



# **Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto**

## **Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

---

**Cláudia Regina dos Santos Silva**

### **Análise da expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória em crianças com síndrome de Down**

**São José do Rio Preto  
2015**

Cláudia Regina dos Santos Silva

**Análise da expressão de genes envolvidos na  
resposta inflamatória em crianças com síndrome  
de Down**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina de São José do Rio Preto para  
obtenção do Título de Mestre no Curso  
de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde, Eixo Temático: Medicina e  
Ciências Correlatas.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Érika Cristina Pavarino

**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Joice Matos Biselli Périco

São José do Rio Preto

2015

Silva, Cláudia Regina dos Santos

Análise da expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória em crianças com síndrome de Down/ Cláudia Regina dos Santos Silva  
São José do Rio Preto, 2015.

73 p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Érika Cristina Pavarino

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Joice Matos Biselli Périco

1. Síndrome de Down; 2. Expressão gênica; 3. Sistema imunológico;  
4. Resposta inflamatória

Cláudia Regina dos Santos Silva

**Análise da expressão de genes envolvidos na  
resposta inflamatória em crianças com síndrome  
de Down**

BANCA EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO  
DE MESTRE

Presidente e Orientador: \_\_\_\_\_

2º Examinador: \_\_\_\_\_

3º Examinador: \_\_\_\_\_

Suplentes: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

São José do Rio Preto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

## SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe.....	iv
Lista de Figuras.....	v
Lista de Tabelas e Quadros.....	vi
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	viii
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiv
I. Introdução.....	1
I.1. Objetivos.....	10
II. Casuística e Métodos.....	11
II.1. Casuística.....	12
II. 2. Métodos.....	14
II.2.1. Coleta e processamento de amostras de sangue periférico.....	14
II.2.2. Quantificação das amostras de RNA total.....	14
II.2.3. Transcrição reversa e síntese de DNA complementar ( <i>cDNA</i> ).....	16
II.2.4. Curva Padrão de quantificação dos genes <i>GAPDH</i> e <i>HPRT1</i> .....	16
II.2.4.1. Quantificação da expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória.....	19
II.2.5. Análise estatística.....	21
II.2.6. Análise funcional de genes diferencialmente expressos.....	22
III. Resultados.....	24
III.1. Caracterização dos grupos.....	25
III.2. Expressão Gênica.....	25
III.3. Análise Funcional dos genes diferencialmente expressos.....	28

IV. Discussão.....	35
V. Conclusão.....	45
VI. Referências Bibliográficas.....	47
VII. Anexos.....	73

## **DEDICATÓRIA**

### **Aos meus pais Lourdes e Jorge**

Pela educação e apoio, não mediram esforços para a realização de minhas conquistas. A vocês, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade. Amo vocês.

### **Aos meus avós paterno Joaquim (*in memorian*) e Aparecida e avós materno Joaquim (*in memorian*) Inês (*in memorian*)**

Pela existência de meus pais, pois sem eles este trabalho não se realizaria.

### **Ao meu irmão Rogério e minha cunhada Karina**

Por fazerem parte da minha vida nos momentos tristes, alegres e engraçados. Pelo carinho e companheirismo.

### **Aos meus sobrinhos Láine e Enzo**

Meus melhores e maiores presentes. Amo vocês.

### **Aos meus tio(a)s, primo(a)s**

Por sempre torcerem por mim.

### **Aos amigos**

Pela amizade, compreensão, companheirismo. Vocês fazem parte da concretização desse sonho.

## **AGRADECIMENTOS**

### **À Deus**

Meu criador, essencial em minha vida, o que seria de mim sem a fé que tenho nele.

### **À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Érika Cristina Pavarino**

Pelo exemplo profissional, pela oportunidade e confiança e pela paciência na orientação para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

### **À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Joice Matos Biselli Périgo**

Pela divisão de seu conhecimento, determinação, amizade e disponibilidade.

### **À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eny Maria Goloni Bertollo**

Pelo convívio, incentivo e oportunidade no laboratório.

### **Às amigas Anelise, Márcia, Stéphanie e amigos da UPGEM e do Bloco U6**

A todos que indireta ou diretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Sempre dispostos a ajudar.

### **Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da FAMERP**

Pela disponibilidade de tempo e material, apoio e suporte à pesquisa.

**Ao Prof. Dr.º Wilson Araújo da Silva Júnior, Jorge Estefano Santana de Souza e Matheus Carvalho Bürger**

Pela colaboração das análises por ferramentas de Bioinformática.

**À Equipe Ding-Down FAMERP/FUNFARME**

Pelo apoio a este trabalho.

**Aos participantes do estudo e seus familiares**

Pela colaboração e pelo gesto de amor ao próximo.

**À Diretoria da FAMERP e do Hospital de Base de São José do Rio Preto**

Pelo grande incentivo e apoio para o desenvolvimento deste projeto.

**À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),  
ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à  
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).**

Pela bolsa de Mestrado e auxílio financeiro.

*“A humildade exprime, uma das raras certezas de que estou certo: a de que ninguém é superior a ninguém”. (Paulo Freire)*

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1.** Expressão relativa (RQ) dos 20 genes diferencialmente expressos ( $p < 0,05$ ) em crianças com Síndrome de Down em relação ao grupo controle (RQ  $\log_2=0$ ).....26
- Figura 2.** Vias metabólicas das quais os genes diferencialmente expressos em crianças com Síndrome de Down participam, segundo a base de dados *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEEG)*. O número de genes envolvido é indicado no eixo horizontal do gráfico.....28
- Figura 3.** Processos biológicos dos quais os genes diferencialmente expressos em crianças com Síndrome de Down participam, segundo a base de dados *Protein Analysis Through Evolutionary Relationships (PANTHER)*. O número de genes envolvidos é indicado no eixo horizontal do gráfico.....30
- Figura 4.** Processos biológicos dos quais os genes diferencialmente expressos em crianças com Síndrome de Down participam, segundo a base de dados *Gene Ontology (GO)*. O número de genes envolvidos é indicado no eixo horizontal do gráfico.....31
- Figura 5.** Associação genética dos genes diferencialmente expressos em crianças com Síndrome de Down com doenças, segundo as bases de dados *Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)* e *Genetic Association Database (GAD)*. O número de genes envolvidos é indicado no eixo horizontal do gráfico.....33

## **LISTA DE TABELAS E QUADROS**

<b>Tabela 1.</b> Comparação de dados referentes à idade e sexo das crianças incluídas no estudo entre os grupos caso e controle.....	25
<b>Tabela 2.</b> Expressão gênica diferencial significativa em células mononucleares do sangue periférico entre crianças com e sem Síndrome de Down.....	27
<b>Tabela 3.</b> Vias metabólicas associadas aos genes alvos diferencialmente expressos em crianças com Síndrome de Down na categoria <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEEG)</i> .....	29
<b>Tabela 4.</b> Processos biológicos significantes em relação aos genes alvos diferencialmente expressos em crianças com Síndrome de Down na categoria <i>Protein Analysis Through Evolutionary Relationships (PANTHER)</i> .....	30
<b>Tabela 5.</b> Processos biológicos significantes em relação aos genes alvos diferencialmente expressos em crianças com Síndrome de Down na categoria dados <i>Gene Ontology (GO)</i> .....	32
<b>Tabela 6.</b> Doenças associadas aos genes alvos diferencialmente expressos em crianças com Síndrome de Down de acordo com as bases de dados <i>Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)</i> e <i>Genetic Association Database (GAD)</i> .....	34
<b>Quadro 1.</b> Genes com expressão aumentada identificados em estudos de expressão gênica, em indivíduos com trissomia do HSA21.....	6
<b>Quadro 2.</b> Genes com expressão reduzida identificados em estudos de expressão gênica, em indivíduos com trissomia do HSA21.....	8

<b>Quadro 3.</b> Dados referentes à idade e sexo das crianças incluídas no estudo.....	13
<b>Quadro 4.</b> Quantificação e avaliação das amostras por espectrofotometria.....	15
<b>Quadro 5.</b> Valores médios das réplicas técnicas correspondentes ao ciclo de quantificação (Cq) para cada concentração de amostra utilizada.....	18
<b>Quadro 6.</b> Genes* envolvidos na resposta inflamatória com ensaios incluídos no kit <i>TaqMan® Array Plate Human Inflammation (Applied Biosystems)</i> para análise de expressão gênica por PCRq.....	20

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

$\mu\text{L}$	Microlitro
5-LO	5-lipoxigenase
	<i>6-carboxy-fluoresceine</i>
<i>ADRB1</i>	<i>Adrenoceptor beta 1</i>
<i>ADRB2</i>	<i>Adrenoceptor beta 2, surface</i>
<i>ALOX12</i>	<i>Arachidonate 12-lipoxygenase</i>
APP	Proteína precursora amiloide
A $\beta$	Beta-amilóide
<i>BDKRB1</i>	<i>Bradykinin receptor B1</i>
<i>CACNA1D</i>	<i>Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit</i>
<i>CASP1</i>	<i>Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase</i>
<i>CD40LG</i>	<i>CD40 ligand</i>
<i>cDNA</i>	<i>Complementary DNA</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CMV	Citomegalovírus
Cq	Ciclo de quantificação
DA	Doença de Alzheimer
<i>DAVID</i>	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
<i>DEPC</i>	<i>Diethylpyrocarbonate</i>
DI	Distúrbios intelectuais
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DP	Desvio padrão
<i>DS</i>	<i>Down syndrome</i>

ECM	Matriz extracelular de colágeno
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
GAD	<i>Genetic Association Database</i>
GAPDH	<i>Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
GPCR	Receptores acoplados à proteína G
GTG	Bandeamento G combinado com Tripsina e Giemsa
HB	Hospital de Base de São José do Rio Preto
<i>HPRT1</i>	<i>Hipoxantina fosforribosil transferase</i>
HSA 21	<i>Homo sapiens</i> cromossomo 21
<i>HTqPCR</i>	<i>High-throughput analysis and visualization of quantitative real-time PCR data in R</i>
<i>HTR3A</i>	<i>5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A, ionotropic</i>
<i>ICAM1</i>	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
ID	Identificação
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IFN	Interferons
IGs	Imunoglobulinas
IL	Interleucinas
<i>ITGAM</i>	<i>Integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)</i>
<i>ITGB1</i>	<i>Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)</i>
<i>ITGB2</i>	<i>Integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)</i>
<i>KEEG</i>	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>

<i>LFA-1</i>	<i>Lymphocyte functional antigen-1</i>
<i>Log2</i>	<i>Base 2 logarithm</i>
<i>LTA4</i>	<i>Leukotriene A4</i>
<i>LTA4H</i>	<i>Leukotriene A4 hydrolase</i>
<i>LTB4</i>	<i>Leukotriene B4</i>
<i>LTC4</i>	<i>Leukotriene C4</i>
<i>LTD4</i>	<i>Leukotriene D4</i>
<i>LTE4</i>	<i>Leukotriene E4</i>
LTs	Leucotrienos
MAC-1	Antígeno do macrófago-1
MACs	Moléculas de adesão celular
<i>MGB</i>	<i>Minor Groove Binding</i>
mL	Mililitro
<i>NCBI</i>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
°C	Graus Celsius
OD	Densidade óptica
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
<i>PANTHER</i>	<i>Protein Analysis Through Evolutionary Relationships</i>
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PCR	Proteína C Reativa
PCRq	Reação em cadeia da polimerase quantitativa

<i>PDE4C</i>	<i>Phosphodiesterase 4C, cAMP-specific</i>
PHA	Fitohemaglutinina
<i>PLA2G2D</i>	<i>Phospholipase A2, group IID</i>
<i>PLA2G5</i>	<i>Phospholipase A2, group V</i>
<i>PLCB4</i>	<i>Phospholipase C, beta 4</i>
<i>PLCD1</i>	<i>Phospholipase C, delta 1</i>
<i>qPCR</i>	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
RNA	Ácido ribonucleico
<i>RQ</i>	<i>Quantificação relative</i>
<i>RT</i>	<i>Reverse transcriptase</i>
<i>RT-PCR</i>	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
<i>RT-qPCR</i>	<i>Quantitative reverse transcription PCR</i>
SAGE	Análise Serial da Expressão Gênica
SCC	Sistema caliceína-cinina
SD	Síndrome de Down
<i>TBXAS1</i>	<i>Thromboxane A synthase 1 (platelet)</i>
TGF- $\beta$	Fator transformador de crescimento beta
Th	Células T auxiliares
TNF	Fator de necrose tumoral
<i>TNFRSF1B</i>	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B</i>
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
U	Unidade
uL	Microlitro
<i>VCAM1</i>	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>

## RESUMO

**Introdução:** A síndrome de Down (SD) é um distúrbio genético causado pela presença de uma cópia extra do cromossomo humano 21 (HSA 21) com uma incidência de um a cada 660 nascidos vivos. Indivíduos com SD apresentam alterações no sistema imunológico que resultam no aumento da frequência de infecções e doenças autoimunes. Estudos mostram que alguns genes envolvidos no sistema imunológico apresentam expressão alterada em indivíduos com SD, entretanto, os mecanismos moleculares pelos quais a trissomia do 21 leva aos distúrbios do sistema imunológico em SD permanecem pouco investigados. **Objetivo:** O presente trabalho teve como objetivo investigar o padrão de expressão de um conjunto específico de genes envolvidos no sistema imunológico e no processo inflamatório em crianças com SD e crianças sem a síndrome (grupo controle), visando identificar diferenças que possam estar relacionadas com manifestações clínicas da síndrome. **Casística e Métodos:** Foram incluídas no estudo seis crianças com SD e seis crianças sem a síndrome. A quantificação da expressão gênica foi realizada com o kit *TaqMan® Human Plate Inflammation Array*, que permite a investigação de 92 genes relacionados com a inflamação e quatro genes de referência pelo método de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (PCRq). **Resultados:** Dos 92 genes analisados, 20 genes apresentaram expressão diferencial em crianças com SD; 12 com expressão aumentada (*PLA2G2D, CACNA1D, ALOX12, VCAM1, ICAM1, PLCD1, ADRB1, HTR3A, PDE4C, CASP1, PLA2G5 e PLCB4*) e oito com expressão reduzida (*LTA4H, BDKRB1, ADRB2, CD40LG, ITGAM, TNFRSF1B, ITGB1 e TBXAS1*). Após correção estatística para múltiplos testes apenas os genes *BDKRB1* e *LTA4H* apresentaram expressão diferencial, ambos com expressão reduzida. **Conclusão:** Crianças com SD apresentam expressão

diferencial de genes, não localizados no cromossomo 21, em relação a crianças sem a síndrome. A expressão alterada desses genes, considerando suas funções na resposta inflamatória, sugere um papel relevante na patogênese da SD.

**ABSTRACT**

**Introduction:** Down syndrome (DS) is a genetic disorder caused by the presence of an extra copy of human chromosome 21 (HSA21) with an incidence of one in 660 live births. Individuals with DS show alterations of the immune system resulting in increased frequency of infections and autoimmune diseases. Studies show that some genes involved in the immune system present altered expression in individuals with DS, however, the molecular mechanisms by which trisomy 21 leads to the immune system disorders in DS remain poorly investigated. **Objective:** This study aimed to investigate the expression pattern of a specific set of genes involved in the immune system and inflammation process in children with DS and children without the syndrome (control group), to identify differences that may be related to clinical manifestations of the syndrome. **Casuistic and Methods:** In this study were included six children with DS and six children without the syndrome. The quantification of the gene expression was performed using TaqMan® Array Plate Human Inflammation Kit, which enables the investigation of 92 inflammation-related genes and four reference genes by real-time polymerase chain reaction (qPCR). **Results:** Of the 92 genes analyzed, 20 genes showed differential expression in children DS; 12 overexpressed (*PLA2G2D*, *CACNA1D*, *ALOX12*, *VCAM1*, *ICAM1*, *PLCD1*, *ADRB1*, *HTR3A*, *PDE4C*, *CASP1*, *PLA2G5* e *PLCB4*) and 8 underexpressed (*LTA4H*, *BDKRB1*, *ADRB2*, *CD40LG*, *ITGAM*, *TNFRSF1B*, *ITGB1* e *TBXAS1*). After statistical correction for false discovery rate, only the genes *BDKRB1* and *LTA4H* showed differential expression, both underexpressed. **Conclusion:** DS children show differential expression of genes, not located on chromosome 21, compared to children without DS. The altered expression of

these genes, considering their functions in the inflammatory response, suggests an important role in DS pathogenesis.

## **I.INTRODUÇÃO**

## I. INTRODUÇÃO

A síndrome de Down (SD) é a um distúrbio genético resultante da presença do cromossomo 21 (HSA 21 - *Homo sapiens* cromossomo 21) em triplicata, com incidência de um a cada 660 nascidos vivos, representando a causa mais comum de atraso mental.<sup>(1)</sup> É caracterizada por três tipos de alterações cromossômicas: trissomia livre ou simples, decorrente da não disjunção do HSA 21, presente em 95% dos indivíduos acometidos,<sup>(2)</sup> translocação, especialmente entre os cromossomos 14 e 21, com frequência de 4%, e mosaïcismo (populações celulares com 46 e 47 cromossomos no mesmo indivíduo, esta última com o HSA 21 extra) observado em apenas 1% dos casos.<sup>(3,4)</sup>

Alguns estudos sugerem que o aumento da expressão dos genes em triplicata em cerca de 50% seria diretamente responsável pelas características fenotípicas da síndrome como consequência do “efeito da dosagem gênica”. Por outro lado, acredita-se que os produtos dos genes trissômicos possam alterar a expressão de genes presentes em duas cópias, que por sua vez podem também contribuir com as manifestações clínicas, bem como com a variedade de características físicas dismórficas da síndrome.<sup>(5,6)</sup>

Indivíduos com SD apresentam um espectro variável de manifestações clínicas representadas por alterações cognitivas, comportamentais,<sup>(3,7)</sup> endocrinológicas,<sup>(8,9)</sup> oftalmológicas e auditivas;<sup>(10,11)</sup> cardiopatias congênitas;<sup>(12)</sup> doença de Alzheimer com manifestação precoce;<sup>(13)</sup> risco aumentado para leucemias específicas;<sup>(14)</sup> deficiência do sistema imunológico,<sup>(15)</sup> entre outras.

A deficiência imunológica é uma característica marcante observada na SD<sup>(15)</sup> e responsável pela frequência aumentada de infecções, em especial do trato

respiratório<sup>(16,17)</sup> e de doenças autoimunes nos indivíduos com a síndrome.<sup>(8,18)</sup> Embora a base etiológica da deficiência imunológica não esteja completamente definida, alterações no sistema imune como anormalidades funcionais e morfológicas do timo,<sup>(19,20)</sup> alteração na diferenciação, maturação e ativação de linfócitos T e linfocitopenia,<sup>(21-23)</sup> sugerem um fenótipo senescente precoce no sistema imunológico dos indivíduos com SD no qual podem contribuir para uma maior susceptibilidade de infecções.<sup>(24)</sup>

A fisiopatologia de várias infecções que envolvem o sistema imunológico tem a inflamação como um fator de implicação comum.<sup>(25)</sup> Neste contexto, destaca-se a participação de um grupo diversificado de proteínas não humorais, as citocinas, que participam de diversos processos biológicos, incluindo a mediação da resposta inflamatória após lesões.<sup>(26)</sup> Estas substâncias são produzidas por várias células, em especial pelos linfócitos e macrófagos ativados e atuam na regulação do crescimento e diferenciação de linfócitos, ativação e regulação das células inflamatórias, como mastócitos, neutrófilos e eosinófilos, e na comunicação entre as células do sistema imunológico.<sup>(27,28)</sup>

Essa classe de proteínas é agrupada em interleucinas (IL), fatores de necrose tumoral (TNF), quimiocinas (citocinas quimiotáticas), interferons (IFN) e fatores de crescimento mesenquimal.<sup>(29)</sup> São consideradas pró-inflamatórias as IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-17, TNF e IFN- $\gamma$  e anti-inflamatórias as IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- $\beta$  (fator transformador de crescimento beta).<sup>(29,30)</sup>

Alterações nas concentrações de citocinas pró e anti-inflamatórias em indivíduos com SD demonstram a sua relação com a patogênese da síndrome. Guazzarotti et al.<sup>(22)</sup> detectaram aumento nos níveis de IL-7 no soro de adolescentes saudáveis com SD. Essa

citocina tem um importante papel no processo de maturação e diferenciação dos timócitos (células precursoras dos linfócitos T) e auxilia na sobrevivência das células T maduras. Entretanto, no timo maduro esta interleucina altera as funções efetoras do linfócito T e pode resultar em um aumento de infecções e estado inflamatório crônico.<sup>(31-33)</sup>

Em cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), estimuladas com citomegalovírus (CMV) ou fitohemaglutinina (PHA), de indivíduos com SD estudados por Guazzarotti et al.<sup>(22)</sup> também foi detectado um aumento de IFN- $\gamma$  e IL-10 e da maturação pós-tímica de linfócitos T. Esses autores sugerem que as alterações que afetam a imunidade mediada por células nesses indivíduos com SD são compatíveis com um perfil de envelhecimento precoce. A citocina IFN- $\gamma$  regula a proliferação de timócitos, e sua expressão aumentada propõe uma possível explicação para a anatomia anormal do timo em SD.<sup>(34)</sup>

Um aumento significativo das concentrações de IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF $\alpha$  e de citocinas produzidas pelas células T auxiliares (Th1, Th2 e Th17) também foi observado no fluído crevicular gengival de adolescentes com SD comparadas com adolescentes saudáveis sem a SD (grupo controle), pareados por idade.<sup>(35)</sup> Esses autores sugerem que esta resposta imune alterada no tecido periodontal dos indivíduos com SD, em longo prazo, pode predispor uma periodontite precoce.

Em um estudo realizado por Cetiner et al.<sup>(36)</sup> os níveis séricos de IL-4 e IL-10 foram maiores em crianças com SD comparados com os de crianças sem a síndrome, enquanto os níveis de IL-6 e TNF $\alpha$  foram menores naquelas com SD. Considerando que as interleucinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 inibem a síntese das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF,<sup>(37)</sup> os autores propuseram que os níveis reduzidos dessas

citocinas possivelmente comprometem a proliferação e função de macrófagos e outros fagócitos, o que poderia explicar a causa das infecções recorrentes observadas nas crianças com SD.

Um aumento na produção das citocinas TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8, após estimulação com o vírus *Influenza A*, e um aumento da IL-10, após estimulação com *Streptococcus pneumoniae*, foi observado em cultura de sangue periférico de crianças com SD o que poderia explicar os sintomas mais graves da doença causada por estes patógenos nessas crianças.<sup>(38,39)</sup>

A participação de citocinas inflamatórias também foi sugerida em processos degenerativos precoce do Sistema Nervoso Central. Rostami et al.<sup>(40)</sup> observaram níveis das citocinas TNF $\alpha$  e IFN- $\gamma$  significativamente aumentados em crianças com SD e distúrbios intelectuais (DI) em relação a crianças sem SD e DI.

Expressão diferencial de genes envolvidos em processos imunológicos nos indivíduos com SD em relação àqueles sem a síndrome também poderia explicar a deficiência imunológica observada na SD.<sup>(41,42)</sup> Entretanto, os dados ainda são escassos e inconclusivos, o que demonstra a necessidade de ampliar os estudos de expressão de genes relacionados com a resposta imunológica / inflamatória em SD. Os Quadros 1 e 2 apresentam resultados de estudos de expressão gênica, incluindo genes envolvidos nos processos imunológico e inflamatório, em indivíduos com trissomia do HSA21.

**Quadro 1.** Genes com expressão aumentada identificados em estudos de expressão gênica, em indivíduos com trissomia do HSA21.

Gene*	Função	Amostra analisada	Metodologia	Referência
<i>HLA-DRB3</i>	Molécula de classe II expressa em células apresentadoras de antígenos (linfócitos B, células dendríticas e macrófagos) <sup>(43)</sup>	Linfócitos T	Microarray <sup>a</sup>	44
<i>GABRG2</i>	Receptor do neurotransmissor GABA <sup>(45)</sup>	Linfócitos T	Microarray <sup>a</sup>	44
<i>SOD1</i>	Destrói radicais livres <sup>(46)</sup>	Linfócitos T	Microarray <sup>a</sup>	44
<i>UCHL1</i>	Realiza a hidrólise da ubiquitina <sup>(47)</sup>	Linfócitos T	Microarray <sup>a</sup>	44
<i>GTF3A</i>	Fator de transcrição de RNA polimerase III <sup>(48)</sup>	Leucócitos	SAGE <sup>b</sup>	49
<i>14-3-3 eta</i>	Proteína de transdução de sinais <sup>(50)</sup>	Linfócitos	SAGE <sup>c</sup>	51
<i>TMEM131</i>	Desempenha um papel na resposta imunitária em uma infecção viral <sup>(52)</sup>	Leucócitos	PCRq	53
<i>NPDC1</i>	Regula negativamente a proliferação de células neurais <sup>(54)</sup>	Leucócitos	PCRq	53
<i>AIRE</i>	Fator de transcrição que regula a expressão de autoantígenos e a seleção negativa de células T auto-reativas no timo <sup>(55)</sup>	Tecido tímico	PCRq	56
<i>AGPAT3</i>	Acetiltransferase integrada à membrana celular <sup>(57)</sup>	PBMCs	Microarray <sup>d</sup>	58
<i>ITGB2</i>	Desempenha papel na resposta imunológica (adesão e sinalização celular) <sup>(59)</sup>	PBMCs	Microarray <sup>d</sup>	58
<i>PDXK</i>	Proteína que fosforila a vitamina B6 <sup>(60)</sup>	PBMCs	Microarray <sup>d</sup>	58
<i>MAPK14</i>	Envolvida na proliferação, diferenciação e transcrição. Ativada por citocinas pró-inflamatórias <sup>(61)</sup>	PBMCs	Microarray <sup>d</sup>	58
<i>BTG3</i>	Pode desempenhar um papel na neurogênese no sistema nervoso central <sup>(62)</sup>	PBMCs	Microarray <sup>d</sup>	58
<i>C21orf33</i>	Proteína mitocondrial <sup>(63)</sup>	PBMCs	Microarray <sup>d</sup>	58
<i>CSTB</i>	Desempenha um papel na proteção contra as proteases liberadas de lisossomas <sup>(64)</sup>	PBMCs	Microarray <sup>d</sup>	58
<i>GABPA</i>	Envolvida na ativação da expressão do citocromo-oxidase e de controle nuclear mitocondrial. Pode desempenhar papel no fenótipo da SD <sup>(65)</sup>	PBMCs	Microarray <sup>d</sup>	58
<i>GART</i>	Necessário para síntese da purina <sup>(66)</sup>	PBMCs	Microarray <sup>d</sup>	58
<i>HLCS</i>	Desempenha um papel importante na gluconeogênese, síntese de ácidos graxos e catabolismo de aminoácidos da cadeia ramificada <sup>(67)</sup>	PBMCs	Microarray <sup>d</sup>	58
<i>MCM3AP</i>	Desempenha um papel na replicação do DNA <sup>(68)</sup>	PBMCs	Microarray <sup>d</sup>	58
<i>PFKL</i>	Participa do metabolismo da glicose <sup>(69)</sup>	PBMCs	Microarray <sup>d</sup>	58

Continuação do **Quadro 1**. Genes com expressão aumentada identificados em estudos de expressão gênica, em indivíduos com trissomia do HSA21.

<i>POFUT2</i>	Atividade O-fucosiltransferase; transfere fucose para várias famílias de proteínas, incluindo a trombosporina <sup>(70)</sup>	PBMCs	Microarray <sup>d</sup>	58
<i>UBE2G2</i>	Direciona a degradação de proteínas anormais ou de curta duração <sup>(71)</sup>	PBMCs	Microarray <sup>d</sup>	58
<i>ITGB1</i>	Receptor de membrana envolvido na adesão celular, embriogênese, hemostasia, reparação de tecidos, resposta imune e difusão metastática de células tumorais <sup>(72)</sup>	PBMCs	Microarray <sup>d</sup>	58
<i>PDGFD</i>	Desempenha um papel importante na cicatrização de feridas, induz o recrutamento de macrófagos, aumento da pressão intersticial e maturação dos vasos sanguíneos durante a angiogênese <sup>(73)</sup>	PBMCs	Microarray <sup>d</sup>	58
<i>ITGAL</i>	Desempenha um papel fundamental na adesão intercelular dos leucócitos e também as funções de sinalização de co-estimulação de linfócitos <sup>(74)</sup>	PBMCs	Microarray <sup>d</sup>	58
<i>ITGAV</i>	Interação com várias proteínas da matriz extracelular para mediar a adesão de células e pode desempenhar um papel na migração celular <sup>(75)</sup>	PBMCs	Microarray <sup>d</sup>	58
<i>PDGFRB</i>	Receptor de tirosina quinase de superfície celular, membro da família do fator de crescimento derivado de plaquetas <sup>(76)</sup>	PBMCs	Microarray <sup>d</sup>	58
<i>ADA</i>	Enzima que catalisa a hidrólise de adenosina a inosina. Sua deficiência provoca a doença de imunodeficiência combinada grave (SCID) <sup>(77)</sup>	PBMCs	Microarray <sup>d</sup>	58
<i>BCL2L1</i>	Sobrevivência de linfócitos imaturos <sup>(78)</sup>	PBMCs	PCRq	42
<i>CCR2</i>	Mediação da quimiotaxia de monócitos <sup>(79)</sup>	PBMCs	PCRq	42
<i>CCR5</i>	Regulação das funções efetoras e de tráfego das células T de memória/efetoras, macrófagos e células dendríticas imaturas <sup>(80)</sup>	PBMCs	PCRq	42
<i>IL10</i>	Secreção de citocinas como a IL6, IL-2 e interferon gama (IFN $\gamma$ ); macrófagos e ativação, diferenciação e proliferação de células B e T <sup>(81)</sup>	PBMCs	PCRq	42

\*lista de descrição da abreviatura dos genes no anexo 1; SAGE: Análise Serial da Expressão Gênica; a: genes com threshold <0.35 com valor de  $p \leq 0.05$ ; b: genes validados por RT-PCR (Transcriptase Reversa – Reação em Cadeia da Polimerase); c: genes validados por PCRq com valor de  $p < 0,05$ ; d: genes validados por PCRq com valor de  $p < 0,01$ .

**Quadro 2.** Genes com expressão reduzida identificados em estudos de expressão gênica, em indivíduos com trissomia do HSA21.

Gene*	Função	Amostra analisada	Metodologia	Referência
<i>BCL2A1</i>	Regulador da apoptose <sup>(82)</sup>	Leucócitos	SAGE <sup>b</sup>	49
<i>CXCR4</i>	Receptor de quimiocina <sup>(83)</sup>	Leucócitos	SAGE <sup>b</sup>	49
<i>IL-8</i>	Ativação de neutrófilo <sup>(84)</sup>	Leucócitos	SAGE <sup>b</sup>	49
<i>LI3 a</i>	Proteína ribossomal citoplasmática, componente da subunidade 60S. Pode reprimir genes inflamatórios como IFN $\gamma$ <sup>(85)</sup>	Leucócitos	SAGE <sup>b</sup>	49
<i>L29</i>	Proteína ribossomal citoplasmática, componente da subunidade 60S <sup>(86)</sup>	Leucócitos	SAGE <sup>b</sup>	49
<i>L37</i>	Proteína ribossomal citoplasmática, componente da subunidade 60S <sup>(87)</sup>	Leucócitos	SAGE <sup>b</sup>	49
<i>Hsp70-1</i>	Proteína de choque térmico de 70kDa <sup>(88)</sup>	Linfócitos	SAGE <sup>c</sup>	51
<i>RGS2</i>	Atua como um mediador de diferenciação mielóide <sup>(89)</sup>	Linfócitos	SAGE <sup>c</sup>	51
<i>PBEF1</i>	Envolvida na resposta ao stress e envelhecimento <sup>(90)</sup>	Linfócitos	SAGE <sup>c</sup>	51
<i>LY6E</i>	Participa da sinalização e adesão <sup>(91,92)</sup>	Linfócitos	SAGE <sup>c</sup>	51
<i>FOS</i>	Regulador da proliferação, diferenciação e transformação celular, também pode estar associado com a morte celular apoptótica <sup>(93)</sup>	Linfócitos	SAGE <sup>c</sup>	51
<i>AIRE</i>	Fator de transcrição que regula a expressão de autoantígenos e a seleção negativa de células T autorreativas no timo <sup>(94)</sup>	Tecido tímico	Microarray <sup>c</sup>	95
<i>TCF7</i>	Desempenha papel na diferenciação do linfócito T <sup>(96)</sup>	Leucócitos	PCRq	53
<i>BCL2</i>	Sobrevivência de linfócitos maduros e células B de memória <sup>(97)</sup>	PBMCs	PCRq	42
<i>CCL3</i>	Indução de quimiotaxia de células imunológicas; diferenciação de células T auxiliares; indução de degranulação de eosinófilos; liberação de histamina a partir de mastócitos <sup>(98)</sup>	PBMCs	PCRq	42
<i>CCR7</i>	Produção de timócitos; tolerância periférica e central; função de células T reguladoras; homeostase de células T <sup>(99)</sup>	PBMCs	PCRq	42
<i>CD19</i>	Modulação de transdução de sinal do complexo receptor-antígeno de células B; proliferação e ativação de células B periféricas <sup>(100)</sup>	PBMCs	PCRq	42
<i>CD28</i>	Homeostase de células T reguladoras (CD28/CD80); ativação e função de células T; tolerância periférica <sup>(101, 102)</sup>	PBMCs	PCRq	42
<i>CD40</i>	Mudança de classe de imunoglobulinas dependentes de células T; desenvolvimento de células B de memória; formação do centro germinativo <sup>(103)</sup>	PBMCs	PCRq	42

Continuação do **Quadro 2**. Genes com expressão reduzida identificados em estudos de expressão gênica, em indivíduos com trissomia do HSA21.

<i>CD40LG</i>	Regulação da função de células B <sup>(103)</sup>	PBMCs	PCRq	42
<i>CD80</i>	Proliferação de células T; produção de citocinas <sup>(104)</sup>	PBMCs	PCRq	42
<i>EDN1</i>	Ativação de macrófagos <sup>(105-107)</sup>	PBMCs	PCRq	42
<i>IKBKB</i>	Ativação da via NFK $\beta$ <sup>(108)</sup>	PBMCs	PCRq	42
<i>IL6</i>	Produção de anticorpos e auto-anticorpos; ativação de células T; diferenciação de células B; hematopoiese <sup>(109)</sup>	PBMCs	PCRq	42
<i>NOS2</i>	Síntese de óxido nítrico (microbicida, antiviral, antiparasital e efeitos anti-tumorais) <sup>(110)</sup>	PBMCs	PCRq	42
<i>SKI</i>	Regulação da sinalização do fator de crescimento transformante beta 1 ( <i>TGF-<math>\beta</math>1</i> ) <sup>(111)</sup>	PBMCs	PCRq	42
<i>HLA-DOB</i>	Molécula de classe II expressa em células apresentadoras de antígeno <sup>(112)</sup>	PBMCs	Microarray <sup>d</sup>	58
<i>VAV2</i>	Participa da angiogênese <sup>(113)</sup>	PBMCs	Microarray <sup>d</sup>	58
<i>FCRL2</i>	Receptor de imunoglobulina. Pode ser um marcador de prognóstico para a leucemia linfocítica crônica <sup>(114)</sup>	PBMCs	Microarray <sup>d</sup>	58
<i>FCER2</i>	Antígeno específico de célula B. Possui papel essencial na diferenciação e crescimento das células B, na produção e regulação de IgE <sup>(115)</sup>	PBMCs	Microarray <sup>d</sup>	58
<i>HLA-DOA</i>	Molécula de classe II expressa nos lisossomas e células B <sup>(116)</sup>	PBMCs	Microarray <sup>d</sup>	58

\*lista de descrição da abreviatura dos genes no anexo 1; SAGE: Análise Serial da Expressão Gênica; a: genes com threshold <0.35 com valor de  $p \leq 0.05$ ; b: genes validados por RT-PCR (Transcriptase Reversa – Reação em Cadeia da Polimerase); c: genes validados por PCRq com valor de  $p < 0,05$ ; d: genes validados por PCRq com valor de  $p < 0,01$ .

## **I.1. OBJETIVOS**

O presente trabalho teve como objetivos:

1. Investigar o padrão de expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória em PBMCs de crianças com Síndrome de Down (SD) e em crianças sem a síndrome;
2. Identificar, por ferramentas de bioinformática, potenciais vias biológicas dos genes diferencialmente expressos em crianças com SD.

## **II. CASUÍSTICA E MÉTODOS**

## **II. CASUÍSTICA E MÉTODOS**

### **II.1 Casuística**

De acordo com Normas Regulamentares de Pesquisa em Seres Humanos, Resolução 66/2012 do Conselho Nacional de Saúde, este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), parecer nº 043/2010 (Anexo2), CAAE nº 05843912.8.0000.5415. Após consentimento livre e esclarecido de um responsável (Anexo 3), foram incluídas no estudo seis crianças com SD (grupo caso) e seis crianças sem a síndrome (grupo controle), cujos dados estão apresentados no Quadro 3. O grupo caso foi proveniente do Serviço Ambulatorial de Genética e do Serviço Ambulatorial de Pediatria em Síndrome de Down do Hospital de Base de São José do Rio Preto (HB), hospital-escola vinculado à FAMERP. Foram incluídas no estudo cinco crianças com trissomia livre do cromossomo 21 e uma criança com mosaicismos, de acordo com o exame do cariótipo, realizado pelo Serviço de Genética do HB por bandeamento GTG de cromossomos metafásicos, cujo resultado encontra-se disponível no prontuário médico do paciente. Em relação ao grupo controle, as crianças foram provenientes do Serviço Ambulatorial de Pediatria do HB.

Os critérios de inclusão para ambos os grupo foram: idade entre dois e seis anos, ausência de manifestações clínicas sugestivas de infecção aguda, incluindo quadro gripal, tosse, febre e/ou uso de antibióticos até dez dias antes da data da coleta e ausência de infecção crônica (bronquite, asma e pneumonias de repetição). Para o grupo controle foi também utilizada como critério de inclusão a ausência de doenças associadas ao quadro clínico da SD. Para verificar a ausência de infecções foi realizado

**Quadro 3.** Dados referentes à idade e sexo das crianças incluídas no estudo.

<b>Grupo</b>	<b>Código</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Sexo</b>
Caso	CD9-3	6,6	M
Caso	CD18-3	3,7	M
Caso	CD21	5,1	F
Caso	CD22	2,5	M
Caso	CD23	2,7	M
Caso	CD24	2,1	F
Controle	CC43	3,9	F
Controle	CC44	6,5	F
Controle	CC45	5,7	F
Controle	CC46	6,0	M
Controle	CC47	5,6	F
Controle	CC48	6,0	F

o exame da Proteína C Reativa (PCR), e todas as amostras incluídas no estudo apresentaram resultado negativo.

## **II.2. Métodos**

### **II.2.1. Coleta e processamento de amostras de sangue periférico**

Amostras de sangue periférico (3 mililitros - mL) foram coletadas em *Tempus Blood RNA tube* contendo 6 mL *RNA Stabilization Solution* e o material foi armazenado a 4°C até o momento da extração de RNA, realizada utilizando-se o *Tempus Spin RNA Isolation Kit (Ambion®)*, de acordo com instruções do fabricante. As amostras de RNA isoladas de PBMCs foram armazenadas a -80°C.

### **II.2.2. Quantificação das amostras de RNA total**

A quantificação das amostras de RNA total foi realizada por espectrofotometria, que consiste na determinação da concentração do RNA pela absorvância do comprimento de onda de 260 nanômetros (nm), utilizando o equipamento *PicoDrop™ 200 (Thermo Scientific)*. Para leitura da concentração, foram utilizados 2,5 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) de amostra de RNA total. As concentrações das amostras de RNA foram determinadas em nanogramas/microlitros (ng/ $\mu\text{L}$ ). O grau de pureza foi determinado por meio da razão de densidade óptica (OD) a 260 e 280nm e, a amostra foi considerada pura quando a relação OD260/OD280 apresentou-se entre 1.7 e 2.1. Todas as amostras apresentaram razão 260/280 dentro desse intervalo. Os valores estão apresentados no Quadro 4.

**Quadro 4.** Quantificação e avaliação das amostras por espectrofotometria.

<b>Grupo</b>	<b>Código</b>	<b>Concentração (ng/<math>\mu</math>L)</b>	<b>A260/A280</b>
Caso	CD9-3	168,2	2,034
Caso	CD18-3	105,6	2,112
Caso	CD21	87,6	2,028
Caso	CD22	64,0	2,025
Caso	CD23	91,6	2,082
Caso	CD24	142,4	2,070
Controle	CC43	195,6	2,038
Controle	CC44	136,8	2,012
Controle	CC45	133,6	2,024
Controle	CC46	93,2	2,118
Controle	CC47	89,6	2,113
Controle	CC48	119,2	2,055

### II.2.3. Transcrição reversa e síntese de DNA complementar (*cDNA*)

As amostras de RNA total foram submetidas à transcrição reversa para síntese de *cDNA* utilizando-se o kit comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (*Applied Biosystems*). Em uma reação de volume final de 20  $\mu$ L, foram utilizados 1X de *Reverse Transcriptase (RT) Random Primers* (10X), 1X de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) Mix (100 mM) (25X), 50 unidades (U) da enzima *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* (50 U/ $\mu$ L), 1X de Tampão (10X), 20U de inibidor de *RNAse* (20 U/ $\mu$ L), 3,2  $\mu$ L de água tratada com *Diethylpyrocarbonate 9DEPC* (*Ambion®*) e 500 ng ou 1.000 ng de RNA total em volume de 10  $\mu$ L. Em termociclador, as reações foram submetidas a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos. As amostras de *cDNA* foram armazenadas a -20°C.

### II.2.4. Curva Padrão de quantificação dos genes *GAPDH* e *HPRT1*

Após a realização da reação de transcrição reversa foi realizada uma curva padrão de quantificação dos genes *GAPDH* (*gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase*) e *HPRT1* (*hipoxantina fosforribosil transferase*), para determinação da quantidade de *cDNA* alvo a ser utilizada na reação em cadeia da polimerase quantitativa (PCRq). Para tanto, foi utilizado um *pool* de amostras de *cDNA* com diluições seriadas nas concentrações de 50 ng, 25 ng, 12,5 ng, 6,25 ng e 3,125 ng. A quantificação foi feita em triplicata e em volume final de 10  $\mu$ l utilizando-se o *TaqMan® Gene expression Master Mix* 1X (*Applied Biosystems*) e, em reações individuais, os ensaios *TaqMan® Endogenous Control* 1X (*Applied Biosystems*) específicos para os genes *GAPDH* (número de catálogo 4333764F) e *HPRT1* (número de catálogo 4333768F), que contem os oligonucleotídeos iniciadores e a sonda *TaqMan® (Minor Groove Binding (MGB)* ligada ao fluoróforo *6-carboxy-fluoresceine (FAM)* específicos para amplificação e

detecção desses genes. As reações foram submetidas a 95°C por 10 minutos seguidos por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, no equipamento *StepOne Plus* (*Applied Biosystems*). Os valores brutos correspondentes ao ciclo de quantificação (Cq) foram gerados pelo programa *StepOne Software v2.3* (*Applied Biosystems*) após ajuste manual da linha de corte (*threshold*) para cada gene analisado. As médias das réplicas técnicas dos valores de Cq para cada concentração utilizada estão apresentadas no Quadro 5.

**Quadro 5.** Valores médios das réplicas técnicas correspondentes ao ciclo de quantificação (Cq) para cada concentração de amostra utilizada.

<b>Concentração (ng)</b>	<b><i>GAPDH</i></b>	<b><i>HPRT1</i></b>
50	22,654	26,971
25	24,923	29,024
12,5	25,898	30,014
6,25	26,249	30,223
3,125	26,755	30,785

De acordo com o teste realizado foi determinado que uma concentração de *cDNA* adequada para quantificação dos genes testados foi 12,5 ng e, portanto, essa concentração foi utilizada nos ensaios de quantificação dos genes do sistema inflamatório por PCRq realizados subsequentemente.

Considerando que a realização da curva padrão possibilita a avaliação da eficiência dos ensaios, foram obtidas eficiências próximas de 100% para ambos os genes avaliados (102,5% para *GAPDH* e 102% para *HPRT1*), o que indica que não há presença de inibidores de PCR no *pool* de amostras utilizado como consequência do processo de extração de RNA.

#### **II.2.4.1. Quantificação da expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória**

A análise de expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória foi realizada em duplicata, utilizando os kits comerciais *TaqMan® Array Plate Human Inflammation (Applied Biosystems)*, juntamente com o *TaqMan gene expression master mix (Applied Biosystems)*. O *TaqMan® Array Plate Human Inflammation* possibilita a avaliação de 92 genes associados a inflamação e 4 genes de referência (*18S*, *GAPDH*, *GUSB* e *HPRT1*). O painel de genes avaliados (Quadro 6) está envolvido em um amplo espectro de doenças inflamatórias e estes são pertencentes a quatro classes: canais (canal de cálcio do tipo L e canal de portão ligante), enzimas e inibidores (lipases, quinases, óxido nítrico sintetase, fosfodiesterases, metabolismo de prostaglandinas, proteases), fatores (fatores de necrose tumoral, fator nuclear Kappa-B, interleucina, anexina, quinonogênios) e receptores (GPCRs, família de receptor IL, moléculas de aderência, receptores TNF e nucleares). As reações de quantificação da expressão gênica foram realizadas de acordo com instruções do fabricante. Em cada “well” da

**Quadro 6.** Genes\* envolvidos na resposta inflamatória com ensaios incluídos no kit *TaqMan® Array Plate Human Inflammation* (*Applied Biosystems*) para análise de expressão gênica por PCRq.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	18S	GAPDH	HPRT1	GUSB	A2M	ADRB1	ADRB2	ALOX12	ALOX5	ANXA1	ANXA3	ANXA5
<b>B</b>	KLK3	BDKRB1	BDKRB2	CACNA1C	CACNA1D	CACNA2D1	CACNB2	CACNB4	CASP1	CD40	CD40LG	CES1
<b>C</b>	LTB4R	MAPK14	NR3C1	HPGD	*HRH1	HRH2	HTR3A	ICAM1	IL1R1	IL2RA	IL2RB	IL2RG
<b>D</b>	IL13	ITGAL	ITGAM	ITGB1	ITGB2	KLK1	KLK2	KLKB1	KNG1	LTA4H	LTC4S	MC2R
<b>E</b>	NFKB1	NOS2	PDE4A	PDE4B	PDE4C	PDE4D	PLA2G1B	PLA2G2A	PLA2G5	PLCB2	PLCB3	PLCB4
<b>F</b>	PLCD1	PLCG1	PLCG2	MAPK1	MAPK3	MAPK8	PTAFR	PTGDR	PTGER2	PTGER3	PTGFR	PTGIR
<b>G</b>	PTGIS	PTGS1	PTGS2	TBXA2R	TBXAS1	TNF	TNFRSF1A	TNFRSF1B	VCAM1	IL1R2	PLA2G7	PLA2G10
<b>H</b>	PLA2G4C	IL1RL1	HTR3B	TNFSF13B	CYSLTR1	HRH3	PLA2G2D	IL1RAPL2	KLK14	PLCE1	KLK15	LTB4R2

\*ver lista de descrição das abreviaturas dos genes no anexo 1

placa foi adicionado 12,5 ng de *cDNA*, 4,75  $\mu\text{L}$  de água tratada com DEPC (*Ambion*®) e 5  $\mu\text{L}$  de *Master Mix Gene Expression 2X*. A reação foi submetida ao equipamento *StepOne Plus (Applied Biosystems)* a 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os valores brutos de Cq foram calculados pelo programa *StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems)* após ajuste manual da linha de corte (*threshold*) para cada gene analisado.

### II.2.6. Análise estatística

As comparações das distribuições de sexo e idade entre os grupos de estudo foram realizadas pelos testes exato de Fischer e Mann Whitney, respectivamente, utilizando-se o programa *GraphPad Prism v. 5.01*.

Em relação à expressão gênica, as análises foram realizadas em linguagem estatística R<sup>(117)</sup> utilizando pacotes disponíveis gratuitos do projeto Bioconductor.<sup>(118)</sup> O pacote *High-throughput analysis and visualization of quantitative real-time PCR data in R (HTqPCR)*<sup>(119)</sup> foi utilizado para pré-processar os dados e como interface para outros pacotes utilizando como entrada os dados da PCRq.

Os dados foram filtrados e o valor de Cq igual a 37 foi utilizado como corte para indicar a detecção da expressão gênica, uma vez que, avaliando o histograma dos valores de expressão, observou-se uma distribuição normal dos dados de Cq até o valor de 37. Assim, marcadores com  $Cq < 37$  foram considerados expressos, enquanto aqueles com  $Cq \geq 37$  foram considerados não detectados. Distribuição normal dos dados foi obtida a partir dos valores médios de cada grupo (caso e controle) separadamente e os valores de Cq não pertencentes a 75% da massa central da curva foram considerados como não representativos do grupo (*outliers*) e removidos da análise. O mesmo

procedimento foi realizado considerando os dois grupos juntos (caso e controle), e valores de Cq não pertencentes a 60% da massa central da curva foram considerados como não confiáveis e então, removidos da análise. Os critérios de inclusão para considerar a análise estatística de um determinado gene como válido foi a sua expressão em pelo menos 60% de amostras biológicas em cada grupo. Posteriormente, os dados da expressão gênica foram normalizados pela aplicação do método de normalização *quantile*.<sup>(120,121)</sup>

A identificação dos genes diferencialmente expressos foi realizada utilizando modelos lineares para dados de *microarray*.<sup>(122)</sup> Com o objetivo de reduzir o risco de falsos positivos, os valores de p foram ajustados para múltiplos testes utilizando o método *Benjamini-Hochberg False Discovery Rate*,<sup>(123)</sup> adotando-se  $\alpha = 0,05$ . A expressão gênica do grupo caso foi expressa em relação à expressão do grupo controle (quantificação relativa ou *relative quantification*) (RQ).

### II.2.7. Análise funcional de genes diferencialmente expressos

A identificação dos processos biológicos mais representados entre os genes diferencialmente expressos em crianças com SD foi realizada utilizando-se o programa *The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v 6.7*,<sup>(124,125)</sup> que tem por objetivo extrair sistematicamente o significado biológico de uma lista de genes ou proteínas,<sup>(126)</sup> utilizando as bases de dados *Gene Ontology (GO)*, *Protein Analysis Through Evolutionary Relationships (PANTHER)* e *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEEG)*. Para a análise de associação dos genes diferencialmente expressos com as doenças foi executado o módulo de associação com doenças do *DAVID* utilizando os bancos de dados *Online Mendelian Inheritance in Man*

(*OMIM*) e *Genetic Association Database (GAD)*. Foram destacados os resultados significantes ( $p < 0,05$ ) após correção para múltiplos testes.<sup>(123)</sup>

### **III.RESULTADOS**

### III. RESULTADOS

#### III.1. Caracterização dos grupos

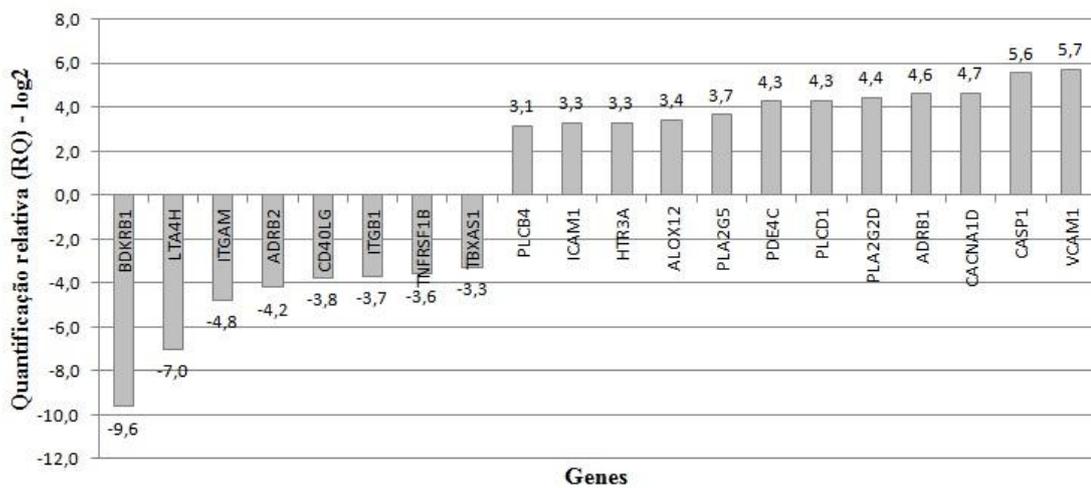
Os dados referentes à idade e sexo das crianças incluídas no estudo estão apresentados na Tabela 1. Não houve diferença significativa entre os grupos em relação à idade ( $p= 0,093$ ) e ao sexo ( $p= 0,080$ ).

**Tabela 1.** Comparação de dados referentes à idade e sexo das crianças incluídas no estudo entre os grupos caso e controle.

	Idade		Sexo		
	Média $\pm$ DP	Valor de $p^a$	Feminino n (%)	Masculino n (%)	Valor de $p^b$
<b>Caso</b>	3,78 $\pm$ 1,75	0,093	2 (33,33)	4 (66,67)	0,080
<b>Controle</b>	5,62 $\pm$ 0,90		5 (83,33)	1 (16,67)	

#### III.2. Expressão Gênica

Dos 92 genes associados com a inflamação investigados, 20 genes apresentaram expressão diferencial entre as crianças com SD e as crianças controle ( $P<0,05$ ) antes da correção para múltiplos testes, 12 com expressão aumentada e oito com expressão reduzida em crianças com SD (Figura 1, Tabela 2). Dos genes estudados, apenas o *Integrin, beta 2 (ITGB2)* está localizado no cromossomo 21, mas este gene não apresentou expressão diferencial entre os grupos.



**Figura 1.** Expressão relativa (RQ) dos 20 genes diferencialmente expressos ( $p < 0,05$ ) em crianças com Síndrome de Down em relação ao grupo controle (RQ  $\log_2=0$ ).

**Tabela 2.** Expressão gênica diferencial significativa em células mononucleares do sangue periférico entre crianças com e sem Síndrome de Down.

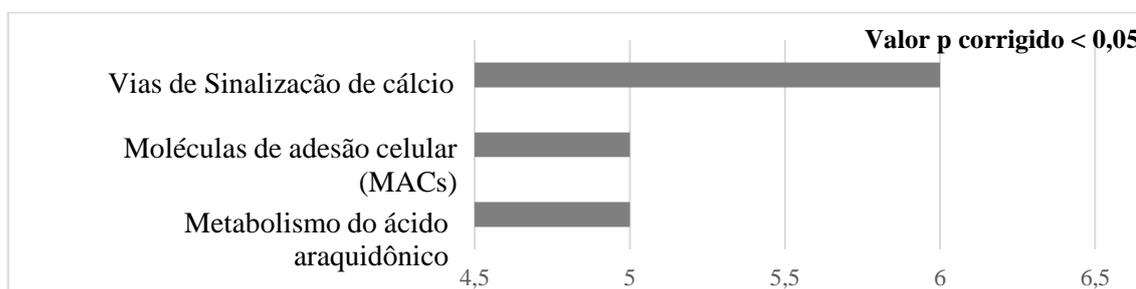
Gene	Gene ID <sup>1</sup>	Nome do Gene	Média de RQ	RQ log2	Valor de p
<i>BDKRB1</i>	623	<i>Bradykinin receptor B1</i>	0,0013	-6,9899	0,0003
<i>LTA4H</i>	4048	<i>Leukotriene A4 hydrolase</i>	0,0079	-9,6225	0,0005
<i>ITGAM</i>	3684	<i>Integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)</i>	0,0364	-4,2037	0,0144
<i>ADRB2</i>	154	<i>Adrenoceptor beta 2, surface</i>	0,0543	4,4190	0,0089
<i>CD40LG</i>	959	<i>CD40 ligand</i>	0,0737	4,6614	0,0151
<i>ITGB1</i>	3688	<i>Integrin, beta 1</i>	0,0779	3,4087	0,0399
<i>TNFRSF1B</i>	21938	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B</i>	0,0829	-3,7612	0,0258
<i>TBXAS1</i>	6916	<i>Thromboxane A synthase 1 (platelet)</i>	0,1032	-4,7811	0,0428
<i>PLCB4</i>	5332	<i>Phospholipase C, beta 4</i>	8,7676	5,7249	0,0443
<i>ICAM1</i>	3383	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>	9,7116	-3,5917	0,0268
<i>HTR3A</i>	3359	<i>5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A, ionotropic</i>	9,8319	3,2797	0,0343
<i>ALOX12</i>	239	<i>Arachidonate 12-lipoxygenase</i>	10,6198	4,3184	0,0171
<i>PLA2G5</i>	5322	<i>Phospholipase A2, group V</i>	12,5688	-3,6822	0,0423
<i>PDE4C</i>	5143	<i>Phosphodiesterase 4C, cAMP-specific</i>	19,2927	4,5983	0,0390
<i>PLCD1</i>	5333	<i>Phospholipase C, delta 1</i>	19,9510	3,2975	0,0449
<i>PLA2G2D</i>	26279	<i>Phospholipase A2, group IID</i>	21,3914	4,2700	0,0067
<i>ADRB1</i>	153	<i>Adrenoceptor beta 1</i>	24,2235	5,5589	0,0491
<i>CACNA1D</i>	12289	<i>Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit</i>	25,3055	3,6518	0,0125
<i>CASP1</i>	12362	<i>Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase</i>	47,1421	3,1322	0,0479
<i>VCAM1</i>	7412	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>	52,8885	-3,2768	0,0243

<sup>1</sup>Identificação do gene segundo base de dados Gene, do National Center for Biotechnology Information (NCBI – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>).

Após o ajuste estatístico para múltiplos testes, apresentaram expressão diferencial estatisticamente significante somente os genes *Bradikinin receptor B1* (*BDKRBI*) e *Leukotriene A4 hydrolase* (*LTA4H*), ambos com valor de  $p=0,0216$  e expressão reduzida em indivíduos com SD.

### III.3. Análise Funcional dos genes diferencialmente expressos

A análise das vias metabólicas dos 20 genes diferencialmente expressos nas crianças com SD, empregando a base de dados do *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (*KEEG*), agrupou esses genes em três vias. A via de sinalização de cálcio ocupou o primeiro lugar e envolveu seis genes. As duas outras vias, a de moléculas de adesão celular (MACs) e a do metabolismo do ácido araquidônico, envolveram cinco genes (Figura 2; Tabela 3). De acordo com esta ferramenta os genes *BDKRBI* e *LTA4H*, que apresentaram expressão diferencial estatisticamente significante, estão envolvidos nas vias de sinalização de cálcio e do metabolismo do ácido araquidônico, respectivamente (Tabela 3).



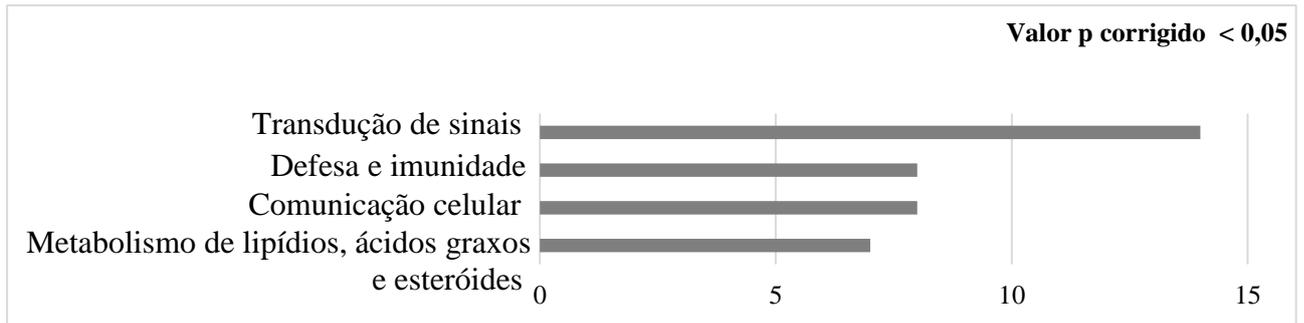
**Figura 2.** Vias metabólicas das quais os genes diferencialmente expressos em crianças com Síndrome de Down participam, segundo a base de dados *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (*KEEG*). O número de genes envolvido é indicado no eixo horizontal do gráfico.

**Tabela 3.** Vias metabólicas associadas aos genes alvos diferencialmente expressos em crianças com Síndrome de Down na categoria *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEEG)*.

<b>Doenças ou Vias metabólicas</b>	<b>Genes</b>	<b>Valor de p*</b>	<b>Ferramenta</b>
Vias de Sinalização de cálcio	<i>ADRB2, ADRB1, PLCB4, PLCD1, BDKRB1, CACNA1D</i>	0,0075	<i>KEEG</i>
Vias de Moléculas de adesão celular (MACs)	<i>VCAM1, ICAM1, CD40LG, ITGB1, ITGAM</i>	0,0179	<i>KEEG</i>
Metabolismo do ácido araquidônico	<i>TBXAS1, LTA4H, PLA2G2D, PLA2G5, ALOX12</i>	0,0019	<i>KEEG</i>

\*Corrigido pelo método *Benjamini-Hochberg False Discovery Rate*.

A análise das funções biológicas, dos 20 genes diferencialmente expressos, utilizando a base de dados do *Protein Analysis Through Evolutionary Relationships (PANTHER)* evidenciou quatro processos biológicos. A Transdução de sinais teve a participação do maior número de genes (14 genes). Dois outros processos, Defesa e imunidade e, comunicação celular, envolveram oito genes. A última categoria, metabolismo de lipídios, ácidos graxos e esteroides, teve a participação de sete genes (Figura 3; Tabela 4). De acordo com esta ferramenta o gene *BDKRD1* ocupou as categorias Transdução de sinais (primeira colocada) e comunicação celular, ao passo que o gene *LTA4H* participaram das categorias defesa e imunidade e, metabolismo de lipídios, ácidos graxos e esteroides (Tabela 4).



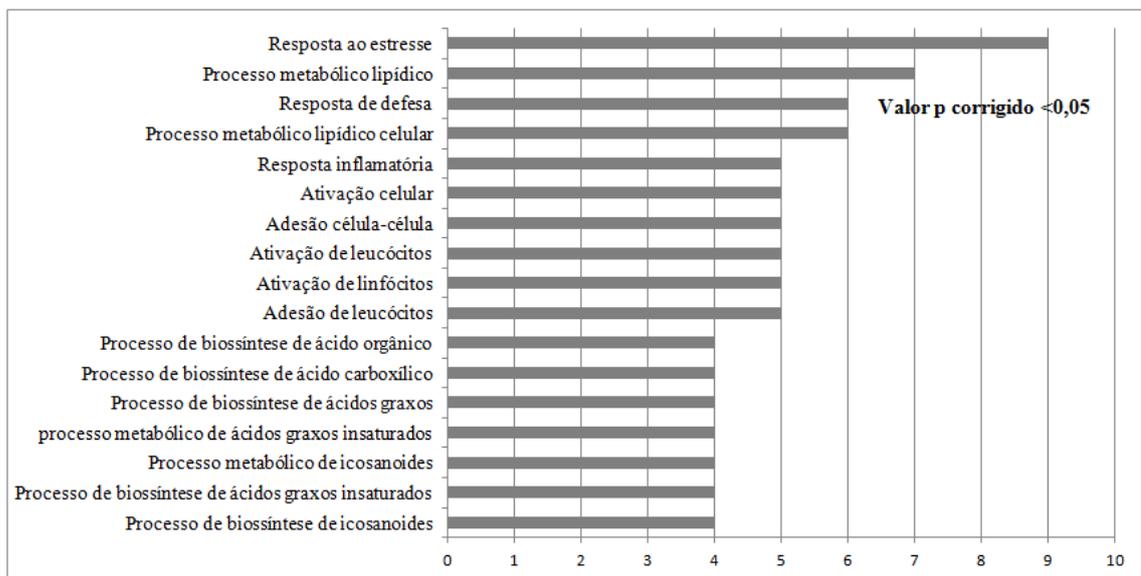
**Figura 3.** Processos biológicos dos quais os genes diferencialmente expressos em crianças com Síndrome de Down participam, segundo a base de dados *Protein Analysis Through Evolutionary Relationships (PANTHER)*. O número de genes envolvidos é indicado no eixo horizontal do gráfico.

**Tabela 4.** Processos biológicos significantes em relação aos genes alvos diferencialmente expressos em crianças com Síndrome de Down na categoria *Protein Analysis Through Evolutionary Relationships (PANTHER)*.

Processos biológicos	Genes	Valor de p*	Ferramenta
Transdução de sinais	<i>ICAM1, BDKRB1, PDE4C, ITGB1, VCAM1, ADRB2, TNFRSF1B, PLCB4, ADRB1, CD40LG, PLCD1, HTR3A, PLA2G2D, PLA2G5</i>	0,0047	<i>PANTHER</i>
Defesa e imunidade	<i>ICAM1, TNFRSF1B, ADRB1, TBXAS1, CD40LG, LTA4H, ITGB1, ALOX12</i>	0,0170	<i>PANTHER</i>
Comunicação celular	<i>VCAM1, ICAM1, ADRB2, ADRB1, CD40LG, BDKRB1, HTR3A, ITGB1</i>	0,0140	<i>PANTHER</i>
Metabolismo de lipídios, ácidos graxos e esteróides	<i>TBXAS1, PLCB4, PLCD1, LTA4H, PLA2G2D, PLA2G5, ALOX12</i>	0,0110	<i>PANTHER</i>

\*Corrigido pelo método *Benjamini-Hochberg False Discovery Rate*.

A análise pela base de dados *GO* evidenciou 17 processos biológicos, dos quais a resposta ao estresse ocupou o primeiro lugar, envolvendo nove genes (Figura 4), dentre eles o *BDKRBI* e o *LTA4H* (Tabela 5). Esses genes também participaram das categorias, resposta de defesa e resposta inflamatória. Além dessas, o gene *LTA4H*, participou de outras nove categorias, todas envolvendo processos metabólicos de lipídios e ácidos graxos (Tabela 5).



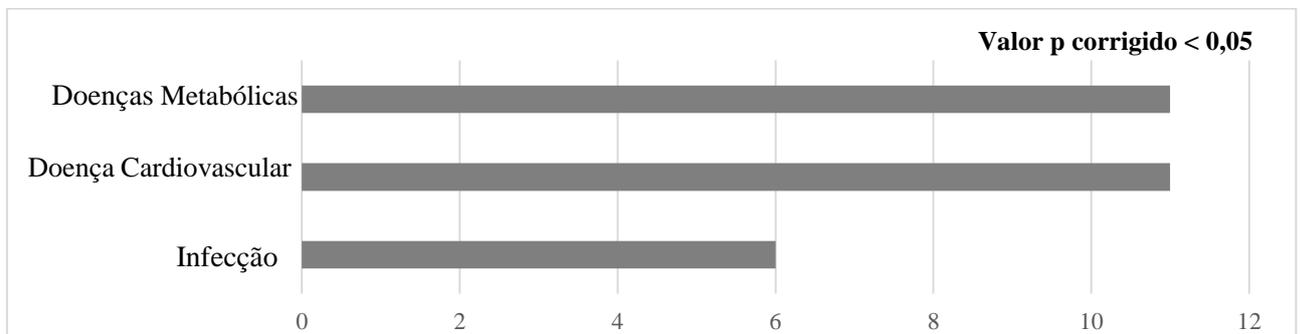
**Figura 4.** Processos biológicos dos quais os genes diferencialmente expressos em crianças com Síndrome de Down participam, segundo a base de dados *Gene Ontology (GO)*. O número de genes envolvidos é indicado no eixo horizontal do gráfico.

**Tabela 5.** Processos biológicos significantes em relação aos genes alvos diferencialmente expressos em crianças com Síndrome de Down na categoria dados *Gene Ontology (GO)*.

<b>Processos biológicos</b>	<b>Genes</b>	<b>Valor de p*</b>	<b>Ferramenta</b>
Reposta ao stress	<i>ADRB2, TNFRSF1B, ADRB1, CD40LG, BDKRB1, LTA4H, CASP1, PLA2G2D, ITGB1</i>	0,0417	GO
Processo metabólico lipídico	<i>TBXAS1, PLCB4, PLCD1, LTA4H, PLA2G2D, PLA2G5, ALOX12</i>	0,0328	GO
Resposta de defesa	<i>TNFRSF1B, CD40LG, BDKRB1, LTA4H, PLA2G2D, ITGB1</i>	0,0461	GO
Processo metabólico lipídico celular	<i>TBXAS1, PLCD1, LTA4H, PLA2G2D, PLA2G5, ALOX12</i>	0,0286	GO
Resposta inflamatória	<i>TNFRSF1B, CD40LG, BDKRB1, LTA4H, PLA2G2D</i>	0,0402	GO
Ativação celular	<i>VCAM1, ICAM1, CD40LG, ITGB1, ITGAM</i>	0,0299	GO
Adesão célula-célula	<i>VCAM1, ICAM1, CD40LG, ITGB1, ITGAM</i>	0,0315	GO
Ativação de leucócitos	<i>VCAM1, ICAM1, CD40LG, ITGB1, ITGAM</i>	0,0216	GO
Ativação de linfócitos	<i>VCAM1, ICAM1, CD40LG, ITGB1, ITGAM</i>	0,0137	GO
Adesão de leucócitos	<i>VCAM1, ICAM1, CD40LG, ITGB1, ITGAM</i>	0,0000	GO
Processo biossintético de ácidos orgânicos	<i>TBXAS1, LTA4H, PLA2G5, ALOX12</i>	0,0443	GO
Processo biossintético de ácidos carboxílicos	<i>TBXAS1, LTA4H, PLA2G5, ALOX12</i>	0,0443	GO
Processo biossintético de ácidos graxos	<i>TBXAS1, LTA4H, PLA2G5, ALOX12</i>	0,0143	GO
Processo metabólico de ácidos graxos insaturados	<i>TBXAS1, LTA4H, PLA2G5, ALOX12</i>	0,0054	GO
Processo metabólico de icosanóides	<i>TBXAS1, LTA4H, PLA2G5, ALOX12</i>	0,0053	GO
Processo biossintético de ácidos graxos insaturados	<i>TBXAS1, LTA4H, PLA2G5, ALOX12</i>	0,0026	GO
Processo biossintético de icosanóides	<i>TBXAS1, LTA4H, PLA2G5, ALOX12</i>	0,0030	GO

\*Corrigido pelo método *Benjamini-Hochberg False Discovery Rate*.

A análise da associação dos 20 genes diferencialmente expressos com doenças, utilizando a base de dados *Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)* e *Genetic Association Database (GAD)* identificou três classes de doenças. As doenças metabólicas e Cardiovasculares tiveram a participação de 11 genes e, infecção englobou seis genes (Figura 5; Tabela 6).



**Figura 5.** Associação genética dos genes diferencialmente expressos em crianças com Síndrome de Down com doenças, segundo as bases de dados *Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)* e *Genetic Association Database (GAD)*. O número de genes envolvidos é indicado no eixo horizontal do gráfico.

**Tabela 6.** Doenças associadas aos genes alvos diferencialmente expressos em crianças com Síndrome de Down de acordo com as bases de dados *Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)* e *Genetic Association Database (GAD)*.

<b>Doenças ou Vias metabólicas</b>	<b>Genes</b>	<b>Valor de p*</b>	<b>Ferramenta</b>
Doenças metabólicas	<i>VCAM1, ICAM1, ADRB2, TNFRSF1B, ADRB1, BDKRB1, HTR3A, PLA2G2D, CACNA1D, PLA2G5, ALOX12</i>	0,0149	<i>OMIM/GAD</i>
Doenças Cardiovasculares	<i>VCAM1, ICAM1, ADRB2, TNFRSF1B, ADRB1, CD40LG, BDKRB1, LTA4H, CASP1, ITGB1, ALOX12</i>	0,0049	<i>OMIM/GAD</i>
Infecção	<i>VCAM1, ICAM1, ADRB2, TNFRSF1B, CD40LG, CASP1</i>	0,0653	<i>OMIM/GAD</i>

\*Corrigido pelo método *Benjamini-Hochberg False Discovery Rate*.

## **IV.DISSCUSSÃO**

#### IV. DISCUSSÃO

O desequilíbrio na expressão gênica causado pela presença de genes extras do cromossomo 21 e a influência exercida pelos produtos destes em outros genes dissômicos ou na atividade de proteínas específicas são as possíveis explicações para a correlação existente entre a trissomia do cromossomo 21 e o desenvolvimento do fenótipo da SD.<sup>(5,127)</sup>

Estudos de transcriptomas em larga escala em SD têm sido realizados em diferentes tipos celulares, tais como os leucócitos,<sup>(49)</sup> tecido cerebral adulto,<sup>(128)</sup> PBMCs,<sup>(58)</sup> linhagens linfoblásticas celulares,<sup>(129)</sup> e fibroblastos fetais<sup>(130)</sup> e evidenciam alteração na expressão de múltiplos genes localizados ao longo do genoma, reforçando a hipótese do efeito secundário de genes trissômicos na expressão dos dissômicos com conseqüentes alterações em vias metabólicas, resultando em disfunção celular.<sup>(5,6,131)</sup>

No presente estudo, dos 92 genes avaliados, apenas o gene *ITGB2* está localizado no cromossomo 21 e não apresentou expressão diferencial entre os grupos de crianças com SD e sem a síndrome. Embora este achado não corrobore com estudos prévios, realizados em indivíduos com SD<sup>(132,133,134)</sup> e em modelos animais trissômicos<sup>(135,136,137)</sup> que mostraram um aumento de 50% na expressão dos genes em triplicata, nosso resultado pode ser explicado pela existência de mecanismos regulatórios de “compensação” para a dosagem gênica. A restauração da expressão dos genes trissômicos a níveis semelhantes aos dissômicos foi sugerida em estudos com indivíduos com SD<sup>(138)</sup> e modelos animais da síndrome.<sup>(139,140)</sup> Além disso, há evidências de padrão diferencial de metilação do DNA<sup>(141)</sup> e de expressão alterada de

microRNAs em diferentes tecidos<sup>(142,143)</sup> de indivíduos com SD que reforçam esta hipótese.

Dos 20 genes diferencialmente expressos em células mononucleares do sangue periférico de crianças com SD deste estudo, 12 apresentaram expressão aumentada (*PLA2G2D*, *CACNA1D*, *ALOX12*, *VCAM1*, *ICAM1*, *PLCD1*, *ADRB1*, *HTR3A*, *PDE4C*, *CASP1*, *PLA2G5* e *PLCB4*) e oito com expressão reduzida (*LTA4H*, *BDKRB1*, *ADRB2*, *CD40LG*, *ITGAM*, *TNFRSF1B*, *ITGB1* e *TBXAS1*). Estes genes estão localizados em cromossomos dissômicos e apresentaram, em sua maioria, valores expressivos de RQ, ao contrário de estudos prévios de expressão gênica<sup>(51,144)</sup> que mostram que a trissomia do 21 induz, em geral, uma sutil alteração global de genes distribuídos ao longo do genoma. É possível que esta divergência possa ser decorrente do tecido avaliado, do tamanho amostral e de fatores experimentais tais como plataformas de *array*, manipulação de tecidos, método de isolamento de RNA e processo de hibridação.<sup>(42)</sup> Além disso, os estudos utilizam metodologias com sensibilidade diferentes (*SAGE*, *microarray*, PCRq) para avaliação da expressão gênica<sup>(144)</sup>.

A análise funcional, pela ferramenta *KEEG*, evidenciou que os genes *BDKRB1* e *LTA4H*, que apresentaram expressão reduzida, estatisticamente significativa, em crianças com SD, após o ajuste estatístico para múltiplos testes, estão envolvidos nas vias de sinalização de cálcio e do metabolismo do ácido araquidônico, respectivamente. O gene *BDKRB1* é um receptor de cininas B1, acoplado à proteína G. As proteínas G, no estado inativo, encontram-se acopladas a receptores no meio intracelular e, graças a propriedades funcionais e estruturais, quando ativadas por estímulos adequados podem migrar para o citosol e ativar canais iônicos, ativando a transdução de sinais.<sup>(145)</sup> O

aumento na concentração de íons de cálcio citosólicos pode resultar em respostas inflamatórias crônicas e agudas.<sup>(146)</sup>

O receptor *BDKRB1* liga-se especificamente a bradicinina, um peptídeo de nove aminoácidos gerado em condições fisiopatológicas tais como inflamação. Este receptor é sintetizado após lesão do tecido<sup>(146)</sup> e sua indução está envolvida com a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6,<sup>(147,148)</sup> migração de neutrófilo e ativação de diversas vias de sinalização celular.<sup>(149)</sup> Vários estudos têm evidenciado a indução e/ou aumento de expressão de *BDKRB1* em diversos estados patológicos, incluindo infecção,<sup>(150)</sup> alergia,<sup>(151)</sup> artrite,<sup>(152)</sup> câncer,<sup>(153)</sup> dor crônica e inflamação,<sup>(154,147)</sup> diabetes melitus<sup>(155)</sup> e distúrbios neurológicos tais como epilepsia, acidente vascular cerebral, esclerose múltipla<sup>(156)</sup> e doença de Alzheimer (DA).<sup>(157)</sup>

Na DA, uma doença de manifestação precoce em indivíduos com SD,<sup>(13)</sup> a indução de *BDKRB1* parece contribuir com a neuroinflamação.<sup>(158)</sup> Recentemente, esta hipótese tem sido reforçada no estudo de Lacoste *et al.*<sup>(157)</sup> Esses autores encontraram aumento nos níveis da proteína do *BDKRB1* no hipocampo de camundongos mutados com APP (*amyloid precursor protein*), associada com formação de placas beta-amilóide e deficiência de memória e demonstraram que o bloqueio crônico de *BDKRB1* melhorou significativamente o desempenho de aprendizagem e memória, a função vascular cerebral, assim como diversas alterações anatomopatológicas da DA observada nestes camundongos.

Em nosso estudo, poderíamos especular que as crianças do presente estudo estariam protegidas da neuroinflamação, uma vez que a expressão de *BDKRB1* foi reduzida, entretanto, somente um seguimento em longo prazo desses indivíduos poderia nos fornecer informações quanto ao desenvolvimento ou não da DA.

Outro aspecto relevante é que a expressão do gene *BDKRBI* é induzida em estados patológicos, incluindo infecção, como referido anteriormente. Considerando que indivíduos com a SD apresentam uma maior frequência de infecção poderíamos esperar um aumento na expressão desse gene no grupo de crianças com SD do presente estudo. Entretanto, um dos critérios de exclusão foi ausência de manifestações clínicas sugestivas de infecção aguda e ausência de infecção crônica, portanto, é possível sugerir que os indivíduos com a SD possam apresentar um nível de expressão basal menor em relação aqueles sem a síndrome, e que em processos infecciosos, mesmo com o aumento de expressão do gene *BDKRBI* as vias de produção de citocinas, migração de neutrófilo e ativação de diversas vias de sinalização celular estariam comprometidas e os mecanismos envolvidos nos processos de infecção/inflamação seriam menos eficientes.

O gene *LTA4H* também apresentou expressão reduzida, estatisticamente significativa, nas crianças SD do presente estudo, após correção para múltiplos testes. A proteína codificada por este gene é uma metaloenzima de zinco bifuncional que converte leucotrieno A4 (LTA4) em leucotrieno B4 (LTB4).<sup>(159)</sup> O LTA4 também pode se associar com glutatona reduzida, por meio da sintase LTC4, para produzir LTC4. Ambos, LTB4 e LTC4, participam do metabolismo extracelular no qual o LTC4 é convertido em LTD4, que por hidrólise de aminoácidos sequenciais, resulta na produção de LTE4.<sup>(160)</sup> Os leucotrienos (LTs) são potentes mediadores lipídicos eicosanoides que atuam em diversas reações inflamatórias e alérgicas, principalmente as do sistema respiratório. São os principais produtos do metabolismo do ácido araquidônico, os quais são produzidos pelas células inflamatórias como leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e mastócitos.<sup>(160)</sup>

O LTB<sub>4</sub>, em especial, é um potente mediador lipídico pró-inflamatório sintetizado pelas células do sistema imunológico e estimula a produção de várias citocinas, implicadas nas doenças inflamatórias crônicas como doença inflamatória do intestino,<sup>(161)</sup> inflamação neutrofílica pulmonar crônica,<sup>(162)</sup> artrite,<sup>(163)</sup> e asma.<sup>(164)</sup> Pode desempenhar um papel no recrutamento de células inflamatórias para o local da lesão tecidual.<sup>(160)</sup> Assim, a expressão alterada do gene *LTA4H* observada no presente estudo, sugere que os indivíduos com SD possam apresentar um mecanismo menos eficiente de produção de leucotrienos comprometendo as respostas inflamatórias.

Também foram utilizadas as ferramentas *PANTHER* e *GO* com o intuito de explorar as funções biológicas dos 20 genes diferencialmente expressos, nas crianças com SD. Os resultados obtidos mostraram que, de acordo com a base de dados GO o gene *BDKRBI* esteve envolvido nas respostas ao estresse, defesa e de inflamação. Ao passo que, pela ferramenta *PANTHER*, este gene participou do processo de transdução de sinais e comunicação celular. Os mecanismos transdução de sinais envolvidos na ligação com receptores de antígenos em células B e T requerem um conjunto de interações altamente coordenadas de proteínas transmembrânicas e citosólicas. Tem sido sugerido que alterações nos eventos de sinalização das células T, em resposta a agentes mitogênicos, podem resultar em proliferação anormal de linfócitos de indivíduos com SD.<sup>(165)</sup> Em estudo de larga escala, utilizando a técnica de SAGE, em linfócitos trissômicos para o cromossomo 21 identificou-se vários transcritos com expressão reduzida que codificam proteínas envolvidas na sinalização de receptores de células B e T.<sup>(51)</sup>

Em relação ao gene *LTA4H*, a ferramenta *PANTHER* evidenciou seu envolvimento nos processos de defesa e imunidade e do metabolismo de lipídios, ácidos

graxos e esteroides. Enquanto que pela base de dados *GO*, este gene participou dos processos biológicos de respostas ao stress, de defesa e de inflamação. Esses processos estão diretamente relacionados ao sistema imune, suportando a hipótese de que a deficiência imunológica apresentada pelos indivíduos com SD pode ser decorrente da alteração de expressão de múltiplos genes dissômicos, incluindo *BDKRB1* e *LTA4H*, que afetariam múltiplas vias envolvidas nesse sistema.<sup>(41,42)</sup>

Vale também ressaltar a via de moléculas de adesão celular (MACs), evidenciada pela base de dados *KEEG*, envolvendo os genes *VCAMI*, *ICAMI*, *CD40LG*, *ITGB1* e *ITGAM*. Apesar desses genes não apresentarem expressão diferencial estatisticamente significativa, após ajuste estatístico para múltiplos testes, tiveram grande participação em diferentes processos biológicos, como evidenciado pelas ferramentas *PANTHER* e *GO*. Além disso, esses cinco genes participaram dos processos de ativação celular, adesão célula-célula, ativação de leucócitos, ativação de linfócitos e adesão de leucócitos.

Os genes *VCAMI* e o *ICAMI* apresentaram expressão aumentada em crianças com SD. Estes genes são intimamente relacionados quanto à estrutura e função e, codificam glicoproteínas de superfície celular expressa em células endoteliais ativado por citocinas. Essas glicoproteínas são ligantes para integrinas que participam da adesão de leucócito ao endotélio<sup>(166,167,168)</sup> e tem importante papel na transdução de sinais, principalmente nas vias próinflamatória, promovendo o recrutamento de células imunes inflamatórias como macrófagos e granulócitos.<sup>(169)</sup> Um exemplo desse processo é o recrutamento de leucócitos mononucleares para as lesões vasculares, observadas no estágio inicial da aterosclerose, pela expressão endotelial de *VCAM1*.<sup>(170)</sup>

O *ICAM1* se liga as integrinas do tipo CD11, conhecido como Antígeno-1 associado à função do linfócito (LFA-1),<sup>(167)</sup> um receptor encontrado nos leucócitos.<sup>(171)</sup> Quando ativados, pela via ICAM-1/LFA-1, os leucócitos ligam-se às células endoteliais e migram para dentro dos tecidos, promovendo uma resposta inflamatória.<sup>(172)</sup> O *ICAM1* também tem importante papel na transdução de sinais, como evidenciado pela ferramenta *PANTHER*, principalmente nas vias pró-inflamatórias, promovendo o recrutamento de células imunes inflamatórias como os macrófagos e granulócitos<sup>(169)</sup>. Em virtude de seu papel na indução do processo proinflamatório, a proteína ICAM1, em condições normais, ocorre em baixas concentrações na membrana dos leucócitos e células endoteliais.<sup>(169)</sup> Portanto, sua expressão aumentada, como detectada no presente estudo, pode ser o responsável pelos altos índices de infecções observadas nas crianças com SD.

Lin *et al.*<sup>(173)</sup> em um ensaio de adesão celular, com a proteína recombinante ICAM-1, mostraram expressão aumentada do LFA-1 em linfócitos de pacientes com SD e menor adesão destas células em comparação com os controles sem a síndrome. Alterações na função do LFA-1 podem comprometer a ativação e maturação de linfócitos.<sup>(169)</sup> Estes resultados sugerem que os processos patológicos mais generalizados, tais como senescência precoce do sistema imunológico ou ativação ineficaz de linfócitos, e subsequente disfunção da integrina pode constituir a base das deficiências imunológicas em pacientes com SD.

No presente estudo o gene *CD40LG* mostrou expressão reduzida em crianças com SD, confirmando dados da literatura, conforme observado em estudos realizados por Letourneau *et al.*<sup>(130)</sup> e Zampieri *et al.*<sup>(42)</sup> em fibroblastos fetais de gêmeos monozigóticos e em PMBCs de crianças SD, respectivamente. A proteína codificada

pelo gene *CD40LG*, um ligante do receptor CD40, é expressa na superfície das células T e regula a função das células B. A interação CD40 e seu ligante ativam uma sinalização pró-inflamatória.<sup>(103)</sup> Alterações na via de sinalização CD40/CD40LG levam a uma imunodeficiência congênita, caracterizada por níveis baixos/ausentes de IgG e IgA, linfócitos B circulantes normais e aumento de IgM.<sup>(175)</sup>

O gene *ITGB1* e o gene *ITGAM* foram encontrados com expressão reduzida nas crianças com SD em nosso estudo. O gene *ITGB1* codifica um receptor de membrana envolvido na adesão celular<sup>(72)</sup> e alterações em sua expressão pode ter um impacto na via de regulação da actina que compõe o citoesqueleto o qual está implicado no crescimento, sobrevivência e motilidade celular.<sup>(176,177)</sup> De fato, tem sido demonstrado que o número de linfócitos totais é menor em crianças com SD em relação aquelas sem a síndrome.<sup>(23)</sup> Além disso, a maturação de linfócitos é prejudicada nestes indivíduos.<sup>(22)</sup> O gene *ITGAM* codifica a cadeia alfa M da integrina. Este domínio, contendo integrina alfa, combina com a cadeia beta 2 (*ITGB2*) para formar uma integrina específica de leucócitos designada como receptor de macrófagos 1 (Mac - 1). O alfa M da integrina beta- 2 é importante na aderência de neutrófilos e monócitos ao endotélio estimulado, e também na fagocitose de partículas revestidas do complemento.<sup>(178)</sup>

Anormalidades na diferenciação, maturação e ativação de linfócitos T e, linfocitopenia, tem sido relatadas em indivíduos com SD, resultando em um sistema imunológico deficiente.<sup>(21-24)</sup> Além disso, um aumento de adesão celular foi observado em linhagem de linfócitos provenientes de indivíduos com SD em função da expressão aumentada da integrina LFA-1 (*lymphocytefunctional antigen-1*)<sup>(179)</sup> contribuindo para essa deficiência.

Embora estudos adicionais sejam necessários para melhor compreensão da contribuição dos genes diferencialmente expressos nos indivíduos com SD em relação àqueles sem a síndrome do presente estudo, a expressão alterada de vários genes do presente estudo, em especial *BDKRB1* e *LTA4H*, considerando suas funções na resposta inflamatória, sugere um papel relevante dos mesmos na patogênese da SD.

## **V.CONCLUSÃO**

## **V. CONCLUSÃO**

1. Crianças com SD apresentam expressão diferencial de genes não localizados no cromossomo 21, em PBMCs, em relação a crianças sem a síndrome.
2. A expressão alterada de múltiplos genes dissômicos em PBMCs de indivíduos com SD pode afetar processos biológicos envolvidos na resposta inflamatória, tais como ativação e adesão de leucócitos, ativação de linfócitos, adesão e comunicação celular, transdução de sinais, vias de sinalização de cálcio e metabolismo do ácido araquidônico.

## **VI.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## **VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Jones KL. Smith Padrões Reconhecíveis de Malformações Congênitas. 6<sup>a</sup>. Edição. Rio de Janeiro: Editora Elsevier; 2007. p.7.
2. Jyothy A, Kumar KS, Mallikarjuna GN, Babu Rao V, Uma Devi B, Sujatha M, et al. Parental age and the origin of extra chromosome 21 in Down syndrome. *J Hum Genet* 2001;46:347-50.
3. Ahmed I, Ghafoor T, Samore NA, Chattha MN. Down syndrome: clinical and cytogenetic analysis. *J Coll Physicians Surg Pak* 2005;15:426-9.
4. Biselli JM, Goloni-Bertollo EM, Ruiz MT, Pavarino-Bertelli EC. Cytogenetic profile of Down syndrome cases seen by a general genetics outpatient service in Brazil. *Down's syndrome, research and practice* 2008;12.
5. Antonarakis SE, Lyle R, Chrast R, Scott HS. Differential gene expression studies to explore the molecular pathophysiology of Down syndrome. *Brain Res Brain Res Rev* 2001;36:265-74.
6. FitzPatrick DR. Transcriptional consequences of autosomal trisomy: primary gene dosage with complex downstream effects. *Trends Genet* 2005;21:249-53.
7. Chou CY, Liu LY, Chen CY, Tsai CH, Hwa HL, Chang LY, et al. Gene expression variation increase in trisomy 21 tissues. *Mamm Genome*. 2008;19(6):398-405.
8. Gillespie KM, Dix RJ, Williams AJ, Newton R, Robinson ZF, Bingley PJ, et al. Islet autoimmunity in children with Down's syndrome. *Diabetes* 2006;55:3185-8.
9. Murphy J, Philip M, Macken S, Meehan J, Roche E, Mayne PD, et al. Thyroid dysfunction in Down's syndrome and screening for hypothyroidism in children

- and adolescents using capillary TSH measurement. *J Pediatr Endocrinol Metab.*2008; 21(2):155-63.
10. Creavin AL, Brown RD. Ophthalmic abnormalities in children with Down syndrome. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus.* 2009;46(2):76-82.
  11. Stirn Kranjc B. Ocular abnormalities and systemic disease in Down syndrome. *Strabismus.* 2012;20(2):74-7.
  12. Weijerman ME, van Furth AM, van der Mooren MD, van Weissenbruch MM, Rammeloo L, Broers CJ, et al. Prevalence of congenital heart defects and persistent pulmonary hypertension of the neonate with Down syndrome. *Eur J Pediatr* 2010;169(10):1195-9.
  13. Wilcock DM, Griffin WS. Down's syndrome, neuroinflammation, and Alzheimer neuropathogenesis. *J Neuroinflammation* 2013;10:84.
  14. Seewald L, Taub JW, Maloney KW, McCabe ER. Acute leukemias in children with Down syndrome. *Mol Genet Metab* 2012;107(1-2):25-30.
  15. Kusters MA, Verstegen RH, Gemen EF, de Vries E. Intrinsic defect of the immune system in children with Down syndrome: a review. *Clin Exp Immunol.* 2009 May;156(2):189-93.
  16. Bloemers BL, Broers CJ, Bont L, Weijerman ME, Gemke RJ, van Furth AM. Increased risk of respiratory tract infections in children with Down syndrome: the consequence of an altered immune system. *Microbes Infect.* 2010 Oct;12(11):799-808.
  17. Broers CJ, Gemke RJ, Weijerman ME, Kuik DJ, van Hoogstraten IM, van Furth AM. Frequency of lower respiratory tract infections in relation to adaptive

immunity in children with Down syndrome compared to their healthy siblings. *Acta Paediatr.* 2012 Aug;101(8):862-7.

18. Pellegrini FP, Marinoni M, Frangione V, Tedeschi A, Gandini V, Ciglia F, et al. Down syndrome, autoimmunity and T regulatory cells. *Clin Exp Immunol.* 2012 Sep;169(3):238-43.
19. Bloemers BL, Bont L, de Weger RA, Otto SA, Borghans JA, Tesselaar K. Decreased thymic output accounts for decreased naive T cell numbers in children with Down syndrome. *J Immunol.* 2011;186(7):4500-7.
20. Karl K, Heling KS, Sarut Lopez A, Thiel G, Chaoui R. Thymic-thoracic ratio in fetuses with trisomy 21, 18 or 13. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2012;40(4):412-7.
21. Roat E, Prada N, Lugli E, Nasi M, Ferraresi R, Troiano L, et al. Homeostatic cytokines and expansion of regulatory T cells accompany thymic impairment in children with Down syndrome. *Rejuvenation Res.* 2008;11(3):573-83.
22. Guazzarotti L, Trabattoni D, Castelletti E, Boldrighini B, Piacentini L, Duca P, et al. T lymphocyte maturation is impaired in healthy young individuals carrying trisomy 21 (Down syndrome). *Am J Intellect Dev Disabil* 2009;114:100-9.
23. Gemen EF, Verstegen RH, Leuvenink J, de Vries E. Increased circulating apoptotic lymphocytes in children with Down syndrome. *Pediatr Blood Cancer.* 2012 Dec 15;59(7):1310-2.
24. Lorenzo LP, Shatynski KE, Clark S, Yarowsky PJ, Williams MS. Defective thymic progenitor development and mature T-cell responses in a mouse model for Down syndrome. *Immunology.* 2013;139(4):447-58.

25. Trotta, MBF. Mecanismos inflamatórios e imunológicos na síndrome de Down [Tese]. São Paulo (SP): Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.; 2009.
26. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007;45(2):27-37.
27. Janeway CA, Travers PJr, Hunt S, Walport M. *Immuno Biology: The immune system in health and disease.* 5<sup>a</sup> ed. London: Current Biology, 2001. p. 13-38.
28. Sack, K. E. & Fye, K.H. Doenças Reumáticas. In: Stites, D.P., Terr, A.I., Parslow, T.G. *Imunologia Médica.* 9<sup>a</sup> edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2000. p. 353-70,.
29. Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Cytokines and pain. *Rev Bras Anesthesiol.* 2011;61(2):255-9, 260-5, 137-42.
30. Curfs JH, Meis JF, Hoogkamp-Korstange JA – A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev,* 1997;10:742-780.
31. Boren E, Gershwin ME. Inflamm-aging: autoimmunity, and the immune-risk phenotype. *Autoimmun Rev.* 2004;3(5):401-6.
32. Henson SM, Pido-Lopez J, Aspinall R. Reversal of thymic atrophy. *Exp Gerontol.* 2004;39(4):673-8.
33. Prelog M. Aging of the immune system: a risk factor for autoimmunity? *Autoimmun Rev.* 2006;5(2):136-9.
34. Murphy M, Friend DS, Pike-Nobile L, Epstein LB. Tumor necrosis factor-alpha and IFN-gamma expression in human thymus. Localization and overexpression in Down syndrome (trisomy 21). *J Immunol.* 1992;149(7):2506-12.

35. Tsilingaridis G, Yucel-Lindberg T, Modéer T. T-helper-related cytokines in gingival crevicular fluid from adolescents with Down syndrome. *Clin Oral Investig.* 2012;16(1):267-73.
36. Cetiner S, Demirhan O, Inal TC, Tastemir D, Sertdemir Y. Analysis of peripheral blood T-cell subsets, natural killer cells and serum levels of cytokines in children with Down syndrome. *Int J Immunogenet.* 2010;37(4):233-7.
37. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cytokines. 5<sup>a</sup> ed. Elsevier, Philadelphia, PA, USA; 2005. p. 243–74.
38. Broers CJ, Gemke RJ, Weijerman ME, van der Sluijs KF, van Furth AM. Increased pro-inflammatory cytokine production in Down Syndrome children upon stimulation with live influenza A virus. *J Clin Immunol.* 2012;32(2):323-9.
39. Broers CJ, Gemke RJ, Morré SA, Weijerman ME, van Furth AM. Increased production of interleukin-10 in children with Down syndrome upon ex vivo stimulation with *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatr Res.* 2014;75(1-1):109-13.
40. Nateghi Rostami M, Douraghi M, Miramin Mohammadi A, Nikmanesh B. Altered serum pro-inflammatory cytokines in children with Down's syndrome. *Eur Cytokine Netw.* 2012;23(2):64-7.
41. Lima FA, Moreira-Filho CA, Ramos PL, Brentani H, Lima Lde A, Arrais M, et al. Decreased AIRE expression and global thymic hypofunction in Down syndrome. *J Immunol.* 2011;187(6):3422-30.
42. Zampieri BL, Biselli-Périco JM, de Souza JE, Bürger MC, Silva Júnior WA, Goloni-Bertollo EM, et al. Altered expression of immune-related genes in children with Down syndrome. *PLoS One.* 2014;9(9):e107218.

43. The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. HLA-DRB3 major histocompatibility complex, class II, DR beta 3 [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3125>.
44. Giannone S, Strippoli P, Vitale L, Casadei R, Canaider S, Lenzi L, et al. Gene Expression Profile Analysis in Human T Lymphocytes from Patients with Down Syndrome. *Ann Hum Genet* 2004;68:546-54.
45. The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. GABRG2 gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, gamma 2 [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2566>.
46. The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. SOD1 superoxide dismutase 1, soluble [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6647>.
47. The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. UCHL1 ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase) [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7345>.
48. The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. GTF3A general transcription factor IIIA [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2971>.

49. Malagó W Jr, Sommer CA, Del Cistia Andrade C, Soares-Costa A, Abrao Possik P, Cassago A, et al. Gene expression profile of human Down syndrome leukocytes. *Croat Med J.* 2005;46(4):647-56.
50. The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. YWHAH tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7533>.
51. Sommer CA, Pavarino-Bertelli EC, Goloni-Bertollo EM, Henrique-Silva F. Identification of dysregulated genes in lymphocytes from children with Down syndrome. *Genome.* 2008;51(1):19-29.
52. UniProt. Q92545 – TM131\_HUMAN [www.uniprot.org/uniprot]. UniProt Consortium; 2002-2015 [Acesso em 2014 Dez 24]. Transmembrane protein 131. TMEM131. Disponível em: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q92545>.
53. Kerkel K, Schupf N, Hatta K, Pang D, Salas M, Kratz A, et al. Altered DNA methylation in leukocytes with trisomy 21. *PLoS Genet* 2010;6:e1001212.
54. GeneCards. The Human Gene Compendium [www.genecards.org]. Weizmann Institute of Science; 2015 [Acesso em 2014 Dez 24]. Genecards search engine. Disponível em: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NPDC1>.
55. The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. AIRE autoimmune regulator [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/326>.

- 56.** Skogberg G, Lundberg V, Lindgren S, Gudmundsdottir J, Sandström K, Kämpe O, et al. Altered expression of autoimmune regulator in infant down syndrome thymus, a possible contributor to an autoimmune phenotype. *J Immunol.* 2014 Sep 1;193(5):2187-95.
- 57.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. AGPAT3 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3 [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/56894>.
- 58.** Li C, Jin L, Bai Y, Chen Q, Fu L, Yang M, et al. Genome-wide expression analysis in Down syndrome: insight into immunodeficiency. *PLoS One.* 2012;7(11):e49130.
- 59.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. ITGB2 integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit) [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3689>.
- 60.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. PDXK pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) kinase [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8566>.
- 61.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. MAPK14 mitogen-activated protein kinase 14 [Homo sapiens (human)]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1432>.

- 62.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. BTG3 BTG family, member 3 [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10950>.
- 63.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. C21orf33 chromosome 21 open reading frame 33 [Homo sapiens (human)]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8209>.
- 64.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. CSTB cystatin B (stefin B) [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1476>.
- 65.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. GABPA GA binding protein transcription factor, alpha subunit 60kDa [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2551>.
- 66.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. GART phosphoribosylglycinamide formyltransferase, phosphoribosylglycinamide synthetase, phosphoribosylaminoimidazole synthetase [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2618>.
- 67.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. HLCS holocarboxylase synthetase (biotin-(propionyl)-CoA-carboxylase (ATP-

hydrolysing)) ligase) [Homo sapiens (human)]. Disponível em:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3141>.

**68.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. MCM3AP minichromosome maintenance complex component 3 associated protein [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8888>.

**69.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. PFKL phosphofruktokinase, liver [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5211>.

**70.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. POFUT2 protein O-fucosyltransferase 2 [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23275>.

**71.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. UBE2G2 ubiquitin-conjugating enzyme E2G 2 [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7327>.

**72.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. ITGB1 integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12) [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3688>.

- 73.** UniProt. Q9GZP0 - PDGFD\_HUMAN [www.uniprot.org/uniprot]. UniProt Consortium; 2002-2015 [Acesso em 2014 Dez 24]. Platelet-derived growth factor D. PDGFD. Disponível em: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9GZP0>.
- 74.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. ITGAL integrin, alpha L (antigen CD11A (p180), lymphocyte function-associated antigen 1; alpha polypeptide) [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3683>.
- 75.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24] ITGAV integrin, alpha V [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3685>.
- 76.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. PDGFRB platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5159>.
- 77.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. ADA adenosine deaminase [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100>.
- 78.** Ma A, Pena JC, Chang B, Margosian E, Davidson L, Alt FW, et al. Bclx regulates the survival of double-positive thymocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(11):4763-7.

- 79.** Charo IF, Peters W. Chemokine receptor 2 (CCR2) in atherosclerosis, infectious diseases, and regulation of T-cell polarization. *Microcirculation*. 2003;10(3-4):259-64.
- 80.** Oppermann M. Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. *Cell Signal*. 2004;16(11):1201-10.
- 81.** Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:683-765.
- 82.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. BCL2A1 BCL2-related protein A1 [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/597>.
- 83.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. CXCR4 chemokine (C-X-C motif) receptor 4 [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7852>.
- 84.** GeneCards. The Human Gene Compendium [www.genecards.org]. Weizmann Institute of Science; 2015 [Acesso em 2014 Dez 24]. Genecards search engine. Disponível em: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL8>.
- 85.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. RPL13A ribosomal protein L13a [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23521>.
- 86.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. RPL29

- ribosomal protein L29 [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6159>.
- 87.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. RPL37 ribosomal protein L37 [Homo sapiens (human)] Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6167>.
- 88.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. HSPA1A heat shock 70kDa protein 1A [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3303>.
- 89.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. RGS2 regulator of G-protein signaling 2 [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5997>.
- 90.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. NAMPT nicotinamide phosphoribosyltransferase [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10135>.
- 91.** Kosugi A, Saitoh S, Noda S, Miyake K, Yamashita Y, Kimoto M, et al. Physical and functional association between thymic shared antigen-1/stem cell antigen-2 and the T cell receptor complex. *J Biol Chem* 1998; 273: 12301–12306.
- 92.** Pflugh DL, Maher SE, Bothwell AL. Ly-6 superfamily members Ly-6A/E, Ly-6C, and Ly-6I recognize two potential ligands expressed by B lymphocytes. *J Immunol* 2002; 169: 5130–5136.

- 93.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. FOS FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2353>.
- 94.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. AIRE autoimmune regulator [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/326>.
- 95.** Lima FA, Moreira-Filho CA, Ramos PL, Brentani H, Lima L de A, Arrais M, et al. Decreased AIRE expression and global thymic hypofunction in Down syndrome. *J Immunol.* 2011;187(6):3422-30.
- 96.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. TCF7 transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box) [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6932>.
- 97.** Bhattacharya D, Cheah MT, Franco CB, Hosen N, Pin CL, Sha WC, et al. Transcriptional profiling of antigen-dependent murine B cell differentiation and memory formation. *J Immunol.* 2007;179(10):6808-19.
- 98.** Maurer M, von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(10):1882-6.
- 99.** Forster R, Davalos-Misslitz AC, Rot A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(5):362-71.

- 100.** Tedder TF, Inaoki M, Sato S. The CD19-CD21 complex regulates signal transduction thresholds governing humoral immunity and autoimmunity. *Immunity*. 1997;6(2):107-18.
- 101.** Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*. 2000;12(4):431-40.
- 102.** Bour-Jordan H, Blueston JA. CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals. *J Clin Immunol*. 2002;22(1):1-7.
- 103.** Suttles J, Stout RD. Macrophage CD40 signaling: a pivotal regulator of disease protection and pathogenesis. *Semin Immunol*. 2009;21(5):257-64.
- 104.** Gimmi CD, Freeman GJ, Gribben JG, Sugita K, Freedman AS, Morimoto C, et al. B-cell surface antigen B7 provides a costimulatory signal that induces T cells to proliferate and secrete interleukin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(15):6575-9.
- 105.** Ruetten H, Thiernemann C. Endothelin-1 stimulates the biosynthesis of tumour necrosis factor in macrophages: ET-receptors, signal transduction and inhibition by dexamethasone. *J Physiol Pharmacol*. 1997;48(4):675-88.
- 106.** Hofman FM, Chen P, Jeyaseelan R, Incardona F, Fisher M, Zidovetzki R. Endothelin-1 induces production of the neutrophil chemotactic factor interleukin-8 by human brain-derived endothelial cells. *Blood*. 1998;92(9):3064-72.

- 107.** Browatzki M, Schmidt J, Kübler W, Kranzhöfer R. Endothelin-1 induces interleukin-6 release via activation of the transcription factor NF-kappaB in human vascular smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol.* 2000;95(2):98-105.
- 108.** Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(10):725-34.
- 109.** Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, Suzuki M, Shiina M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond).* 2012;122(4):143-59.
- 110.** Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol.* 2001;2(10):907-16.
- 111.** Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:99-146.
- 112.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. HLA-DOB major histocompatibility complex, class II, DO beta [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3112>.
- 113.** UniProt. P52735 - VAV2\_HUMAN [www.uniprot.org]. UniProt Consortium; 2002-2015 [Acesso em 2014 Dez 24]. Guanine nucleotide exchange factor VAV2. VAV2. Disponível em: <http://www.uniprot.org/uniprot/P52735>.
- 114.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. FCRL2 Fc receptor-like 2 [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/79368>.

- 115.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. FCER2 Fc fragment of IgE, low affinity II, receptor for (CD23) [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2208>.
- 116.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. HLA-DOA major histocompatibility complex, class II, DO alpha [Homo sapiens (human) ]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3111>.
- 117.** R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- 118.** Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 2004;5(10):R80.
- 119.** Dvinge H, Bertone P. HTqPCR: high-throughput analysis and visualization of quantitative real-time PCR data in R. *Bioinformatics.* 2009;25(24):3325-6.
- 120.** Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on bias and variance. *Bioinformatics* 2003, 19:185-193.
- 121.** Mar JC, Kimura Y, Schroder K, Irvine KM, Hayashizaki Y, Suzuki H ,et al. Data-driven normalization strategies for high-throughput quantitative RT-PCR. *BMC Bioinforma.* 2009;10:110. doi: 10.1186/1471-2105-10-110.

- 122.** Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol.* 2004;3:Article3.
- 123.** Benjamini Y, Hockberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Statist Soc Ser B (Methodological)* 1995;57:289-300.
- 124.** Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc.* 2009;4(1):44-57.
- 125.** Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(1):1-13.
- 126.** Huang DW, Sherman BT, Stephens R, Baseler MW, Lane HC, Lempicki RA. DAVID gene ID conversion tool. *Bioinformatics.* 2008;2(10):428-30.
- 127.** Reeves RH, Baxter LL, Richtmeier JT. Too much of a good thing: mechanisms of gene action in Down syndrome. *Trends. Genet.,* 2001;17(2):83-8.
- 128.** Lockstone HE, Harris LW, Swatton JE, Wayland MT, Holland AJ, Bahn S. Gene expression profiling in the adult Down syndrome brain. *Genomics.* 2007;90(6):647-60.
- 129.** Granese B, Scala I, Spatuzza C, Valentino A, Coletta M, Vacca RA, et al. Validation of microarray data in human lymphoblasts shows a role of the ubiquitin-proteasome system and NF- $\kappa$ B in the pathogenesis of Down syndrome. *BMC Med Genomics.* 2013;6:24.

- 130.** Letourneau A, Santoni FA, Bonilla X, Sailani MR, Gonzalez D, Kind J, et al. Domains of genome-wide gene expression dysregulation in Down's syndrome. *Nature*. 2014;508(7496):345-50.
- 131.** FitzPatrick DR, Ramsay J, McGill NI, Shade M, Carothers AD, Hastie ND. Transcriptome analysis of human autosomal trisomy. *Hum Mol Genet* 2002;11:3249-56.
- 132.** Aït Yahya-Graison E, Aubert J, Dauphinot L, Rivals I, Prieur M, Golfier G, et al. Classification of human chromosome 21 gene-expression variations in Down syndrome: impact on disease phenotypes. *Am J Hum Genet* 2007;81:475-91.
- 133.** Mao R, Wang X, Spitznagel EL Jr, Frelin LP, Ting JC, Ding H, et al. Primary and secondary transcriptional effects in the developing human Down syndrome brain and heart. *Genome Biol* 2005;6: R107.
- 134.** Conti A, Fabbrini F, D'Agostino P, Negri R, Greco D, Genesisio R, et al. Altered expression of mitochondrial and extracellular matrix genes in the heart of human fetuses with chromosome 21 trisomy. *BMC Genomics*. 2007;8:268.
- 135.** Amano K, Sago H, Uchikawa C, Suzuki T, Kotliarova SE, Nukina N, et al. Dosage-dependent over-expression of genes in the trisomic region of Ts1Cje mouse model for Down syndrome. *Hum Mol Genet*. 2004;13:1333-40.
- 136.** Potier MC, Rivals I, Mercier G, Ettwiller L, Moldrich RX, Laffaire J, et al. Transcriptional disruptions in Down syndrome: a case study in the Ts1Cje mouse cerebellum during post-natal development. *J Neurochem* 2006;97:104-9.
- 137.** Kahlem P, Sultan M, Herwig R, Steinfath M, Balzereit D, Eppens B, et al. Transcript level alterations reflect gene dosage effects across multiple tissues in a mouse model of Down syndrome. *Genome Res* 2004;14:1258-67.

- 138.** Mao R, Wang X, Spitznagel EL Jr, Frelin LP, Ting JC, Ding H, et al. Primary and secondary transcriptional effects in the developing human Down syndrome brain and heart. *Genome Biol* 2005;6: R107.
- 139.** Laffaire J, Rivals I, Dauphinot L, Pasteau F, Wehrle R, Larrat B, et al. Gene expression signature of cerebellar hypoplasia in a mouse model of Down syndrome during postnatal development. *BMC Genomic* 2009;10:138.
- 140.** Kahlem P, Sultan M, Herwig R, Steinfath M, Balzereit D, Eppens B, et al. Transcript level alterations reflect gene dosage effects across multiple tissues in a mouse model of Down syndrome. *Genome Res* 2004;14:1258-67.
- 141.** Kerkel K, Schupf N, Hatta K, Pang D, Salas M, Kratz A, et al. Altered DNA methylation in leukocytes with trisomy 21. *PLoS Genet.* 2010;6(11):e1001212.
- 142.** Sethupathy P, Borel C, Gagnebin M, Grant GR, Deutsch S, Elton TS, et al. Human microRNA-155 on chromosome 21 differentially interacts with its polymorphic target in the AGTR1 3' untranslated region: a mechanism for functional single-nucleotide polymorphisms related to phenotypes. *Am J Hum Genet* 2007;81(2):405-13.
- 143.** Kuhn DE, Nuovo GJ, Terry AV Jr, Martin MM, Malana GE, Sansom SE, et al. Chromosome 21-derived microRNAs provide an etiological basis for aberrant protein expression in human Down syndrome brains. *J Biol Chem* 2010;285(2):1529-43.
- 144.** Lyle R, Gehrig C, Neergaard-Henrichsen C, Deutsch S, Antonarakis SE. Gene expression from the aneuploid chromosome in a trisomy mouse model of down syndrome. *Genome Res* 2004;14:1268-74.

145. Moura PR, Vidal FAP. Transdução de sinais: uma revisão sobre proteína G. *Scientia Medica* 2011;21(1):31-36.
146. Calixto JB, Medeiros R, Fernandes ES, Ferreira J, Cabrini DA, Campos MM. Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *Br J Pharmacol.* 2004;143(7):803-18.
147. Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol.* 2001;429(1-3):161-76.
148. Talbot S, Couture R. Emerging role of microglial kinin B1 receptor in diabetic pain neuropathy. *Exp Neurol.* 2012;234(2):373-81.
149. Medeiros R, Passos GF, Vitor CE, Koepp J, Mazzuco TL, Pianowski LF, et al. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. *Br J Pharmacol.* 2007;151(5):618-27.
150. Todorov AG, Andrade D, Pesquero JB, Araujo R de C, Bader M, Stewart J, et al. *Trypanosoma cruzi* induces edematogenic responses in mice and invades cardiomyocytes and endothelial cells in vitro by activating distinct kinin receptor (B1/B2) subtypes. *FASEB J.* 2003;17(1):73-5.
151. Christiansen SC, Eddleston J, Woessner KM, Chambers SS, Ye R, Pan ZK, et al. Up-regulation of functional kinin B1 receptors in allergic airway inflammation. *J Immunol.* 2002;169(4):2054-60.
152. Seegers HC, Avery PS, McWilliams DF, Haywood L, Walsh DA. Combined effect of bradykinin B2 and neurokinin-1 receptor activation on endothelial cell proliferation in acute synovitis. *FASEB J.* 2004;18(6):762-4.

- 153.** Barki-Harrington L, Bookout AL, Wang G, Lamb ME, Leeb-Lundberg LM, Daaka Y. Requirement for direct cross-talk between B1 and B2 kinin receptors for the proliferation of androgen-insensitive prostate cancer PC3 cells. *Biochem J.* 2003;371(Pt 2):581-7.
- 154.** Calixto JB, Cabrini DA, Ferreira J, Campos MM. Inflammatory pain: kinins and antagonists. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2001;14(5):519-26.
- 155.** Campos MM, Ongali B, De Souza Buck H, Schanstra JP, Girolami JP, Chabot JG, et al. Expression and distribution of kinin B1 receptor in the rat brain and alterations induced by diabetes in the model of streptozotocin. *Synapse.* 2005;57(1):29-37.
- 156.** Rodi D, Couture R, Ongali B, Simonato M. Targeting kinin receptors for the treatment of neurological diseases. *Curr Pharm Des.* 2005;11(10):1313-26.
- 157.** Lacoste B, Tong XK, Lahjouji K, Couture R, Hamel E. Cognitive and cerebrovascular improvements following kinin B1 receptor blockade in Alzheimer's disease mice. *J Neuroinflammation.* 2013;10:57.
- 158.** Viel TA, Buck HS. Kallikrein-kinin system mediated inflammation in Alzheimer's disease in vivo. *Curr Alzheimer Res.* 2011;8(1):59-66.
- 159.** Rudberg PC, Tholander F, Andberg M, Thunnissen MM, Haeggström JZ. Leukotriene A4 hydrolase: identification of a common carboxylate recognition site for the epoxide hydrolase and aminopeptidase substrates. *J Biol Chem.* 2004;279(26):27376-82.
- 160.** Peters-Golden M, Henderson WR Jr. Leukotrienes. *N Engl J Med.* 2007;357(18):1841-54.

- 161.** Whittle BJ, Varga C, Berko A, Horvath K, Posa A, Riley JP, et al. Attenuation of inflammation and cytokine production in rat colitis by a novel selective inhibitor of leukotriene A4 hydrolase. *Br J Pharmacol.* 2008;153(5):983-91.
- 162.** Snelgrove RJ, Jackson PL, Hardison MT, Noerager BD, Kinloch A, Gaggar A, et al. A critical role for LTA4H in limiting chronic pulmonary neutrophilic inflammation. *Science.* 2010;330(6000):90-4.
- 163.** Mendes MT, Silveira PF. The interrelationship between leukotriene B4 and leukotriene-A4-hydrolase in collagen/adjuvant-induced arthritis in rats. *Biomed Res Int.* 2014;2014:730421.
- 164.** Liu M, Yokomizo T. The role of leukotrienes in allergic diseases. *Allergol Int.* 2015;64(1):17-26.
- 165.** Bertotto A, Crupi S, Arcangeli C, Gerli R, Scalise F, Fabietti G, et al. T-cell response to phorbol ester PMA and calcium ionophore A23187 in Down's syndrome. *Scand. J. Immunol* 2008;30:583,-586.
- 166.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. VCAM1 vascular cell adhesion molecule 1 [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7412>.
- 167.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 2014 Dez 24]. ICAM1 intercellular adhesion molecule 1 [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3383>.
- 168.** Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;76(2):301-14.

- 169.** Etienne-Manneville S, Chaverot N, Strosberg AD, Couraud PQ. ICAM-1-coupled signaling pathways in astrocytes converge to cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation and TNF-alpha secretion. *J Immunol.* 1999;163(2):668-74.
- 170.** Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2001;107(10):1255-62.
- 171.** Rothlein R, Dustin ML, Marlin SD, Springer TA. A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J Immunol.* 1986;137(4):1270-4.
- 172.** Yang L, Froio RM, Sciuto TE, Dvorak AM, Alon R, Luscinskas FW. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood.* 2005;106(2):584-92.
- 173.** Lin SJ, Wang JY, Klickstein LB, Chuang KP, Chen JY, Lee JF, et al. Lack of age-associated LFA-1 up-regulation and impaired ICAM-1 binding in lymphocytes from patients with Down syndrome. *Clin Exp Immunol.* 2001;126(1):54-63.
- 174.** Ferrari S, Plebani A. Cross-talk between CD40 and CD40L: lessons from primary immune deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2002;2(6):489-94.
- 175.** Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L, Keely PJ. Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta* 2004;1692:103–119.
- 176.** Mammoto A, Ingber DE. Cytoskeletal control of growth and cell fate switching. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21:864–870.

- 177.** The National Center for Biotechnology Information – NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Bethesda: NCBI [Acesso em 24/12/2014]. ITGAM integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit) [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3684>.
- 178.** Taylor GM, Haigh H, Williams A, D’Souza SW, Harris R. Down’s syndrome lymphoid cell lines exhibit increased adhesion due to the overexpression of lymphocyte function-associated antigen (LFA-1). *Immunology* 1998;64:451–456.

**VII. ANEXOS**

**Descrição dos genes envolvidos na resposta inflamatória com ensaios incluídos no Kit TaqMan® Array Plate Human Inflammation (Applied Biosystems) para análise de expressão gênica por PCRq.**

<i>14-3-3 eta</i>	<i>14-3-3 protein eta</i>
<i>18S</i>	<i>Ribosomal RNA</i>
<i>A2M</i>	<i>Alpha-2-macroglobulin</i>
<i>ADA</i>	<i>Adenosine deaminase</i>
<i>ADRB1</i>	<i>Adrenoceptor beta 1</i>
<i>ADRB2</i>	<i>Adrenoceptor beta 2, surface</i>
<i>AGPAT3</i>	<i>1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3</i>
<i>AIRE</i>	<i>Autoimmune regulator</i>
<i>ALOX12</i>	<i>Arachidonate 12-lipoxygenase</i>
<i>ALOX5</i>	<i>Arachidonate 5-lipoxygenase</i>
<i>ANXA1</i>	<i>Annexin A1</i>
<i>ANXA3</i>	<i>Annexin A3</i>
<i>ANXA5</i>	<i>Annexin A5</i>
<i>BCL2</i>	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
<i>BCL2A1</i>	<i>BCL2-related protein A1</i>
<i>BCL2L1</i>	<i>BCL2-like 1</i>
<i>BDKRB2</i>	<i>Bradykinin receptor B2</i>
<i>BTG3</i>	<i>BTG family, member 3</i>
<i>C21orf33</i>	<i>Chromosome 21 open reading frame 33</i>
<i>CACNA1C</i>	<i>Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit</i>
<i>CACNA1D</i>	<i>Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit</i>
<i>CACNA2D1</i>	<i>Calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 1</i>

<i>CACNB2</i>	<i>Calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit</i>
<i>CACNB4</i>	<i>Calcium channel, voltage-dependent, beta 4 subunit</i>
<i>CASP1</i>	<i>Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase</i>
<i>CCL3</i>	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 3</i>
<i>CCR2</i>	<i>Chemokine (C-C motif) receptor 2</i>
<i>CCR5</i>	<i>Chemokine (C-C motif) receptor 5 gene/pseudogene)</i>
<i>CCR7</i>	<i>Chemokine (C-C motif) receptor 7</i>
<i>CD19</i>	<i>CD19 molecule</i>
<i>CD28</i>	<i>CD28 molecule</i>
<i>CD40</i>	<i>CD40 ligand</i>
<i>CD40LG</i>	<i>CD40 ligand</i>
<i>CD40LG</i>	<i>CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5</i>
<i>CD80</i>	<i>CD80 molecule</i>
<i>CES1</i>	<i>Carboxylesterase 1</i>
<i>CSTB</i>	<i>Cystatin B (stefin B)</i>
<i>CXCR4</i>	<i>Chemokine (C-X-C motif) receptor 4</i>
<i>CYSLTR1</i>	<i>Cysteinyl leukotriene receptor 1</i>
<i>EDN1</i>	<i>Endothelin 1</i>
<i>FCER2</i>	<i>Fc fragment of IgE, low affinity II, receptor for (CD23)</i>
<i>FCRL2</i>	<i>Fc receptor-like 2</i>
<i>FOS</i>	<i>FBJ osteosarcoma oncogene</i>
<i>GABPA</i>	<i>GA binding protein transcription factor, alpha subunit 60kDa</i>
<i>GABRG2</i>	<i>Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, gamma 2</i>
<i>GAPDH</i>	<i>Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase</i>

<i>GART</i>	<i>Phosphoribosylglycinamide</i>	<i>formyltransferase, phosphoribosylglycinamide synthetase, phosphoribosylaminoimidazole synthetase</i>
<i>GTF3A</i>	<i>General transcription factor IIIA</i>	
<i>GUSB</i>	<i>Glucuronidase, beta</i>	
<i>HLA-DOA</i>	<i>Major histocompatibility complex, class II, DO alpha</i>	
<i>HLA-DOB</i>	<i>Major histocompatibility complex, class II, DO beta</i>	
<i>HLA-DRB3</i>	<i>Major histocompatibility complex, class II, DR beta 3</i>	
<i>HLCS</i>	<i>Holocarboxylase synthetase (biotin-(propionyl-CoA-carboxylase (ATP-hydrolysing)) ligase)</i>	
<i>HPGD</i>	<i>Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)</i>	
<i>HPRT1</i>	<i>Hipoxantina fosforribosil transferase</i>	
<i>HRH1</i>	<i>Histamine receptor H1</i>	
<i>HRH2</i>	<i>Histamine receptor H2</i>	
<i>HRH3</i>	<i>Histamine receptor H3</i>	
<i>Hsp70-1</i>	<i>Heat shock 70kDa protein 1A</i>	
<i>HTR3A</i>	<i>5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A, ionotropic</i>	
<i>HTR3B</i>	<i>5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3B, ionotropic</i>	
<i>ICAM1</i>	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>	
<i>IKBKB</i>	<i>Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta</i>	
<i>IL10</i>	<i>Interleukin 10</i>	
<i>IL1R1</i>	<i>Interleukin 1 receptor, type I</i>	
<i>IL1R2</i>	<i>Interleukin 1 receptor, type II</i>	
<i>IL1RAPL2</i>	<i>Interleukin 1 receptor accessory protein-like 2</i>	

<i>IL1RL1</i>	<i>Interleukin 1 receptor-like 1</i>
<i>IL2RA</i>	<i>Interleukin 2 receptor, alpha</i>
<i>IL2RB</i>	<i>Interleukin 2 receptor, beta</i>
<i>IL2RG</i>	<i>Interleukin 2 receptor, gamma</i>
<i>IL6</i>	<i>Interleukin 6</i>
<i>IL-8</i>	<i>Interleucine 8</i>
<i>ITGAL</i>	<i>Integrin, alpha L (antigen CD11A (p180), lymphocyte function-associated antigen 1; alpha polypeptide)</i>
<i>ITGAM</i>	<i>Integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)</i>
<i>ITGAV</i>	<i>Integrin, alpha V</i>
<i>ITGB1</i>	<i>Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)</i>
<i>ITGB2</i>	<i>Integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)</i>
<i>KLK1</i>	<i>Kallikrein 1</i>
<i>KLK14</i>	<i>Kallikrein-related peptidase 14</i>
<i>KLK15</i>	<i>Kallikrein-related peptidase 15</i>
<i>KLK2</i>	<i>Kallikrein-related peptidase 2</i>
<i>KLK3</i>	<i>Kallikrein-related peptidase 3</i>
<i>KLKB1</i>	<i>Kallikrein B, plasma (Fletcher factor) 1</i>
<i>KNG1</i>	<i>Kininogen 1</i>
<i>L13 a</i>	<i>Ribosomal protein L13a</i>
<i>L29</i>	<i>Ribosomal protein L29</i>
<i>L37</i>	<i>Ribosomal protein L37</i>
<i>LTB4R</i>	<i>Leukotriene B4 receptor</i>

<i>LTB4R2</i>	<i>Leukotriene B4 receptor 2</i>
<i>LTC4S</i>	<i>Leukotriene C4 synthase</i>
<i>LY6E</i>	<i>Lymphocyte antigen 6 complex, locus E</i>
<i>MAPK1</i>	<i>Mitogen-activated protein kinase 1</i>
<i>MAPK14</i>	<i>Mitogen-activated protein kinase 14</i>
<i>MAPK3</i>	<i>Mitogen-activated protein kinase 3</i>
<i>MAPK8</i>	<i>Mitogen-activated protein kinase 8</i>
<i>MC2R</i>	<i>Melanocortin 2 receptor (adrenocorticotropic hormone)</i>
<i>MCM3AP</i>	<i>Minichromosome maintenance complex component 3 associated protein</i>
<i>NFKB</i>	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>
<i>NOS2</i>	<i>Nitric oxide synthase 2, inducible</i>
<i>NPDC1</i>	<i>Neural proliferation, differentiation and control, 1</i>
<i>NR3C1</i>	<i>Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1</i>
<i>PBEF1</i>	<i>Pre B cell colony enhancing factor 1</i>
<i>PDE4A</i>	<i>Phosphodiesterase 4A, cAMP-specific</i>
<i>PDE4B</i>	<i>Phosphodiesterase 4B, cAMP-specific</i>
<i>PDE4C</i>	<i>Phosphodiesterase 4C, cAMP-specific</i>
<i>PDE4D</i>	<i>Phosphodiesterase 4D, cAMP-specific</i>
<i>PDGFD</i>	<i>Platelet derived growth factor D</i>
<i>PDGFRB</i>	<i>Platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide</i>
<i>PDXK</i>	<i>Pyridoxal (pyridoxine, vitamin b6) kinase</i>
<i>PFKL</i>	<i>Phosphofructokinase, liver</i>
<i>PLA2G10</i>	<i>Phospholipase A2, group X</i>
<i>PLA2G1B</i>	<i>Phospholipase A2, group IB (pancreas)</i>

*PLA2G2A*      *Phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)*

*PLA2G2D*      *Phospholipase A2, group IID*

*PLA2G4C*      *Phospholipase A2, group IVC (cytosolic, calcium-independent)*

*PLA2G5*        *Phospholipase A2, group V*

*PLA2G7*        *Phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)*

*PLCB2*         *Phospholipase C, beta 2*

*PLCB3*         *Phospholipase C, beta 3 (phosphatidylinositol-specific)*

*PLCB4*         *Phospholipase C, beta 4*

*PLCD1*         *Phospholipase C, delta 1*

*PLCE1*         *Phospholipase C, epsilon 1*

*PLCG1*         *Phospholipase C, gamma 1*

*PLCG2*         *Phospholipase C, gamma 2 (phosphatidylinositol-specific)*

*POFUT2*        *Protein O-fucosyltransferase 2*

*PTAFR*         *Platelet-activating factor receptor*

*PTGDR*         *Prostaglandin D2 receptor (DP)*

*PTGER2*        *Prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2), 53kDa*

*PTGER3*        *Pprostaglandin E receptor 3 (subtype EP3)*

*PTGFR*         *Prostaglandin F receptor (FP)*

*PTGIR*         *Prostaglandin I2 (prostacyclin) receptor (IP)*

*PTGIS*         *Prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase*

*PTGS1*         *Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)*

<i>PTGS2</i>	<i>Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)</i>
<i>RGS2</i>	<i>Regulator of G-protein signaling 2</i>
<i>SKI</i>	<i>V-ski sarcoma viral oncogene homolog (avian)</i>
<i>SOD1</i>	<i>Superoxide dismutase 1, soluble</i>
<i>TBXA2R</i>	<i>Thromboxane A2 receptor</i>
<i>TBXAS1</i>	<i>Thromboxane A synthase 1 (platelet)</i>
<i>TCF7</i>	<i>Transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box)</i>
<i>TGF-<math>\beta</math>1</i>	<i>Transforming growth factor, beta 1</i>
<i>TMEM131</i>	<i>Transmembrane protein 131</i>
<i>TNF</i>	<i>Fator de necrose tumoral</i>
<i>TNFRSF1A</i>	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A</i>
<i>TNFRSF1B</i>	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B</i>
<i>TNFSF13B</i>	<i>Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b</i>
<i>UBE2G2</i>	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2G 2</i>
<i>UCHL1</i>	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase)</i>
<i>VAV2</i>	<i>Vav 2 guanine nucleotide exchange factor</i>
<i>VCAM1</i>	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>



## FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Autarquia Estadual - Lei n.º 8899 de 27/09/94  
(Reconhecida pelo Decreto Federal n.º 74.179 de 14/06/74)

Parecer n.º 043/2010

### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo CEP n.º 0297/2010 sob a responsabilidade de **Érika Cristina Pavarino Bertelli**, com o título "Expressão de genes envolvidos na resposta imunológica e de micro-RNAs em crianças com Síndrome de Down", está de acordo com a Resolução do CNS 196/96 e foi **aprovado por esse CEP**.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) **deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo**, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, com certeza para conhecimento deste Comitê. **Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.**

São José do Rio Preto, 08 de fevereiro de 2010.

**Dr.ª Maria Angélica Benes Teixeira Lemos**  
Secretária do CEP/FAMERP

  
Prof. Dr. Antônio Carlos Pires  
Coordenador do CEP - FAMERP

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**  
(Conselho Nacional de Saúde, resolução 196/96)

**Título da Pesquisa:** Investigação da expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória em crianças com síndrome de Down.

**Pesquisadora Responsável:** Profa Dra Érika Cristina Pavarino.

Eu.....RG....., responsável legal por ....., declaro que autorizo meu filho (a) a participar como voluntário (a) do projeto de pesquisa “Investigação da expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória em crianças com síndrome de Down”, conforme consentimento do mesmo. Declaro ainda que fomos satisfatoriamente esclarecidos que:

A) o objetivo do estudo é investigar genes (material genético) envolvidos na resposta inflamatória em crianças com Síndrome de Down e em crianças sem a síndrome para identificar diferenças clínicas entre os grupos de crianças; B) o estudo molecular será realizado utilizando-se RNA (material genético) extraído de sangue periférico de crianças com síndrome de Down (grupo caso) e de crianças sem a síndrome (grupo controle); C) o sangue será colhido com seringa descartável por profissionais habilitados e o risco da coleta inclui vermelhidão local transitória, e raramente a formação de pequenos hematomas e inflamação local; D) posso consultar a pesquisadora responsável em qualquer época, pessoalmente ou pelo telefone (17) 3201-5904, para esclarecimento de qualquer dúvida; E) estou livre para, a qualquer momento, deixar de participar da pesquisa e que não preciso apresentar justificativas para isso; F) todas as informações fornecidas e os resultados serão mantidos em sigilo e estes últimos somente serão utilizados para divulgação em reuniões e revistas científicas; G) autorizo o armazenamento do material coletado e serei contatado (a) para conceder ou não a autorização para o uso deste material em futuros projetos.

Assim, consinto em participar do projeto de pesquisa em questão.

São José do Rio Preto, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Responsável legal

\_\_\_\_\_  
Érika Cristina Pavarino  
Pesquisadora Responsável

Em caso de dúvidas contatar a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, telefone: (17) 32015813