessantes, que me agregaram muitos conhecimentos que levarei para o resto da minha vida.

Ao Prof. Dr. Alexandre Marques e aos participantes do Projeto Carinho, por permitir que eu realizasse as minhas atividades, além da paciência e hospitalidade. Sem a ajuda destes a realização deste trabalho não seria possível.

Aos pacientes portadores de Síndrome de Down, e aos seus familiares, pela disponibilidade, paciência e curiosidade com que levaram todas as visitas que foram feitas. Sou grata pela tranquilidade com que levaram as coletas, e pela facilidade de conversar com os pais, tão acessíveis quando nós precisávamos.

Ao colega de laboratório Rodrigo, por me ajudar nos momentos iniciais da minha iniciação científica e nos finais do meu trabalho de conclusão.

À UFPel, por me abrigar durante o período de graduação, iniciação científica e estágio, e dessa maneira permitir que fossem feitas as pesquisas necessárias para este trabalho.

Às agências de fomento, CNPq e FAPERGS pelo auxílio à minha pesquisa.

OBRIGADA!

RESUMO

DEBOM, Gabriela Nogueira. **Avaliação de níveis séricos de imunoglobulinas e atividade da adenosina deaminase em eritrócitos e linfócitos de portadores de Síndrome de Down.** 2014. 47f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

A Síndrome de Down (SD) é uma anomalia cromossômica causada devido à triplicação completa ou parcial do cromossomo 21. Pacientes com SD exibem um aumento na ocorrência de infecções, principalmente de ordem respiratória. O sistema purinérgico, principalmente a adenosina, tem papel importante nos mecanismos complexos da inflamação, e a Adenosina Deaminase (ADA) é uma importante enzima justamente por controlar os níveis extracelulares deste nucleosídeo em sítios inflamatórios. No presente estudo foram avaliadas as atividades desta enzima do sistema purinérgico em linfócitos e eritrócitos, assim como a proteína C-reativa e os níveis de imunoglobulinas em amostras de pacientes com SD e indivíduos saudáveis. A população foi constituída de 10 adultos com SD e 10 adultos saudáveis como grupo controle. Os resultados obtidos demonstraram que houve um aumento na atividade da ADA nos dois tipos celulares testados em relação ao grupo controle ($P < 0.05$). Além disso, foi notado um aumento significativo nos níveis de imunoglobulinas IgA e IgG nas amostras de pacientes com SD quando comparados a indivíduos controle, enquanto que IgM e IgE não houve modificação ($P < 0.05$). Os níveis de proteína C-reativa permaneceram inalterados em relação ao grupo controle. Estes resultados sugerem que tanto as alterações visualizadas na atividade da ADA quanto a diferença nos níveis de imunoglobulinas em pacientes com SD podem vir a contribuir para as alterações imunológicas observadas na trissomia do 21.

Palavras-chave: Síndrome de Down, Linfócitos, Eritrócitos, ADA, Proteína C reativa, Imunoglobulinas

ABSTRACT

DEBOM, Gabriela Nogueira. **Evaluation of serum immunoglobulin levels and adenosine deaminase activity in erythrocytes and lymphocytes from patients with Down Síndrome.** 2014. 47f. Term paper (Graduation in Biotecnologia) – Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

Down Syndrome (DS) is a chromosomal alteration characterized by the presence of an extra copy of chromosome 21. Subjects with DS exhibit an increased susceptibility to infections, mainly respiratory order. The purinergic signalling, in particular adenosine, plays a key role in inflammation, and Adenosine Deaminase (ADA) is a important enzyme in the control of extracellular levels of these molecule at inflammatory sites. In this study we evaluated the activities of this enzyme in lymphocytes and erythrocytes, as well as C-reactive protein and immunoglobulins levels in samples of DS individuals and healthy subjects. The population consisted of 10 adults with DS and 10 healthy subjects as a control group. Results showed that ADA activity in both cell types was significantly increased in DS patients in relation to the control group ($P < 0.05$). Furthermore was observed a significant increase of immunoglobulins IgA and IgG in samples of DS patients when compared to healthy subjects, whereas IgM and IgE did not change ($P < 0.05$). The levels of C-reactive protein remained unchanged in relation to the control group. These findings suggest that alterations in the ADA activity changes as well as the immunoglobulins levels may contribute to immunological alterations observed in this genetic disorder.

Key words: Down syndrome, Lymphocytes, Erythrocytes, ADA, C-reactive protein, Immunoglobulins

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Cariótipo de um portador de Síndrome de Down (47,XX,+21), caracterizado pela presença de um cromossomo 21 extra.....	15
Figura 2	Características fenotípicas de portadores da Síndrome de Down	16
Figura 3	Diferenças entre mecanismos e células da imunidade do organismo, que é dividida em Imunidade Inata e Imunidade Adaptativa.....	18
Figura 4	Células imunes diferenciadas a partir de linfócitos do tipo B e linfócitos do tipo T.....	21
Figura 5	Enzimas envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos e nucleosídeo de adenina até a geração de inosina.....	23
Figura 6	Cascata de hidrólise de ATP extracelular até adenosina extracelular e suas funções como moduladora do sistema imune...	26
Figura 7	Representação em 3D da enzima ADA.....	27
Figura 8	Representação da reação de hidrólise da adenosina feita pela enzima ADA, e produção de indofenol, na presença de hipoclorito, fenol e nitroprussiato de sódio.....	33
Figura 9	Níveis de proteína C reativa em soro de portadores de Síndrome de Down (SD) e indivíduos controle.....	34
Figura 10	Atividade da enzima adenosina deaminase em linfócitos de portadores de Síndrome de Down (SD) e indivíduos controle.....	35
Figura 11	Atividade da enzima adenosina deaminase em eritrócitos de portadores de Síndrome de Down (SD) e indivíduos controle.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Diferenças entre as principais imunoglobulinas, também conhecidas como anticorpos.....	19
Tabela 2	Níveis de imunoglobulinas séricas em soro de portadores de Síndrome de Down (SD) e indivíduos controle.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,3 – BPG	2,3 bifosfoglicerato
ADA	Adenosina Deaminase
ADP	Adenosina difosfato
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
ETA	Ácido etilenodiamino tetracético
CD39 (E-NTPDase 1)	Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
CD73	Ecto-5'-nucleotidase
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
IFN- γ	Interferon γ
Ig	Imunoglobulinas
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NK	Células <i>Natural Killers</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Proteína C reativa
SCID	Imunodeficiência Combinada Grave
SD	Síndrome de Down
TCR	Receptores de antígenos de células T
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1	Introdução	14
2	Objetivos	16
2.1	Objetivo geral	16
2.2	Objetivos específicos	16
3	Revisão de literatura	17
3.1	Síndrome de Down.....	17
3.2	Sistema imunológico	20
3.3	Alterações imunológicas relacionadas à Síndrome de Down	24
3.4	Sistema purinérgico.....	25
3.5	Papel da adenosina na resposta imune	26
3.6	Adenosina deaminase	29
4	Metodologia.....	32
4.1	População e amostragem.....	32
4.2	Coleta do material biológico	32
4.3	Separação de eritrócitos.....	32
4.4	Separação de linfócitos	33
4.5	Imunoglobulinas	33
4.6	Proteína C Reativa	35
4.7	Determinação da atividade da adenosina deaminase em linfócitos e eritrócitos.....	35
4.8	Análise estatística	35
5	Resultados	36
6	Discussão.....	38
7	Conclusão	41
	Referências	42

1 Introdução

A Síndrome de Down (SD) é uma anomalia cromossômica causada devido à triplicação completa ou parcial do cromossomo 21, sendo a alteração cromossômica (cromossopatia) mais comum em humanos e a principal causa de deficiência intelectual na população (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). Indivíduos com SD podem apresentar 3 tipos de cariótipos diferentes: Trissomia Simples, Translocação e Mosaico. Todos estes tipos apresentam algum grau da trissomia do cromossomo 21 (MOREIRA *et al.*, 2000).

Estudos demonstram que pacientes com SD apresentam uma ocorrência aumentada de infecções, principalmente recorrentes, quando comparados com indivíduos saudáveis. Este fato pode ser explicado por diversas disfunções que estes pacientes possuem ao longo do seu sistema imunológico, desde alterações morfológicas no timo até diminuição das taxas de células imunes, como linfócitos B e T (RIBEIRO *et al.*, 2003; KUSTERS *et al.*, 2011). Estas disfunções podem estar relacionadas com uma maior frequência de infecções como otites, pneumonias, infecções por *influenza*, além de doenças auto imunes, como doença celíaca e tireoidite autoimune (NISIHARA *et al.*, 2005; MALT *et al.*, 2013).

Devido a este fato, o sistema imune apresenta uma correlação muito importante, pois o entendimento do real motivo destes pacientes estarem afetados por infecções recorrentes, principalmente de ordem respiratória, aumentaria as possibilidades de entendimento do que a síndrome representa. Deste modo, sistema imune inato, sistema imune adaptativo, além de células e imunoglobulinas, devem ser investigados, afim de observar a causa de disfunções na porção de defesa do organismo.

Neste contexto o sistema purinérgico torna-se uma linha de pesquisa relevante, visto que existem dados na literatura que comprovam que o ATP extracelular e o seu produto final de degradação, a adenosina, são importantes moléculas com funções de modulação do sistema imune (BURNSTOCK, 2009). O ATP seria uma molécula com ações pró-inflamatórias, enquanto que a adenosina teria funções antiinflamatórias e de imunossupressão (BOURS *et al.*, 2006; ANTONIOLI *et al.*, 2012).

A partir da compreensão de como o sistema purinérgico afeta os portadores de SD, pela influência direta em suas funções imunes, seria possível afirmar ou não a existência de uma nova visão sobre o que é a síndrome, além de possíveis tratamentos. Desse modo, os portadores de SD seriam beneficiados com mais descobertas acerca da síndrome, que ainda não é explicada por completo, e então a expectativa de vida aumentasse ainda mais, assim como a qualidade de vida, mais valiosa ainda.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho é avaliar a atividade da Adenosina Deaminase em eritrócitos e linfócitos e os níveis de imunoglobulinas séricas de portadores com SD, comparando-os com os parâmetros de indivíduos saudáveis de idade compatível.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar alterações na atividade da enzima ADA em linfócitos e eritrócitos de portadores de SD e indivíduos saudáveis de idade compatível.
- Analisar parâmetros inflamatórios como níveis séricos de imunoglobulinas (IgA, IgE, IgM e IgG) e amostras de soro de portadores de SD e indivíduos saudáveis de idade compatível.
- Determinar as alterações na proteína C reativa em soro de portadores de SD e em indivíduos saudáveis de idade compatível.

3 Revisão de Literatura

3.1 Síndrome de Down

A Síndrome de Down (SD) é uma anomalia cromossômica causada devido à triplicação completa ou parcial do cromossomo 21. Segundo dados do Ministério da Saúde, a incidência de casos no Brasil é de 1 a cada 600 ou 800 nascimentos. A incidência não depende de gênero, raça ou classe social específica, sendo assim a alteração cromossômica (cromossopatia) mais comum em humanos e a principal causa de deficiência intelectual na população (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). Foi descrita pela primeira vez por John Langdon Down, em 1866 (MOREIRA *et al*, 2000).

A SD pode se dar a partir de uma trissomia simples, onde ocorre a presença de um cromossomo 21 extra, sendo o cariótipo 47, XX, + 21 ou 47, XY, + 21. Este tipo de trissomia está presente em cerca de 95% dos casos da composição cromossômica das pessoas com SD. Esta síndrome também pode ser caracterizada por uma translocação ou um mosaico, sendo que na translocação o cromossomo 21 adicional está fundido a um outro autossomo (mais comum entre os cromossomos 14 e 21) ocorrendo em torno de 4% dos casos, e também pode ser conhecida como SD de recorrência familiar. Já a SD caracterizada por um mosaico representa um grupo menor, no qual parte das células dos indivíduo são trissômicas e parte são normais, minimizando as características fenotípicas da síndrome no paciente (SILVA e DESSEN, 2002).

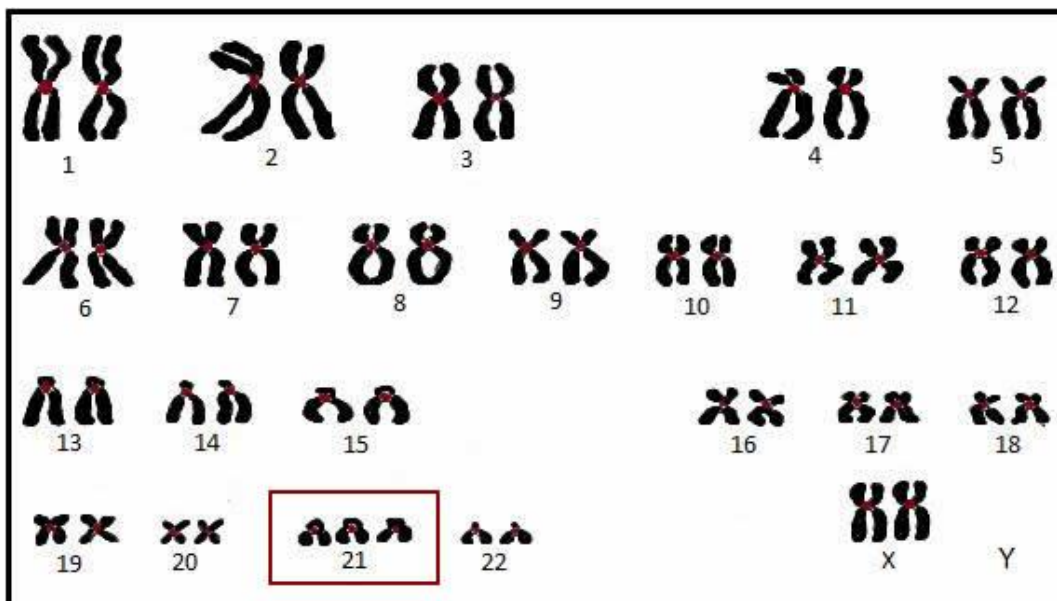


Figura 1. Cariótipo de um portador de Síndrome de Down (47,XX,+21), caracterizado pela presença de um cromossomo 21 extra (Adaptado de THOMPSON, 1993).

O cromossomo 21, o menor dos autossomos humanos, contém cerca de 255 genes, de acordo com dados recentes do Projeto Genoma Humano. A trissomia da banda cromossômica 21q22, referente à 1/3 desse cromossomo, tem sido relacionada às características da síndrome. Apesar do caráter gênico já bem estabelecido, as condições fenotípicas dos pacientes se dão também por fatores epigenéticos, como interações celulares, causas ambientais e fatores estocásticos que possam alterar de alguma forma os processos morfogenéticos. (MOREIRA *et al*, 2000).

Essas condições fenotípicas geram ao portador de Síndrome de Down características peculiares, que os tornam parecidos entre si. São elas: hipotonia observada em recém-nascidos, baixa estatura e braquicefalia, pescoço curto, com dobras de pele na nuca, ponte nasal plana, baixa implantação das orelhas, manchas de Brushfield nas margens da íris, língua protusa, mãos pequenas com prega simiesca e amplo espaço entre o primeiro e o segundo dedo dos pés (Figura 2) (WEIJERMAN *et al*, 2010). No que se refere ao desenvolvimento de habilidades motoras, as evidências revelam que estas crianças apresentam atraso de marcos motores básicos, e o desempenho cognitivo também está alterado, indicando que esses indivíduos apresentam atraso ou retardo mental, observando-se um maior comprometimento na área da linguagem (MANCINI *et al*, 2003).



Figura 2: Características fenotípicas de portadores da Síndrome de Down (Adaptado de Down site, acesso em nov de 2013).

Além destas características fenotípicas, a trissomia do cromossomo 21 tem sido relacionada a disfunções imunológicas, justamente porque os portadores apresentam uma maior frequência de infecções recorrentes, assim como de doenças autoimunes, como doença celíaca e tireoidite autoimune (NISHIHARA *et al*, 2005). Nota-se nesta alta taxa de morbidades imunológicas a maior frequência de infecções respiratórias, quando comparados com a indivíduos normais (RIBEIRO *et al*, 2003). Além destas patologias, alguns estudos vêm relacionando adultos com SD a sinais de envelhecimento precoce, o que poderia estar contribuindo para que o sistema imune destes indivíduos estivesse alterado.

Os recorrentes casos de infecções podem estar associados com defeitos nas células do sistema imune. Estes defeitos estão relacionados tanto com a imunidade mediada por células quanto pela imunidade mediada por anticorpos, e contribuem para a alta incidência de infecções em portadores de todas as idades. São comuns:

infecções no trato respiratório e gastrointestinal, como otite, pneumonia, e infecções por *influenza* (MALT *et al*, 2013). Além disso, taxas reduzidas de linfócitos foram encontradas em pacientes com a trissomia do 21, tanto linfócitos T como linfócitos B (KUSTERS *et al*, 2011).

3.2 Sistema Imunológico

O Sistema Imunológico, ou Sistema Imune, é um sistema complexo de estruturas e moléculas que possuem função de proteger o organismo contra patógenos, como microrganismos infecciosos. Esta defesa é mediada por barreiras externas e internas não específicas, presentes naturalmente no organismo, caracterizando a Imunidade Inata, e também por linfócitos e mecanismos desencadeados a partir deles, em resposta à infecção, caracterizando a Imunidade Adaptativa (BALESTIERI, F., 2005).

A imunidade inata é também chamada de imunidade natural ou nativa, e constitui a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos. Consiste em mecanismos de defesa celulares e bioquímicos que já estão presentes até mesmo antes da infecção, e estão prontos para responder rapidamente (ABBAS *et al*, 2008). São eles: epitélios e substâncias químicas antimicrobianas produzidas nas superfícies epiteliais; células fagocitárias (neutrófilos e macrófagos), células dendríticas, e células *Natural Killers* (NK); proteínas do sistema complemento, que quando ativado leva à lise do microrganismo; citocinas, que regulam e coordenam muitas das atividades das células da imunidade inata. Os mecanismos deste tipo de imunidade são inespecíficos, e muitas vezes o organismo exige que haja uma defesa mais poderosa contra patógenos que evoluíram para resistir à imunidade inata (Figura 3) (BALESTIERI, F.; ABBAS *et al*, 2008).

A imunidade adaptativa também pode ser chamada de imunidade específica ou adquirida, já que se dá na reação a partir do reconhecimento de substâncias microbianas e não microbianas pelo organismo. Além disso, possui a capacidade de distinguir microrganismos e moléculas diferentes ou até estreitamente relacionadas. As respostas imunológicas são adquiridas por experiência, ou seja, por exposições aos patógenos. Os principais componentes da resposta imune adaptativa são os

linfócitos e seus produtos secretados, como por exemplo anticorpos (Figura 3) (ABBAS *et al*, 2008).

Existem dois tipos de resposta imune adaptativa: a resposta imune celular, mediada por linfócitos do tipo T; e a resposta imune humoral, mediada por anticorpos, moléculas secretadas por linfócitos do tipo B. Essas duas respostas imunes são responsáveis por gerar especificidade e diversidade aos processos imunes, além de especialização e não reatividade com as células e tecidos do próprio organismo. Outra característica importante é a memória imunológica, que é gerada a partir da imunidade adaptativa, através das células de memória que o organismo forma a partir da exposição prévia ao patógeno (ABBAS *et al*, 2008).

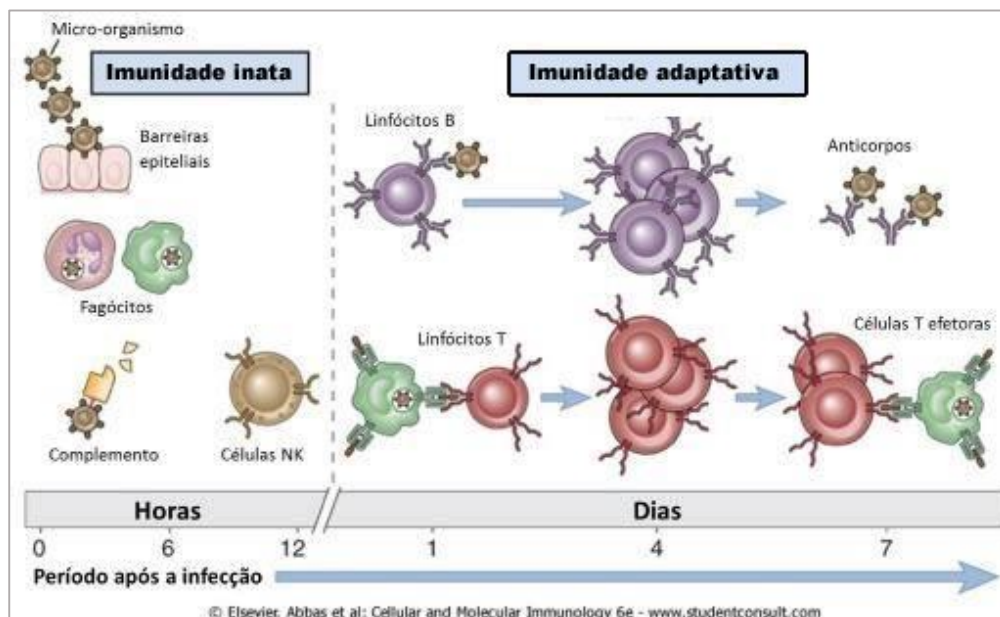


Figura 3: Diferenças entre mecanismos e células da imunidade do organismo, que é dividida em imunidade inata e imunidade adaptativa (Adaptado de Abbas, 2008).

Os linfócitos são células que reconhecem e respondem especificamente a antígenos estranhos, e, portanto, atuam como mediadores da imunidade celular e humoral. O progenitor linfóide comum (ou linfoblasto) na medula óssea dá origem aos linfócitos antígeno-específicos do sistema imune adaptativo, tanto linfócitos do tipo T como linfócitos do tipo B. Na ausência de uma infecção, a maioria dos linfócitos circulantes no organismo são pequenas células sem sinais distintos, com poucas

organelas citoplasmáticas e grande parte da sua cromatina inativa. Elas não apresentam atividade funcional até que reconheçam algum antígeno, sendo conhecidos como linfócitos *naive*. Uma vez encontrado um antígeno, esses linfócitos tornam-se ativos e funcionais, e assim são denominados linfócitos efetores (ABBAS *et al*, 2008).

Existem subpopulações de linfócitos, que diferem em sua maneira de reconhecer antígenos e nas suas funções. Os linfócitos B são as únicas células capazes de produzir anticorpos, sendo essas moléculas conhecidas como Imunoglobulinas (Ig). Estas células, quando ativadas, sofrem transformação a plasmócitos, que tem a capacidade de secretar essas imunoglobulinas (ABBAS *et al*, 2008). Todas as moléculas de imunoglobulinas, ou anticorpos, compartilham as mesmas características estruturais básicas, mas apresentam enorme variabilidade na região de ligação aos antígenos, e por isso podem ser classificadas em diferentes isótipos (BALESTIERI, F., 2005). Cada isótipo apresenta características diferenciadas, principalmente quanto à função, e estão representadas conforme a tabela 1.

Tabela 1: Diferenças entre as principais imunoglobulinas, também conhecidas como anticorpos.

Isótipo	Estrutura Secretada	Função
IgM	Pentâmero	“Anticorpos precoces”, produzidos durante fases agudas iniciais de patologias
IgA	Monômero, dímero e trímero	Imunidade de mucosa, protegendo o organismo contra invasão viral ou bacteriana neste local
IgG	Monômero	Respostas imunes secundárias, como citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos
IgE	Monômero	Imunidade contra parasitas helmintos, encontrada também em doenças alérgicas

Os linfócitos T reconhecem antígenos de microrganismos intracelulares através de receptores de antígenos de células T (TCR), que reconhecem peptídeos derivados de proteínas estranhas que estejam ligadas a proteínas do hospedeiro denominadas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Após essa ativação, os linfócitos se diferem em linfócitos T auxiliar (*helper*), linfócito T citotóxico e linfócito T regulador (ABBAS *et al*, 2008).

Os linfócitos T auxiliares secretam proteínas, denominadas citocinas, que são responsáveis por muitas das respostas celulares, atuando como moléculas mensageiras do sistema imune. As citocinas secretadas pelos linfócitos T auxiliares estimulam a proliferação e a diferenciação das próprias células T e ativam outras células, como células B, macrófagos e outros leucócitos. Os linfócitos T citotóxicos destroem as células que exibem antígenos estranhos, como células infectadas por vírus e outros microrganismos intracelulares. Os linfócitos T reguladores atuam principalmente na supressão da resposta imunológica (ABBAS *et al*, 2008).

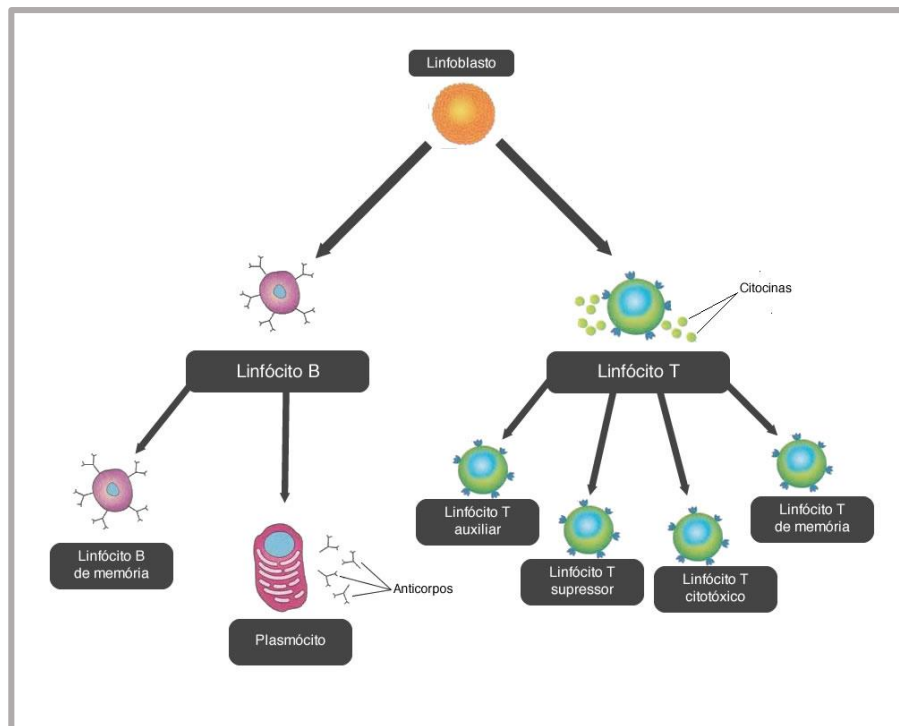


Figura 4: Células imunes diferenciadas a partir de linfócitos do tipo B e linfócitos do tipo T (Adaptado de Look for diagnostics, acesso em nov 2013).

Enquanto linfócitos do tipo B têm o seu desenvolvimento completo no mesmo lugar onde são formados, na medula óssea, os linfócitos do tipo T precisam migrar até o timo para que se desenvolvam e proliferem, de modo a se tornarem aptos a reconhecerem antígenos (Figura 4) (KUSTERS *et al*, 2011).

3.3 Alterações Imunológicas Relacionadas à Síndrome de Down

Grande parte das infecções relacionadas à SD ocorrem no trato respiratório, sugerindo que anormalidades na imunidade celular e humoral estariam diretamente relacionadas com esta condição (WEIJERMAN *et al*, 2010). Quando avaliados os linfócitos T de jovens pacientes portadores de SD, algumas anormalidades podem ser notadas. Podem-se visualizar alterações na anatomia do timo destes pacientes, sendo o seu tamanho diminuído em relação ao de indivíduos saudáveis, o que contribui para redução da percentagem de linfócitos T com receptor TCR apto ao reconhecimento de antígenos. Ou seja, há uma relativa redução no percentual de linfócitos T *naive* (RAM e CHINEN, 2011). A população de linfócitos T, tanto citotóxicos como auxiliares, é diminuída desde o nascimento dos portadores de SD e também há diminuição na proliferação destas células. A expansão natural de linfócitos T durante a infância não é observada nestes pacientes (KUSTERS *et al*, 2011).

Alterações podem ser notadas também quando comparados os níveis de linfócitos B em portadores de SD. Ao invés de apresentarem um aumento de linfócitos B de memória e uma diminuição na produção de linfócitos B *naive* ao longo da vida, esses indivíduos mostram uma diminuição dos linfócitos B *naive* já no começo da vida, e os níveis de linfócito B de memória não aumentam durante a vida. Em resultado a isso, a contagem total de linfócitos B se torna diminuída (KUSTERS *et al*, 2009).

Da mesma forma, foram descritas alterações nos níveis séricos de imunoglobulinas de indivíduos portadores de SD em relação a uma população saudável. Alguns pacientes com SD apresentam níveis elevados de imunoglobulinas, um quadro chamado de hipergamaglobulinemia, onde a partir da infância há um aumento nos níveis destas moléculas. Este aumento é verificado principalmente em relação à IgG, sendo que alterações também podem ser observadas nos níveis de

outras imunoglobulinas, como por exemplo de IgM. A partir dos seis anos de idade, alguns pacientes com SD também podem apresentar elevação nos níveis de IgA (KUSTERS *et al*, 2011; RIBEIRO *et al*, 2003).

3.4 Sistema Purinérgico

A molécula de ATP (adenosina trifosfato) é um nucleotídeo de adenina que tem papel de “moeda energética” já bem estabelecido. Quando no meio intracelular, o ATP é a principal molécula transportadora de energia para as células, sendo metabolizado na organela mitocôndria. A partir de reações de hidrólise, sempre é liberado um grupamento fosfato terminal, que dá a característica de doador de energia para o ATP (NELSON e COX, 2010; MARZZOCO e TORRES, 2007).

É possível afirmar que o ATP não está só presente no meio intracelular, mas também é liberado no espaço extracelular em resposta a distúrbios metabólicos ou outros tipo de insultos (ANTONIOLI *et al*, 2013). Deste modo, ele poderia estar envolvido em eventos a curto-prazo, como neurotransmissão e neuromodulação, até eventos a longo-prazo, como proliferação, diferenciação e morte celular, regeneração e envelhecimento (BURNSTOCK, 2009).

O ATP extracelular pode atuar como um mediador durante as complexas respostas inflamatórias do organismo, e sua concentração e o tempo de permanência na porção extracelular são influenciados diretamente pela atividade de hidrólise desse nucleotídeo e seus produtos realizada por ectoenzimas (VITIELLO *et al*, 2012). A enzima CD39 (também conhecida como ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase, ou E-NTPDase1) converte o ATP e o ADP extracelular em AMP, que por sua vez é hidrolisado pela enzima CD73 (ecto-5'-nucleotidase) gerando adenosina. Esta adenosina é degradada pela enzima adenosina deaminase (ADA), levando à formação de Inosina (Figura 5) (ANTONIOLI *et al*, 2012; 2013).

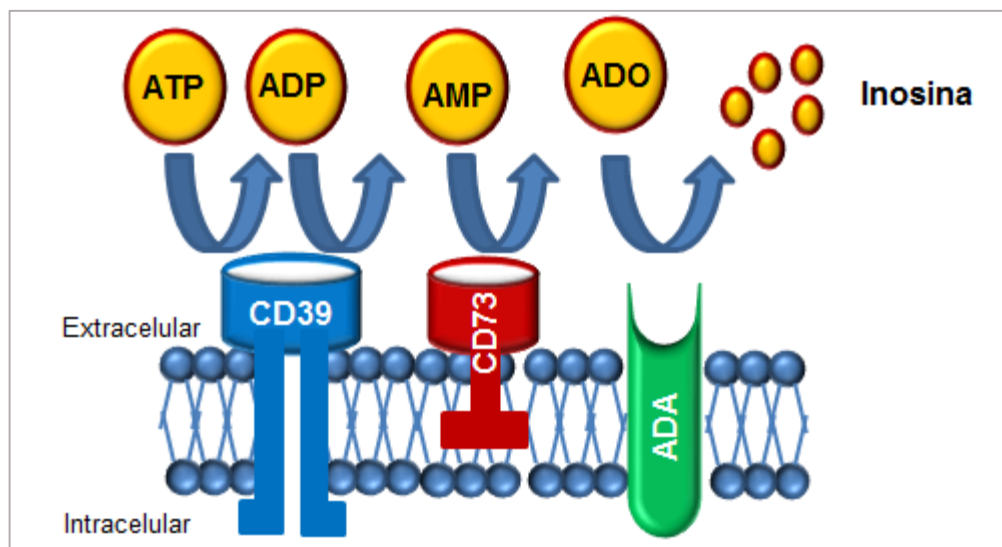


Figura 5. Enzimas envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos e nucleosídeo de adenina até a geração de inosina (Adaptado de ZHANG, 2010).

Os nucleotídeos de adenina e a adenosina se ligam a receptores presentes em diferentes tipos de células, desse modo exercendo ações moduladoras em diversos processos do organismo, como por exemplo, a inflamação. Os receptores P1 e P2, como são chamados os receptores que fazem parte da sinalização purinérgica, são expressos na superfície de células imunes e são ativados respectivamente pela adenosina e pelo ATP, mediando os efeitos imunomoduladores (KUMAR e SHARMA, 2009; ANTONIOLI *et al*, 2013).

Existem quatro receptores do tipo P1 ligados à proteína G conhecidos como receptores de Adenosina, e são nomeados A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃. Já os receptores do tipo P2 são classificados em duas sub-famílias, os receptores ionotrópicos P2X, que são numerados de 1 a 7, e os receptores metabotrópicos P2Y (P2Y_{1,2,4,6,11-14}) (ANTONIOLI *et al*, 2013). A ação das moléculas que participam da sinalização purinérgica é determinada pelo tipo de receptor em que elas se ligam.

3.5 Papel da adenosina na resposta imune

Nas últimas décadas vários estudos têm demonstrado que os nucleotídeos de adenina ATP e ADP e seu nucleosídeo correspondente adenosina, são importantes moléculas sinalizadoras em vários tecidos. O ATP e a adenosina regulam processos

relacionados à resposta imune e inflamatória (BOURS *et al*, 2006), sendo o sistema purinérgico um sistema evolutivamente selecionado com função de aperfeiçoar o funcionamento das células imunes, em interações célula-célula e secreção de citocinas (ANTONIOLI *et al*, 2012; HASKÓ *et al*, 2004).

O ATP é uma molécula que possui funções pró-inflamatórias como a estimulação e a proliferação de linfócitos, sendo essencial para a liberação de citocinas como a interleucina 2 (IL-2) e o interferon γ (IFN- γ) (BOURS *et al*, 2006). A maior fonte de ATP extracelular é proveniente de dano celular, e ele pode ser liberado de vários tipos celulares em resposta a mecanismos de morte ou hipóxia, além de estar relacionada com patologias de ordem imunológica, como doenças inflamatórias de intestino e pulmão e também isquemia (BURNSTOCK, 2008; ELTZSCHIG *et al*, 2012).

O papel da molécula de ATP nas respostas imunes e inflamatórias está estreitamente relacionado com um dos seus produtos de degradação, o nucleosídeo adenosina. A adenosina possui funções imunes já bem estabelecidas, com potentes atividades antiinflamatórias e imunossupressoras por inibir a proliferação de células T através da ativação de receptores A_{2A} e a liberação de citocinas pró-inflamatórias (GESSI *et al.*, 2007), podendo contribuir em processos inflamatórios e respostas imunes fornecendo um tipo de feedback ao ATP (BOURS *et al*, 2006). A concentração de adenosina sofre um aumento rápido em ambientes teciduais durante alterações metabólicas adversas, além de atuar como freio natural das funções de células do sistema imune, limitando assim as respostas inflamatórias e mantendo a integridade tecidual (ANTONIOLI *et al*, 2012).

Estudos recentes, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, demonstram o papel da molécula de adenosina como modulador imune. Em primeiro lugar, a adenosina é liberada na periferia das células imunes em tecidos submetidos a diversas formas de estímulos lesivos, como por exemplo isquemia e inflamação. Em segundo lugar, a adenosina se mostra imunossupressora na maioria das vezes, observando-se a sua ação em receptores de vários tipos de células do sistema imune. E então, finalmente, a remoção da adenosina do meio agrava a ativação do sistema imune, e consequentemente agrava a disfunção do tecido que sofreu os estímulos nocivos (HASKÓ *et al*, 2004).

A adenosina possui papéis nos diferentes tipos de imunidade,. A ação da adenosina no sistema imune inato, por exemplo, é determinada pela sua biodisponibilidade e a expressão de seus receptores em células que são características do sistema imune inato. Já foram descritas interações entre este nucleosídeo de adenina e macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e células NK, sendo os receptores ativados de todos os subtipos (A1, A2A, A2B, A3). A ligação de adenosina em receptores A2A de neutrófilos, por exemplo, diminui a atividade de geração de danos aos tecidos. Também foi demonstrado que a adenosina extracelular pode estimular seus receptores em macrófagos, desfavorecendo a diferenciação de monócitos em macrófagos, além de suprimir a capacidade fagocitária destas células (KUMAR e SHARMA, 2009).

A adenosina também pode interferir em outras células presentes em processos inflamatórios, integrando sistema imune inato e adaptativo. Alguns estudos já descreveram a adenosina como moduladora da cascata enzimática do sistema purinérgico em linfócitos, influenciando na hidrólise de ATP até a geração de adenosina. A ativação de receptores TCR, expressos em linfócitos T regulatórios, pode induzir a hidrólise de ATP e ADP e também de AMP, gerando a adenosina. Este nucleosídeo então teria papel chave em funções imunossupressoras e antiinflamatórias destes tipos celulares, pois estaria ligando-se a receptores A2A de linfócitos T citotóxicos, bloqueando suas ações imunes no organismo. Além disso, a adenosina também estimularia receptores A2A nos próprios linfócitos T regulatórios, o que aumentaria a sua expansão ao longo do sistema imune e favoreceria a atividade imunoregulatória destes tipos celulares (Figura 6) (ANTONIOLLI *et al*, 2013).

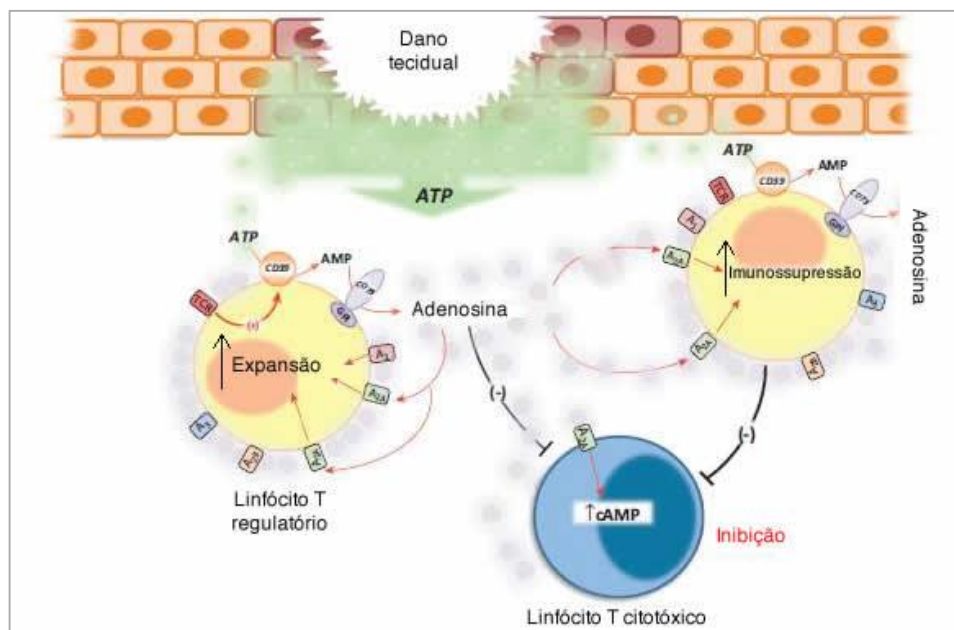


Figura 6: Cascata de hidrólise de ATP extracelular até adenosina extracelular e suas funções como moduladora do sistema imune (adaptado de ANTONIOLLI, 2013).

3.6 Adenosina deaminase

A enzima adenosina deaminase (ADA) é considerada como uma enzima chave no metabolismo das purinas, catalisando a desaminação irreversível da adenosina e desoxiadenosina em inosina e desoxiinosina, respectivamente sendo a principal enzima responsável por controlar os níveis extracelulares de adenosina (BOURS *et al.* 2006). A ADA se localiza na superfície celular, e por isso também é conhecida como ectoADA (FRANCO, *et al.*; 1997), e pode ser encontrada em todos os tecidos do organismo, porém está em maiores concentrações no sistema imune, como por exemplo no timo (CRISTALLI *et al.*, 2001). A estrutura tridimensional da enzima ADA já foi demonstrada, onde nota-se a sua característica de metaloenzima, contendo um átomo de zinco (Zn) para a sua atividade catalítica. (Figura 7) (CRISTALLI *et al.*, 2001).

O mecanismo enzimático depende diretamente do átomo de Zn, e é caracterizado pela adição de um grupo hidroxil na posição C6 da molécula de adenosina, formando uma molécula tetraédrica intermediária, e após é liberado um grupamento amônia para a formação final de inosina (CRISTALLI *et al.*, 2001; FRANCO *et al.*, 1998).

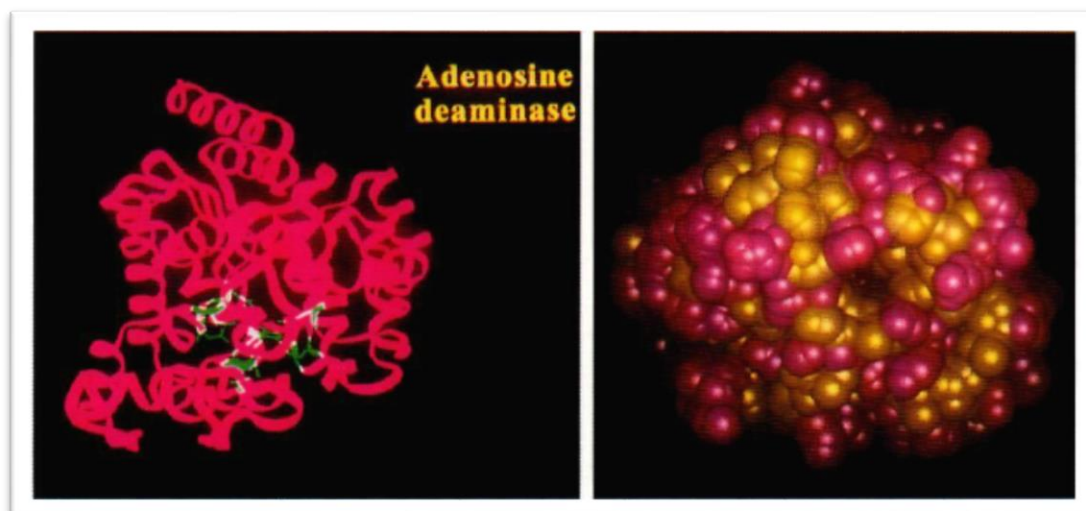


Figura 7: Representação em 3D da enzima ADA (adaptado de FRANCO, 1997).

Juntamente com a enzima ADA existem moléculas presentes na superfície celular que facilitam a sua ligação com a membrana celular. A primeira molécula a ser identificada é a proteína CD26, também conhecida como dipeptidil peptidase IV, ou proteína ligante de ADA. O real papel desta associação entre proteínas ainda não é totalmente descrito pela literatura, embora a função de enzima proteolítica da CD26 já seja conhecida como um marcador de ativação de linfócitos T. Outra molécula de importância para a ligação da enzima ADA na membrana celular é o receptor de adenosina, dos tipos A1 e A2B. Por mais que a ligação entre uma ectoenzima hidrolítica e o receptor ligante do substrato desta enzima seja improvável, estudos funcionais observam que ela existe e inclusive é necessária para uma ligação efetiva entre o receptor e a proteína G, propondo um papel chave para o controle da transdução do sinal proveniente do receptor (CRISTALLI *et al*, 2001; FRANCO *et al*, 1996, 1998; ANTONIOLLI *et al*, 2012).

Os níveis normais da atividade da ADA em linfócitos se mostram relevantes ao fato de que a deficiência genética desta enzima em humanos está associada a uma forma de Imunodeficiência Combinada Grave (SCID), doença mais comum em crianças, onde o acúmulo do substrato da ADA, a adenosina, pode levar a uma toxicidade aos linfócitos do paciente (CRISTALLI *et al*, 2001). Vários estudos têm demonstrado que a atividade desta enzima encontra-se alterada também em outras condições patológicas no qual o sistema imune está envolvido como, por exemplo, na esclerose

múltipla (SPANVELLO *et al*, 2010) e na síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (LEAL *et al*, 2005). Isso sugere que a atividade dessa enzima em linfócitos e eritrócitos pode ser considerada um bom indicador de distúrbios imunológicos, e o envolvimento do sistema purinérgico com a síndrome deve ser estudado e compreendido.

4 Metodologia

4.1 População e amostragem

A população deste estudo foi composta por 10 portadores de SD e 10 indivíduos saudáveis adultos como grupo controle de ambos os sexos provenientes da cidade de Pelotas. O grupo SD foi composto por 07 mulheres e 03 homens (média de idade de 26,3 anos) enquanto que o grupo controle foi composto 06 mulheres e 04 homens (média de idade de 23,6 anos). Todos os protocolos realizados nesse estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pelotas. Todos os participantes dessa pesquisa e/ou seus responsáveis receberam informações a respeito dos riscos e objetivos da pesquisa conforme especificado na resolução N^o 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde. A coleta de sangue só foi realizada após a assinatura do termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelo indivíduo (no caso do grupo controle) ou pelo responsável familiar (no caso dos portadores de SD).

4.2 Coleta do material biológico

As amostras de sangue (10 - 12 mL) foram coletadas dos portadores de SD e dos indivíduos controle por punção venosa em tubos *vacutainer* com ou sem anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetracético).

4.3 Separação de linfócitos

Os linfócitos foram isolados a partir de sangue periférico coletado em anticoagulante EDTA e separados sob um gradiente de densidade com Ficoll-Hypaque[®] como descrito por Böyum e colaboradores (1968). Este método se baseia na separação de substâncias com diferente massa atômica ou molecular, baseando-se na sua densidade ao ser aplicada uma força centrífuga. Durante a centrifugação, os compostos sanguíneos, inicialmente por cima da solução de Ficoll, migram de acordo com a sua densidade e velocidade de sedimentação. Assim, as células

mononucleares do sangue por possuírem menor densidade, mantêm-se numa zona mais superior do tubo, em suspensão, enquanto outros componentes, como os eritrócitos e granulócitos, agregados devido à presença do polissacarídeo de Ficoll e, logo, mais densos, se depositam no fundo deste. A dosagem de proteína foi realizada segundo método de Bradford (1976).

4.4 Separação de eritrócitos

O sangue foi coletado em tubos com EDTA como anticoagulante. Esse sangue foi centrifugado por 10 minutos a 1000g e posteriormente o plasma removido. O *pellet* de eritrócitos foi lavado com solução salina três vezes, sendo que em cada lavagem o sistema eritrócito - salina foi centrifugado a 1000g por 10 minutos. Os eritrócitos obtidos foram usados para determinar a atividade ADA. A dosagem de proteína foi realizada segundo método de Bradford (1976).

4.5 Determinação da atividade da ADA em linfócitos e eritrócitos

A atividade da ADA em soro foi determinada de acordo com o método descrito por Giusti & Gallanti (1984). Este método baseia-se na produção direta de amônia liberada pela transformação da adenosina em inosina, catalisada pela enzima. A amônia forma, na presença de fenol adicionado na incubação, em solução alcalina, um derivado de indofenol com intensa coloração azul. Esta reação é catalisada pelo nitroprussiato de sódio e então pode ser quantificada por espectrofotometria (NEVES *et al.*, 2004).

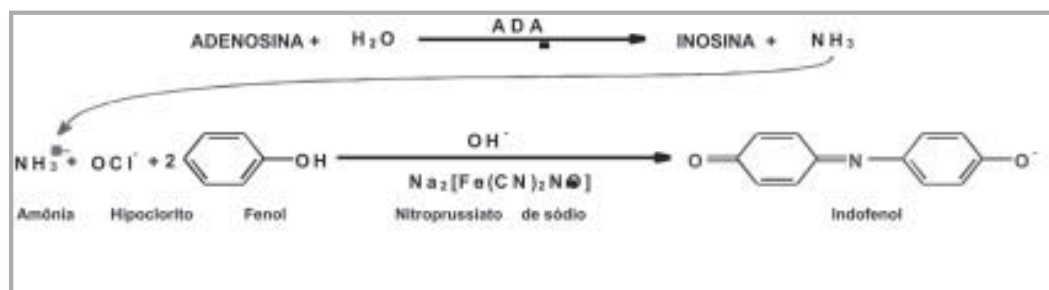


Figura 8: Representação da reação de hidrólise da adenosina feita pela enzima ADA, e produção de indofenol, na presença de hipoclorito, fenol e nitroprussiato de sódio (adaptado de NEVES, 2004).

Os resultados foram expressos em unidades por litro (U/L). Uma unidade (1U) da ADA é definida como a soma de enzima requerida para liberar 1 mol de amônia por minuto de adenosina nas condições padrão do ensaio.

4.6 Imunoglobulinas

As análises das imunoglobulinas IgA, IgG e IgM foram realizadas de acordo com a metodologia de turbidimetria, que se baseia na detecção ótica de partículas muito pequenas suspensas em líquido. Quando o anticorpo específico para estas imunoglobulinas reagem com as mesmas presentes na amostra, formam-se os imunocomplexos insolúveis que induzem uma turbidez, medida por espectrofotometria, que é diretamente proporcional à concentração de imunoglobulinas na amostra (HIRONAKA e CASANOVA, 2003).

Já a imunoglobulina IgE foi dosada como método de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) não competitivo, onde as imunoglobulinas específicas são marcadas em uma placa através da ligação antígeno/imunoglobulina e imunofluorescência (LEQUIN, 2005).

4.7 Proteína C Reativa

A proteína C reativa em soro foi determinada usando um kit comercial PRC da Ebram Produtos Laboratoriais Ltda. ®, com metodologia de Turbidimetria e através do aparelho Flexor EL 200 (ELITechGroup vital scientific ®).

4.8 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo teste t de *Student* para amostras independentes. $P < 0,05$ foi considerado para representar a diferença estatística entre os grupos. Todos os dados estão expressos como média \pm erro padrão.

5 Resultados

Em relação à atividade da adenosina deaminase foi observado um aumento significativo na atividade dessa enzima tanto em linfócitos quanto em eritrócitos de portadores de SD quando comparado ao grupo controle ($P < 0.05$) (Figura 10 e 11).

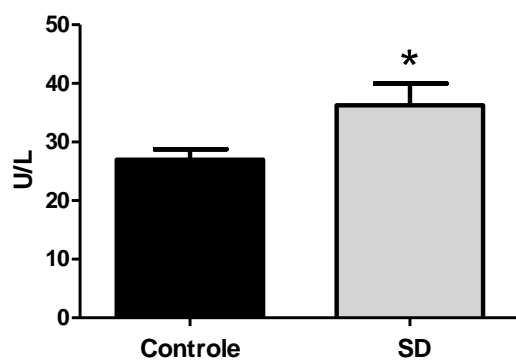


Figura 10: Atividade da enzima adenosina deaminase em linfócitos de portadores de Síndrome de Down (SD) e indivíduos controle. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão (n=10 $P < 0,05$).

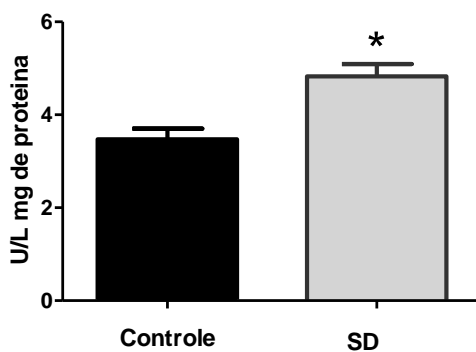


Figura11: Atividade da enzima adenosina deaminase em eritrócitos de portadores de Síndrome de Down (SD) e indivíduos controle. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão (n=10 $P < 0,05$).

Os resultados obtidos em relação aos níveis de proteína C reativa no soro são apresentados na Figura 9. Como pode ser observado não houve diferença significativa nos níveis dessa proteína entre o grupo SD e o grupo controle.

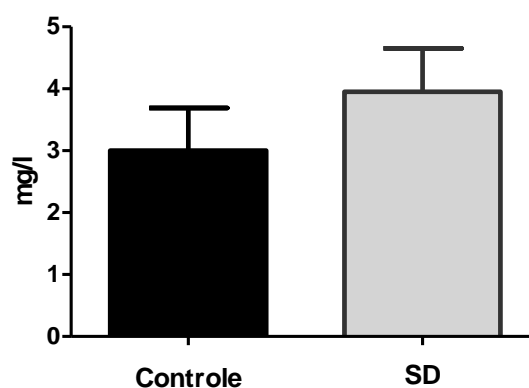


Figura 9: Níveis de proteína C reativa em soro de portadores de Síndrome de Down (SD) e indivíduos controle. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão (n=10 cada grupo, $P = 0,355$).

Entretanto, os resultados desse trabalho demonstraram alterações nos níveis de imunoglobulinas séricas em portadores de SD. Na tabela abaixo pode-se observar que ocorreu um aumento nos níveis de IgA e IgG em soro de portadores de SD em relação ao grupo controle ($P < 0,05$). Nenhuma alteração significativa foi observada nos níveis de IgE e IgM (Tabela 2).

Tabela 2: Níveis de imunoglobulinas séricas em soro de portadores de Síndrome de Down (SD) e indivíduos controle. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão (n=10 para cada grupo, $P < 0,05$).

Imunoglobulinas	Controle	SD	Valores de referência
IgA	261.80 \pm 22.20	429.62 \pm 33.80*	40 a 350 mg/dl
IgE	35.42 \pm 10.73	24.02 \pm 7.00	< 160,0 UI/ml
IgG	1172.36 \pm 36.44	1382.36 \pm 71.44*	700 a 1600 mg/dl
IgM	105.91 \pm 31.25	91.89 \pm 13.51	50 a 300 mg/dl

6 Discussão

Devido a combinação de uma maior inserção na sociedade e ao acesso precoce e contínuo a intervenções clínicas houve melhorias na vida dos pacientes. Como resultado destas mudanças, a perspectiva de vida para pessoas com a SD aumentou, com 85% dos nascidos antes de 1980 vivendo até os 10 anos de idade para uma média de 60 anos de idade em pacientes nascidos atualmente, segundo dados coletados nos Estados Unidos. Este aumento pode ser atribuído ao melhor entendimento do que é a síndrome e do que ela representa, suas limitações e sua descaracterização de patologia por alguns autores, sendo apenas um conjunto de sinais e sintomas que, quando o paciente recebe atendimento adequado e estímulo, tem potencial para uma vida saudável e plena inclusão social (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Porém, infecções de repetição ou infecções recorrentes, como pneumonias, otites, amigdalites, rinofaringites e sinusites, ainda são relatadas com frequência em pacientes com SD (RIBEIRO *et al*, 2003). Sendo assim, trabalhos que possibilitem ao menos entender o porquê da imodeficiência da SD são de suma valia para que a qualidade de vida da população afetada pela síndrome seja ainda melhor.

A enzima ADA tem sido avaliada como um possível alvo terapêutico em muitas doenças, as quais o sistema imune está afetado (KUMAR *et al*, 2009). Isso porque essa enzima catalisa a deaminação de adenosina a inosina regulando as concentrações desse nucleosídeo no meio extracelular e interferindo assim na modulação das respostas imunes e inflamatórias. No presente trabalho foi demonstrado que a atividade da enzima ADA encontra-se aumentada em linfócitos de portadores de SD. Corroborando com este estudo está o trabalho também realizado pelo nosso grupo de pesquisa, onde visualiza-se um aumento na atividade da ADA quanto utilizadas amostras de soro de pacientes com SD (RODRIGUES, 2013). Outros estudos seguindo a mesma linha, porém na década de 80, também demonstraram alterações na atividade da ADA em células do sistema imune de portadores de SD ratificando a importância do Sistema Purinérgico e da Adenosina nessa alteração genética patologia (PUUKKA *et al*; 1981; 1982; 1986).

Este aumento na atividade da enzima ADA pode ter um importante papel nas respostas imunes alteradas em portadores de SD, já que a adenosina é um nucleosídeo que regula a função de muitas células imunes através de seus receptores localizados na superfície celular (ANTONIOLLI *et al*, 2013). A adenosina tem potentes atividades anti-inflamatórias e imunossupressoras por inibir a proliferação de células T através da ativação de receptores A_{2A} e a liberação de citocinas pró-inflamatórias (BOURS *et al*, 2006). Além disso, alguns estudos têm demonstrado que a adenosina liberada ou produzida por linfócitos B é capaz de levar a um acúmulo de AMP cíclico através da ativação dos receptores A_{2A} diminuindo a produção de imunoglobulinas (SAKOWICK-BURKIEWICZ *et al*, 2012). Neste contexto, um aumento na atividade da ADA poderia levar a uma diminuição nos níveis de adenosina extracelular contribuindo assim para um quadro pró-inflamatório na SD. Além disso, essa diminuição nos níveis de adenosina poderia estar relacionado com o aumento nos níveis de algumas imunoglobulinas observadas nesses portadores.

Pouco ainda é conhecido sobre o papel da adenosina na fisiologia do eritrócito, entretanto um dos principais papéis em relação à ação da adenosina nos eritrócitos é a sua regulação na produção do 2,3 bifosfoglicerato (2,3 - BPG), um composto que induz a liberação de O_2 da hemoglobina (ZHANG *et al*, 2012). Neste contexto, nosso trabalho demonstrou um aumento na atividade da ADA nos eritrócitos sugerindo que esse efeito poderia levar a uma diminuição nos níveis de adenosina e assim alterar alguns parâmetros relacionados ao transporte de oxigênio em portadores de SD. Entretanto cabe salientar que a alteração na atividade dessa enzima pode ser explicada por algumas alterações nos eritrócitos encontradas em portadores de SD com a macrocitose (WACHTEL *et al*, 1991) e alterações na membrana do eritrócitos (KANTAR *et al*, 1992).

De acordo também com as condições pró-inflamatórias visualizadas na SD estão os resultados obtidos das análises de imunoglobulinas, onde IgA e IgG se encontram aumentadas. Isso poderia estar relacionado também com a hipergamaglobulinemia visualizada na SD por outros autores (KUSTERS *et al*, 2011; RIBEIRO *et al*, 2003). O aumento da atividade da ADA poderia estar relacionado com esta condição, já que a diminuição da adenosina extracelular aumentaria os níveis di

imunoglobulinas. Sendo que as imunoglobulinas IgA e IgG apresentam funções na fase crônica de infecções, a razão do aumento destas se torna visível, pois os casos visualizados em pacientes com SD são de infecções recorrentes, e não apenas fases agudas.

No presente trabalho não foram encontradas diferenças nos níveis de proteína C reativa (PCR) em soro de portadores de SD quando comparado com indivíduos saudáveis, o que reforça a hipótese de cronicidade da infecção, já que a PCR é um marcador de fase aguda que se eleva em processos inflamatórios e infecciosos (SILVA *et al*, 2012). É uma proteína sintetizada pelo fígado e é considerada um marcador de inflamação, pois em indivíduos saudáveis encontra-se em concentrações muito baixas, sendo que na presença de infecções apresenta-se aumentada. Diferentemente dos resultados desse estudo, Corsi *et al.*, (2005) demonstrou um aumento na PCR em portadores de SD adultos.

A enzima ADA é responsável pela manutenção da concentração e tempo de permanência do nucleosídeo adenosina no meio extracelular. O aumento dessa enzima, visualizado em amostras de linfócitos e eritrócitos de pacientes com SD em relação a indivíduos saudáveis pode estar relacionado com a diminuição de adenosina extracelular nestes pacientes. Isso poderia indicar um aumento do caráter pró-inflamatório, uma vez que a adenosina é descrita pela literatura como molécula anti-inflamatória (BOURS *et al*, 2006).

A atividade da enzima ADA alterada vem de encontro com o aumento de infecções recorrentes em pacientes portadores de SD, principalmente infecções respiratórias. Essas condições inflamatórias exacerbadas contribuem para a diminuição na qualidade de vida destes pacientes, o que torna este um estudo muito importante para a avaliação de como o sistema purinérgico consegue modular as condições patológicas visualizadas nesta condição genética.

6 Conclusão

Considerando os resultados obtidos neste trabalho, pode-se propor que o sistema purinérgico é capaz de explicar, pelo menos em parte, as condições inflamatórias aumentadas e as recorrentes infecções dos pacientes com SD. Porém, é necessário realizar mais estudos utilizando estes e outros parâmetros inflamatórios para que se possa fazer uma ligação direta entre a sinalização induzida por nucleotídeos e nucleosídeo de adenina e a SD, e para que estas descobertas sejam utilizadas como novas estratégias terapêuticas de modo a otimizar ainda mais o tratamento e a qualidade de vida dos pacientes com SD.

Referências

ABBAS, A. K. e LITCHMAN, A.H. **Imunologia Básica**- Funções e Distúrbios do Sistema Imunológico. Brasil: Elsevier, 2007. 354 pg.

ANTONIOLI, L.; COLUCCI, R.; LA MOTTA, C.; TUCCORI, M.; AWWAD, O.; DA SETTIMO, F.; BLANDIZZI, C.; FORNAI, M. Adenosine deaminase in the modulation of immune system and its potential as a novel target for treatment of inflammatory disorders. **Current Drug Targets**. n.13, p.842-62, 2012.

ANTONIOLI, L.; PACHER, P.; VIZI, E.S.; HASKÓ, G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. **TREND in Molecular Medicine**. n.6, v.19, p.355-67, 2013.

BALESTIERI, F.M.P. **Imunologia**. Manole, 2005. 840pg.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. **Analytical Biochemistry**. n. 72, p.248-54, 1976.

BOURS, M.; SWENNEN, E.; DI VIRGILIO, F.; CRONSTEIN, B.; DAGNELIE, P.. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**. n.112, p.358-404, 2006.

BøYUM, A.; LOVHAUG, D.; TRESLAND, L.; NORDLIE, E.M. Separation of leucocytes: improved cell purity by fine adjustments of gradient medium density and osmolality Scand. **Journal of Immunology**. n.34, p.697-712, 1983.

BURNSTOCK, G. Purinergic signaling and disorders of the central nervous system. **Nature Reviews/Drug Discovery**. v.7, p.575-90, 2008.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: past, present and future. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. n.42, p.3-8, 2009.

CORSI, M.; MALAVAZOS, A.; PASSONI, D.; LICASTRO, F. LDL receptor expression on T lymphocyte in old patients with Down Syndrome. **Immunity and Aging**. n.2, p.1-5, 2005.

CRISTALLI, G.; COSTANZI, S.; LAMBERTUCCI, C.; LUPIDI, G.; VITTORI, S.; VOLPINI, R.; CAMAIONI, E. Adenosine Deaminase: functional implications and different classes of inhibitors. **John Wiley & Sons, Inc.** p.105-28, 2001.

ELTZSCHIG, H. K.; SITKOVSKY, M.V.; ROBSON, S.C. Purinergic signaling during inflammation. **New England Journal of Medicine**. n.367, v.24, p.2322-33, 2012.

FRANCO, R.; CASADÓ, V.; CIRUELA, F.; SAURA, C.; MALLOL, J.; CANELA, E. I.; LLUIS, C. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. **Progress in Neurobiology**. v.52, p.283-94, 1997.

FRANCO, R.; VALENZUELA, A.; LLUIZ, C.; BLANCO, J. Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. **Immunological Reviews**. v.161, p.27-42, 1998.

GENDRON, F.P.; BENREZZAK, O.; KRUGH, B.W.; KONG, Q.; WEISMAN, G.A.; BEAUDOIN, A.R. Purine signaling and potential new therapeutic approach: possible outcomes of NTPDase inhibition. **Current Drug Targets**. n.3, p.229-45, 2002.

GESSI, S.; VARINI, K.; MERIGHI, S.; FOGLI, E.; SACCHETTO, V.; BENINI, A.; LEUNG, E.; MAC-LENNAN, S.; BOREA, P. Adenosine and lymphocyte regulation. **Purinergic Signalling**. n.3, p.109-16, 2007.

GODOY, L.M.Q. Down Site. Disponível em: <<http://yaslei07.wix.com/down#!fenotipo>>. Acesso em 17 novembro 2013.

HASKÓ, G.; CRONSTEIN, B.N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. **TRENDS in Immunology**. n.1, v.25, p.33-38, 2004.

HIRONAKA, H.C.; CASANOVA, L.D. Concentrações séricas de imunoglobulinas em sangue do funículo umbilical e em sangue materno no momento do parto. **Acta Cirúrgica Brasileira**. n.2, v.18, p.156-66, 2003.

KANTAR, A.; GEORGI, P.; CURATOBA, G.; FIORINI, R. Alterations in erythrocyte membrane fluidity in children with trisomy 21: a fluorescence study. **Biology of the cell**. n.75, p.135-38, 1992.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Adenosine: An endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. **European Journal of Pharmacology**. n.616, p.7-15, 2009.

KUSTERS, M.A.A.; VERSTEGEN, R.H.J.; GEMEN, E.F.A.; VRIES, E. Intrinsic defect of the immune system in children with Down syndrome: a review. **Clinical and Experimental Immunology**. n.156, p.189-93, 2009.

KUSTERS, M.A.A.; VERSTEGEN, R.H.J.; VRIEST, E. Down syndrome: is it really characterized by precocious immunosenescence? **Aging and Disease**. n.6, v.2, p.538-45, 2011.

LEAL, D.; STREHER, C.; BERTONCHELI, C.; CARLI, L.; LEAL, C.; SILVA, J.; MORSCH, V.; SCHETINGER, M. HIV infection is associated with increased NTPDase activity that correlates with CD39 - positive lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**. n.1746, p.129-34, 2005.

LEQUIN, R.M. Enzyme immunoassay (EIA)/Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Clinical Chemistry**. n.12, v.51, p.2415-18, 2005.

MALT, E.A.; DAHL, R.C.; HAUGSAND, T.M.; ULVESTAND, I.H.; EMILSEN, N.M.; HANSEN, B.; CARDENAS, Y.E.G.; SKOLD, R.O.; THORSEN, A.T.B.; DAVIDSEN, E.M.M. Health and disease in adults with Down syndrome. **Tidsskrift for Den norske legeförening**. n.3, v.133, p.290-94, 2013.

MANCINI, M.C.; CARVALHO E SILVA, P.; GONÇALVES, S.C.; MARTINS, S.M. Comparação do desempenho funcional de crianças portadoras de Síndrome de Down e crianças com desenvolvimento normal aos 2 e 5 anos de idade. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. n.61. p.409-15, 2003.

MARZZOCO, A., TORRES, B.B. **Bioquímica Básica**. Guanabara Koogan, 2007. 388pg.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Diretrizes de atenção à pessoa com Síndrome de Down. **Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas**. 60 p., 2012.

MOREIRA, L.M.A.; EL-HANI, C.N.; GUSMÃO, F.AF. A síndrome de Down e sua patogênese: considerações sobre o determinismo genético. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. n.2, v.22, p.96-9, 2000.

NEVES, D.D.; JUNIOR, C.T.S.; PREZA, P.C.A.; MORISSON, P. Dosagem da atividade da adenosine deaminase (ADA). **Pulmão RJ**. n.3, v.13, 2004.

NELSON, D.L., COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. ARTMED, 2010. 1304pg.

NISIHARA, R.M.; KOTZE, L.M.S.; UTIYAMA, S.R.R.; OLIVEIRA, N.P.; FIEDLER, P.T.; MESSIAS-REASON, I.T. Doença celíaca em crianças e adolescentes com síndrome de Down. **Jornal de Pediatria**. n.81, p.373-76, 2005.

PUKKA, R.; PUKKA, M.; LEPPILAMPI, M.; LINNA SL.; KOUVALAINEN, K. Erythrocyte adenosine deaminase, purine nucleoside phosphorylase and phosphoribosyltransferase activity in patients with Down's syndrome. **Clinica Chimica Acta**. n.126, v.3, p.275-81, 1982.

PUKKA, R.; PUKKA, M.; LINNA SL.; JOENSUU, T.; KOUVALAINEN, K. Elevated erythrocyte adenosine deaminase activity. **Acta Paediatrica Scandinavica**. n.70, v.5, p.739-41, 1981.

PUKKA, R.; PUKKA, M.; PERKKILA, L.; KOUVALAINEN, K. Levels of some purine metabolizing enzymes in lymphocytes from patient with Down's syndrome. **Biochemical Medicine and Metabolic Biology**. n.36, v.1, p.45-50, 1986.

RAM, G.; CHINEN, J. Infection and immunodeficiency in Down syndrome. **Clinical and Experimental Immunology**, n.164, p.9-16, 2011.

RIBEIRO, L.M.A.; JACOB, C.M.A.; PASTORINO, A.C.; KIM, C.A.E.; FOMIN, A.B.F.; CASTRO, A.P.B.M. Avaliação dos fatores associados a infecções recorrentes e/ou graves em pacientes com síndrome de down. **Jornal de Pediatria**. n.2, v.79, p.141-48, 2003.

RICO, F.R.; SÁNCHEZ, M.C.R. Look for Diagnostics. Disponível em: <http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Linf%C3%B3citos+T&lang=3>. Acesso em 22 novembro 2013.

RODRIGUES, R. Avaliação da atividade das enzimas NTPDase e acetilcolinesterase em linfócitos de portadores de Síndrome de Down: relação com parâmetros inflamatórios. 2013. 80 folhas. Dissertação – Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2013.

SAKOWICK-BURKIEWICZ, M.; KOBUCH, K.; GRDEN, M.; MACIEJEWSKA, I.; SZUTOWICZ, A.; PAWELCZYK, T. Impact of adenosine receptors on immunoglobulin production by human peripheral blood B lymphocytes. **Journal of Physiology and Pharmacology**. n.63, p.661-68, 2012.

SILVA, D.; LACERDA, A.P. Proteína C reativa de alta sensibilidade como biomarcador de risco de doença coronária. **Revista Portuguesa de Cardiologia**. n.11, v.31, p.733-45, 2012.

SILVA, N.L.P.; DESSEN, M.A. Síndrome de Down: etiologia, caracterização e impacto na família. **Interação em Psicologia**. n.2, v.6, p.167-76, 2002.

SPANEVELLO, R.; MAZZANTI, C.; SCHMATZ, R.; THOMÉ, G.; BAGATINI, M.; CORREA, M.; ROSA, C.; STEFANELLO, N.; BELLÉ, L.; MORETTO, B.; OLIVEIRA, L.; MORSCH, V.; SCHETINGER, M. The activity and expression of NTPDase is altered in lymphocytes of multiple sclerosis patients. **Clinica Chimica Acta** n.411, p.210-14, 2010.

THOMPSON, M.; MCLNNES, R.; WILLARD, H. **Thompson & Thompson: Genética Médica**. 5ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 1993.

VITIELLO, L.; GORINI, S.; ROSANO, G.; LA SALA, A. Immunoregulation through extracellular nucleotides. **Blood**. n.120, p.511-18, 2012.

WACHTEL, T.J.; PUESCHEL, S.M. Macrocytosis in Down syndrome. **American Journal on Mental Retardation**. n.4, p.417-20, 1991.

WEIJERMAN, M.E.; WINTER, J.P. The care of children with Down syndrome. **European Journal of Pediatric**. n.169, p.1445-52, 2010.

YEGUTKIN, G.G. Nucleotide and nucleoside converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta**. n.1783, p.673-94, 2008.

ZANG, Y.; XIA, Y. Adenosine Signalling in normal and sickle erythrocytes and beyond. **Microbes and Infection**. n.14, p.863-73, 2012.

ZHANG, B. CD73: A Novel Target for Cancer Immunotherapy. **Cancer Research**. n.70, p.6407-11, 2010.