

## **AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS EM LINFÓCITOS E SORO DE PORTADORES DE SÍNDROME DE DOWN**

**FABIANO J. S. SOARES<sup>1</sup>; RODRIGO RODRIGUES<sup>2</sup>; GABRIELA DEBOM<sup>2</sup>;  
CAROLINE MACHADO<sup>2</sup>; ELIZANDRA BRAGANHOL<sup>2</sup>; ROSELIA M.  
SPANVELLO<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [fabiano\\_soares11@hotmail.com](mailto:fabiano_soares11@hotmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [rspanvello@gmail.com](mailto:rspanvello@gmail.com)

### **1. INTRODUÇÃO**

A síndrome de Down (SD) também conhecida como Trissomia do 21 é uma doença genética causada pela ocorrência de três cromossomos 21, na sua totalidade ou de uma porção fundamental dele (SILVA & DESSEN, 2002). Esta síndrome constitui uma das causas mais frequentes de deficiência mental. O diagnóstico pode ser realizado clinicamente no período neonatal e confirmado por estudos genéticos (BITTLES et al., 2006).

A morbidade por doenças infecciosas é elevada em portadores de SD. A frequência de infecções e doenças autoimunes nesses pacientes tem sido associada a várias alterações tanto na resposta imune celular quanto humoral (RIBEIRO et al., 2003).

Muitos mediadores são capazes de controlar as ações dos linfócitos, dentre estes pode-se destacar os nucleotídeos e nucleosídeos da adenina, como o trifosfato de adenosina (ATP) e a adenosina. O ATP extracelular 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  $\gamma$ ) IFN- $\gamma$  (BOURS et al., 2006). Por outro lado, a adenosina tem potentes atividades anti-inflamatórias e imunossupressoras por inibir a proliferação de células T através da ativação de receptores A<sub>2A</sub> e a liberação de citocinas pró-inflamatórias (GESSI et al., 2007).

A sinalização induzida pelo ATP e adenosina nas respostas imunes e inflamatórias correlaciona-se diretamente à atividade das enzimas NTPDase, e adenosina deaminase (ADA), respectivamente. A NTPDase1 é uma ectoenzima capaz de hidrolisar nucleotídeos como o ATP e o ADP, até seu respectivo nucleotídeo monofosfatado AMP. Esta enzima foi caracterizada em linfócitos (LEAL et al., 2005) e tem sido postulado que a NTPDase1 controla muitas funções destas células incluindo reconhecimento de antígenos e ativação das células T citotóxicas.

A ADA é uma enzima envolvida na desaminação da adenosina e da desoxiadenosina nucleosídeo, formando inosina e desoxiinosina, respectivamente (PHILLIS, 1991). A ADA está amplamente distribuída nos tecidos e está presente no desenvolvimento do sistema imune. Em particular, a ADA tem um papel importante na proliferação e diferenciação das células linfóides. A ADA também é a principal reguladora da concentração de adenosina sérica, e está envolvida no desenvolvimento das respostas inflamatórias e na produção de citocinas (ZIDEK, 1999).

Sendo assim, devido aos mecanismos ainda pouco compreendidos em relação à imunodeficiência na SD, o objetivo deste trabalho foi avaliar o papel das enzimas NTPDase e ADA em linfócitos e em soro, bem como os níveis de

citocinas pró e anti-inflamatórias em indivíduos portadores dessa alteração genética.

## 2. METODOLOGIA

A população avaliada nesse estudo consistiu de 23 indivíduos adultos, portadores de SD e 23 indivíduos saudáveis como grupo controle, todos habitantes da cidade de Pelotas/RS. As amostras de sangue foram coletadas somente após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos indivíduos saudáveis bem como pelos responsáveis dos portadores de SD.

Foram coletados 12 ml de sangue por punção venosa de cada indivíduo que posteriormente foi utilizado para a preparação de linfócitos, ensaios enzimáticos e determinação de citocinas inflamatórias.

Os linfócitos foram isolados de sangue total coletado com EDTA e separados por gradiente de densidade usando Ficoll-Histopaque. Após o isolamento dos linfócitos a atividade da NTPDase foi determinada segundo o método de LEAL et al., (2005). A atividade enzimática foi expressa em nmol de Pi liberado /min/mg de proteína.

A atividade da ADA em soro foi determinada de acordo com GIUSTI & GAKIS (1971) Os resultados foram expressos em unidades por litro (U/L). Uma unidade (1 U) de ADA é definida como a quantidade de enzima necessária para libertar 1 mmol de amônia a partir da adenosina por minuto nas condições de ensaio convencionais.

A quantificação de citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-10 no soro foi determinada por ELISA utilizando kits comerciais (eBIO-Science)

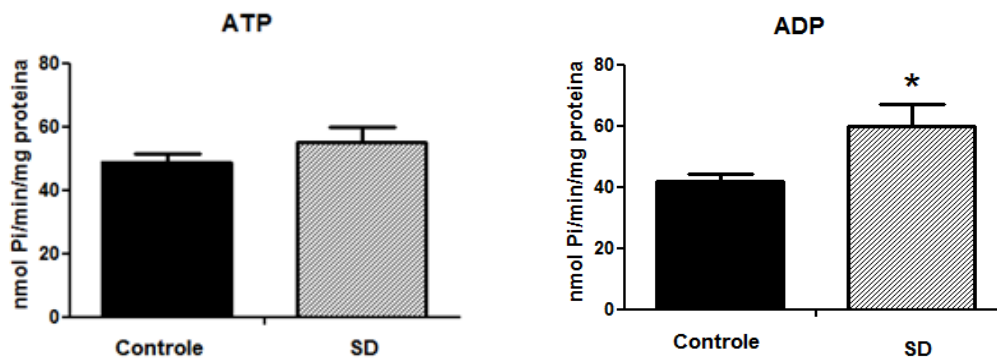
Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste t de Student para amostras independentes. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando  $P < 0.05$ . Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

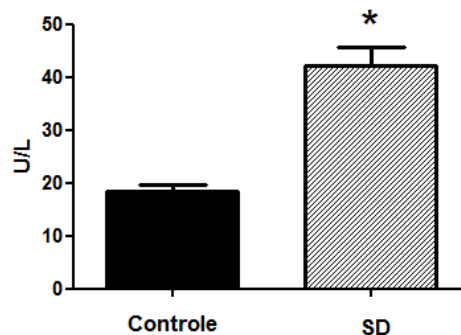
Os resultados demonstraram que a atividade da NTPDase, usando ADP como substrato, encontra-se aumentada em linfócitos de portadores com SD quando comparado ao grupo controle ( $P < 0,05$ ). Nenhuma alteração foi observada na hidrólise do ATP em linfócitos de indivíduos com SD (Figura 1).

A NTPDase é uma enzima presente na membrana de linfócitos capaz de hidrolisar tanto ATP quanto ADP em AMP, o qual é subsequentemente hidrolisado pela enzima 5'-nucleotidase a adenosina. É bem estabelecido na literatura que a adenosina é uma molécula com funções anti-inflamatórias. Assim, o aumento da hidrólise de ADP observado nesse estudo poderia contribuir para a produção de adenosina. Estas alterações podem representar um importante mecanismo compensatório para diminuir resposta imune e a inflamação na SD.

Entretanto, nesse estudo também foi avaliado a atividade da ADA em soro, onde pode-se observar que a atividade dessa enzima encontra-se aumentada em amostras de portadores de SD quando comparado ao grupo controle ( $P = 0,0001$ ) (Figura 2). A adenosina desempenha um papel crucial na regulação da resposta inflamatória, sendo considerada uma molécula com ação imunossupressora e anti-inflamatória. O aumento na atividade da ADA poderia levar a uma diminuição nos níveis de adenosina extracelular e assim contribuir para a liberação de citocinas pró-inflamatórias.



**Figura 1** - Atividade da NTPDase em linfócitos de portadores de Síndrome de Down (SD) e grupo controle usando ATP e ADP como substrato. \* Diferente do controle ( $P < 0.05$ ) ( $n = 23$ ).



**Figura 2:** Atividade da adenosina deaminase em soro de portadores de Síndrome de Down (SD) e grupo controle. \*Diferente do controle ( $P < 0.05$ ) ( $n = 23$ ).

De acordo com a hipótese anterior, nesse trabalho foi demonstrado que os níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  foram aumentados no soro dos portadores de SD em relação ao grupo controle ( $P < 0,003$ ). Por outro lado, os níveis de IL-10 foram menores em indivíduos adultos com SD em comparação a indivíduos saudáveis ( $P < 0,0001$ ) (Tabela I).

**Tabela 1** - Níveis de citocinas em soro de portadores de SD e indivíduos controles. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  SEM. IL1, IL6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  IL10 estão expressas em pg/ml. \* Diferente do grupo controle ( $P < 0,05$ ).

	Controles	Síndrome de Down
IL1	48.45 $\pm$ 1.10	58.23 $\pm$ 3.02*
IL6	57.15 $\pm$ 1.44	70.58 $\pm$ 3.33*
TNF $\alpha$	72.70 $\pm$ 1.15	90.52 $\pm$ 3.46*
IFN $\gamma$	88.35 $\pm$ 1.31	112.05 $\pm$ 4.07*
IL10	110.95 $\pm$ 1.85	86.93 $\pm$ 2.69*

#### 4. CONCLUSÕES

A atividade da NTPDase em linfócitos e da ADA em soro foi alterada em portadores adultos de SD. O aumento da atividade da ADA em soro poderia levar a uma diminuição nos níveis de adenosina, uma molécula com funções anti-inflamatórias. Esses achados podem contribuir para explicar as disfunções imunes e alterações nos níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias descritas para essa síndrome.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BITTLES, A.; BOWER, C.; HUSSAIN, R.; GLASSON, E. The four ages of Down syndrome. **European Journal of Public Health**, v. 17, p. 221-225, 2006.

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**, v. 112, p. 358-404, 2006.

GAKIS C. Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2: diagnostic and biological role. **Eur Respir J**, v. 9, n. 4, p. 632-633, 1996.

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**, v. 3, p. 109-116, 2007.

LEAL, D.B.; STREHER, C.A.; NEU, T.N.; BITTENCOURT, F.P.; LEAL, C.A.; DA SILVA, J.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**. V. 1721, p. 9-15, 2005.

PHILLIS, J.W. **Adenosine and adenine nucleotides as regulators of cellular function** first. ed. Boca Raton, Florida, U.S.A: CRC press; 1991.

RIBEIRO, L.; JACOB, C.; PASTORINO, A.; KIM, C.; FOMIN, A.; CASTRO, A. Avaliação dos fatores associados a infecções em pacientes com Síndrome de Down. **Journal de Pediatria**, v. 79, p. 141-148, 2003.

SILVA, N.; DESSEN, M. Síndrome de Down: etiologia, caracterização e impacto na família. **Interação em Psicologia**, v. 6, p. 167-176, 2002.

YEGUTKIN, G. Nucleotide and nucleoside - converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1783, p. 673 - 694, 2008.

ZIDEK Z. Adenosine - cyclic AMP pathways and cytokine expression. **Eur Cytokine Netw**, v. 10, n. 3, 319-28, 1999.