

Universidade Federal de Pelotas  
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos  
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação

Avaliação da atividade das enzimas NTPDase e acetilcolinesterase em linfócitos de adultos portadores de Síndrome de Down: relação com parâmetros inflamatórios

Rodrigo da Silva Rodrigues

Pelotas, 2013

Rodrigo da Silva Rodrigues

Avaliação da atividade das enzimas NTPDase e acetilcolinesterase em linfócitos de portadores de Síndrome de Down: relação com parâmetros inflamatórios

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientadora: Profa. Dra. Roselia M. Spanevello

Co-orientadora: Profa. Dra. Elizandra Braganhol

Pelotas, 2013

**Banca Examinadora:**

Prof. Dr. Jean Pierre Oses

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Francieli Moro Stefanello

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Giovana Duzzo Gamaro

**Dedico**

Aqueles que sempre estão ao meu lado:

meus pais José Olmarim e Jussara

meus irmãos Thuany e Cauã

meu sobrinho Muriel

minha namorada Samantha

## Agradecimentos

Aqui se encerra mais uma etapa da minha caminhada, novos passos serão dados e novas conquistas serão alcançadas, em todas as jornadas tive do meu lado pessoas que nunca me deixaram esmorecer, e eu agradeço a deus por ter sempre ao meu lado pessoas que confiam na minha capacidade. Por isso dedico este trabalho a estas pessoas tão especiais para mim:

Aos meus pais José Rodrigues e Jussara da Silva, agradeço por sempre me darem a oportunidade de estudar, por nunca terem medido esforços para a minha formação pessoal e profissional. Sou grato por ser filho de duas pessoas que são exemplo de profissionalismo, competência e honestidade, além de amar vocês é em vocês que eu me encontro. Esta conquista é nossa!

Dedico ao tio Ernesto, tia Arminda e a Raquel, que me acolheram com todo amor e carinho, hoje me sinto parte da família de vocês, me sinto o filho mais velho. Sou grato pelas conversas, pelos incentivos, pelas trocas de experiências pessoais e profissionais, podem contar comigo sempre.

Agradeço, aos meus amigos Lávio e Solange e seus filhos pelo carinho e por ter acreditado na minha capacidade, jamais vou esquecer que vocês me ajudaram a dar o primeiro passo em direção à universidade, vou ser eternamente grato.

Um agradecimento especial a minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Roselia Spanevello, você é exemplo de competência, responsabilidade e humildade. Muito obrigado pelo carinho, pelas palavras de incentivo e companheirismo. Posso dizer que não ganhei uma orientadora e sim uma amiga, pode contar comigo sempre.

À minha co-orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elizandra Braganhol por mostrar que tenho a plena capacidade de pensar muito mais do que eu possa imaginar, e por acreditar no meu potencial, sou grato por ter uma profissional exemplar como você no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, em especial, a Gabriela, Fabiano e a Caroline, pelas horas desgastantes de análises, pela paciência e dedicação. Vocês foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho, sem o empenho de vocês tudo seria difícil, podem contar comigo sempre que for preciso.

A todos os funcionários do Laboratório Leivas Lang, especialmente ao Dr. José Antônio Leivas Lang por ter dado a oportunidade que precisei para desenvolver este trabalho. Eu sempre digo para as pessoas que eu não tenho chefe e sim um amigo. À Fernanda Paludo pelo companheirismo, a sua ajuda foi essencial para eu poder desenvolver este trabalho. Muito obrigado.

Aos meus colegas Maurício e Elise por me acompanharem há mais de 6 anos nas minhas caminhadas acadêmicas. Elise, obrigado pelos dias e dias de estudo, por ser minha amiga ouvinte, por ter me acolhido muitas vezes como irmão, dedico a você e ao Gabriel pela amizade límpida que existe entre nós.

Aos meus colegas de trabalho Anderson e Ana pelo incentivo e carinho, sei que sempre poderei contar com vocês.

Ao CERENEP, APAE de Pelotas e a Escola de Educação Física da Universidade Federal de Pelotas pela parceria no desenvolvimento deste estudo.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção pelos ensinamentos.

A UFPEL pela estrutura onde eu tive a oportunidade de realizar meus estudos. E que me proporcionou diversas experiências.

“Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto... O ser humano vivência a si mesmo, seus pensamentos como algo separado do resto do universo - numa espécie de ilusão de ótica de sua consciência. E essa ilusão é uma espécie de prisão que nos restringe a nossos desejos pessoais, conceitos e ao afeto por pessoas mais próximas. Nossa principal tarefa é a de nos livrarmos dessa prisão, ampliando o nosso círculo de compaixão, para que ele abranja todos os seres vivos e toda a natureza em sua beleza. Ninguém conseguirá alcançar completamente esse objetivo, mas lutar pela sua realização já é por si só parte de nossa liberação e o alicerce de nossa segurança interior”.

Albert Einstein

## Resumo

RODRIGUES, Rodrigo da Silva. **Avaliação da atividade das enzimas NTPDase e acetilcolinesterase em linfócitos de portadores de Síndrome de Down: relação com parâmetros inflamatórios.** 2013. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A Síndrome de Down (SD) é uma alteração cromossômica caracterizada pela presença de uma cópia extra do cromossomo 21. Indivíduos com SD tem uma maior susceptibilidade a infecções e doenças autoimunes. O ATP, a adenosina e a acetilcolina contribuem para a modulação das respostas imunes, cujas as concentrações são controladas pelas enzimas NTPDase, adenosina desaminase (ADA) e acetilcolinesterase (AChE). Sendo assim, neste estudo foram avaliadas as atividades destas enzimas, os parâmetros hematológicos, bem como os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias em amostras de indivíduos saudáveis ou com SD. A população foi composta por 23 indivíduos com SD e 23 indivíduos saudáveis como grupo controle. Os resultados demonstraram que a atividade da NTPDase usando ADP como substrato foi significativamente aumentada em linfócitos de portadores com SD em relação ao grupo controle ( $P \leq 0,05$ ), entretanto, não foram observadas alterações na hidrólise do ATP assim como nos parâmetros hematológicos. Um aumento significativo foi observado na atividade da AChE em linfócitos e da ADA em soro de indivíduos com SD quando comparado com indivíduos saudáveis ( $P \leq 0,05$ ). Nesse estudo também foi observado um aumento sérico das citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , respectivamente, e uma diminuição nos níveis de IL-10, uma citocina anti-inflamatória ( $P \leq 0,0001$ ) no grupo SD. Estes resultados sugerem que alterações na atividade da NTPDase, ADA e AChE, bem como as mudanças dos níveis de citocinas podem contribuir para alterações imunológicas observadas nessa desordem genética.

Palavras-chave: Síndrome de Down, linfócitos, NTPDase, adenosina deaminase, acetilcolinesterase, citocinas



## Abstract

RODRIGUES, Rodrigo da Silva. **Evaluation of the NTPDase and acetylcholinesterase activities in lymphocytes of Down syndrome subjects: relation with inflammatory parameters.** 2013. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Down Syndrome (DS) is a chromosomal alteration characterized by the presence of an extra copy of chromosome 21. Subjects with DS exhibit an increased susceptibility to infections and autoimmune disorders. ATP, adenosine, and acetylcholine modulate immune responses and NTPDase, adenosine deaminase (ADA) and acetylcholinesterase (AChE) are important enzymes that control of extracellular levels of these molecules at inflammatory sites. In this study we evaluated the activities of these enzymes, hematological parameters, as well as cytokine levels in samples of DS individuals and healthy subjects. The population consisted of 23 subjects with DS and 23 healthy subjects as a control group. Results showed that NTPDase activity using ADP as substrate was significantly increased in lymphocytes of DS patients in relation to the control group ( $P \leq 0.05$ ); however, no alterations were observed on ATP hydrolysis. A significant increase was observed on AChE and ADA activities, respectively, in samples of DS patients when compared to healthy subjects ( $P \leq 0.05$ ). In DS subjects an increase in the levels of pro-inflammatory cytokines such as of IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ , respectively, and a decrease of IL-10 levels, a anti-inflammatory cytokine, were also observed ( $P \leq 0.0001$ ). These findings suggest that alterations in NTPDase, ADA and AChE activities as well changes the cytokines levels may contribute to immunological alterations observed in this genetic disorder.

Key words: Down syndrome, lymphocytes, NTPDase, adenosine deaminase, acetylcholinesterase, cytokines

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b>	Cariótipo de um portador da Síndrome de Down.....	19
<b>Figura 2</b>	Translocação do tipo Robertsoniana.....	20
<b>Figura 3</b>	Alterações Fenóticas na SD.....	23
<b>Figura 4</b>	Demonstração das vias de liberação dos nucleotídeos.....	28
<b>Figura 5</b>	Tipos de receptores purinérgicos e seus ligantes.....	30
<b>Figura 6</b>	Enzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeos.....	31

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b>	Alterações do sistema imune dos portadores da SD.....	25
-----------------	-------------------------------------------------------	----

## Lista de Abreviaturas

- A<sub>2A</sub> – Receptores de adenosina A<sub>2A</sub>  
A<sub>2B</sub> – Receptores de adenosina A<sub>2B</sub>  
A<sub>3</sub> – Receptores de adenosina A<sub>3</sub>  
ACh – Acetilcolina  
AChE – Acetilcolinesterase  
ACR – Regiões conservadas da apirase  
ADA – Adenosina deaminase  
ADP – Adenosina difosfato  
AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida  
AMP – Adenosina monofosfato  
APP – Proteína precursora amiloide  
ATP – Adenosina trifosfato  
CBS – Cistationina beta sintase  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
E-NTPdase – Enzima ectonucleotidase  
IFN $\gamma$  – Interferon gama  
IgG – Imunoglobulina da classe G  
IgM – Imunoglobulina da classe M  
IL-1 – Interleucina 1  
IL-10 – Interleucina 10  
IL-18 – Interleucina 18  
IL-1 $\beta$  – Interleucina 1 beta  
IL-2 – Interleucina 2  
IL-4 – Interleucina 4  
IL-5 – Interleucina 5  
IL-6 – Interleucina 6  
MHC – Complexo de histocompatibilidade  
MTHFR – Metilenotetrahidrofolato redutase  
MTR – Metilenotetrahidrofolato-homocisteína  
MTRR – Metionina sintase – redutase  
NK – *Natural killer*

NTPDase – nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase

P2X – Receptores purinérgicos

P2Y – Receptores purinérgicos

Panx 1 – Canais Panexina 1

SD – Síndrome de Down

SNC – Sistema nervoso central

SNP – Sistema nervoso periférico

Th1 – Linfócitos T *helper* do tipo 1

Th2 – Linfócitos T *helper* do tipo 2

TNF $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa

TR – Translocação Robertsoniana

TRC – Receptores de células T

## Sumário

1. Introdução .....	15
2. Objetivos .....	18
2.1 Objetivo geral .....	18
2.2 Objetivos específicos .....	18
3. Revisão de Literatura .....	19
3.1 Síndrome de Down.....	19
3.2 Alterações imunológicas relacionadas com a Síndrome de Down .....	24
3.3 Sistema Purinérgico .....	27
3.3.1 Nucleotídeos e nucleosídeos de adenina.....	28
3.3.2 Receptores purinérgicos.....	29
3.3.3 Enzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeos de adenina.....	31
3.4 Acetilcolinesterase .....	34
4. Manuscrito.....	36
5. Conclusões.....	63
6. Referências bibliográficas .....	64

## 1. Introdução

A síndrome de Down (SD) também conhecida como Trissomia do 21 é uma doença genética causada pela ocorrência de três cromossomos 21, na sua totalidade ou de uma porção fundamental dele (MOREIRA et al., 2000; SILVA & DESSEN, 2002). Esta síndrome constitui uma das causas mais frequentes de deficiência mental e tem incidência diretamente proporcional à idade materna. O diagnóstico pode ser realizado clinicamente no período neonatal e confirmado por exames genéticos (BITTLES et al., 2006; IRVING et al., 2008, SILVA & DESSEN, 2002).

A morbidade por doenças infecciosas é elevada em portadores de SD. A frequência de infecções e doenças autoimunes nesses pacientes tem sido associada a várias alterações tanto na resposta imune celular quanto humoral (RIBEIRO et al., 2003). Diversos autores relatam desordens funcionais e morfológicas no timo (HINGH et al., 2005), alterações na produção de citocinas pró-inflamatórias como interferon gama (IFN $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (TROTTA et al., 2011), bem como uma redução no número de linfócitos B e T circulantes (HINGH et al., 2005; JOSHI et al., 2011).

Muitos mediadores são capazes de controlar as ações dos linfócitos, dentre estes pode-se destacar a acetilcolina e os nucleotídeos e nucleosídeos da adenina, como o trifosfato de adenosina (ATP) extracelular e a adenosina. A acetilcolina sintetizada e liberada dos linfócitos é considerada um agente imunomodulador, o qual regula muitas das funções imunes (RINNER et al., 1998; KAWASHIMA & FUJI, 2000; 2003). Além disso, o ATP é uma molécula que possui funções pró-inflamatórias como a estimulação e a proliferação de linfócitos, sendo essencial para a liberação de citocinas como a interleucina 2 (IL-2) e o IFN- $\gamma$  (LANGSTON et al., 2003; BOURS et al., 2006). Por outro lado, a adenosina tem potentes atividades

anti-inflamatórias e imunossupressoras por inibir a proliferação de células T através da ativação de receptores  $A_{2A}$  e a liberação de citocinas pró-inflamatórias (GESSI et al., 2007).

A sinalização induzida pela acetilcolina, ATP e adenosina nas respostas imunes e inflamatórias correlaciona-se diretamente à atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE), NTPDase1, e adenosina deaminase (ADA), respectivamente. A AChE é uma importante enzima regulatória que rapidamente hidrolisa a acetilcolina em acetato e colina (SOREQ & SEIDMAN, 2001). A AChE esta presente tanto em linfócitos T quanto B (TAYEBATI et al., 2002) e tem sido demonstrado que uma inibição ou ausência da desta enzima pode alterar o processo de formação dos linfócitos (CHANDRA & MADHAVANKUTTY, 1975), destacando assim o papel relevante que esta enzima possui no sistema imune. A NTPDase1 é uma ectoenzima capaz de hidrolisar nucleosídeos tri- e difosfatados, como o ATP e o ADP, até seu respectivo nucleosídeo monofosfatado AMP (ZIMMERMANN, 2001). Esta enzima foi caracterizada em linfócitos (LEAL et al., 2005) e tem sido postulado que a NTPDase1 controla muitas funções destas células incluindo reconhecimento de antígenos e ativação das células T citotóxicas.

A ADA é uma enzima envolvida na desaminação da adenosina e da desoxiadenosina nucleosídeo, formando inosina e desoxiinosina, respectivamente (PHILLIS, 1991). A ADA está amplamente distribuída nos tecidos e está presente no desenvolvimento do sistema imune. Em particular, a ADA tem um papel importante na proliferação e diferenciação das células linfóides e desempenha um papel importante em vários estágios da maturação dos linfócitos. A ADA, juntamente com os transportadores de nucleosídeos, é a principal reguladora da concentração de adenosina sérica, e está envolvida no desenvolvimento das respostas inflamatórias e na produção de citocinas (ANDERSON et al. 1996; ZIDEK, 1999). Duas isoformas principais da ADA foram isoladas e caracterizadas. A ADA1 existe em todos os tecidos e representa a principal atividade da ADA na maioria dos tecidos. A ADA2, por outro lado, é o principal isoenzima provenientes de monócitos e macrófagos (GAKIS, 1996).

Nos últimos anos, o papel destas enzimas tem sido avaliado em várias doenças como o câncer (ARAÚJO et al., 2005), o diabetes (LUNKES et al., 2003), o infarto agudo do miocárdio (BAGATINI et al., 2008), síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (LEAL et al., 2005), artrite reumatóide (GOODARZI et al., 2010),



tuberculose (GOODARZI et al., 2010) e esclerose múltipla (SPANEVERELLO et al., 2010), demonstrando que elas podem ser importantes alvos terapêuticos em muitas destas situações patológicas. No entanto, o papel das ectonucleotidases bem como da AChE em desordens genéticas como a SD ainda permanece a ser elucidado.

Sendo assim, devido aos mecanismos ainda pouco compreendidos em relação à imunodeficiência na SD, este trabalho teve como objetivo avaliar o papel de importantes enzimas regulatórias envolvidas na resposta imune em linfócitos e em soro, bem como os níveis de citocinas pró- e anti-inflamatórias destes pacientes com a finalidade de contribuir para a busca de novas terapias que possam beneficiar pessoas portadoras da Trissomia do 21.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a atividade das ectonucleotidasas e acetilcolinesterase, bem como os parâmetros hematológicos e inflamatórios em amostras de portadores de Síndrome de Down.

### **2.2 Objetivos específicos**

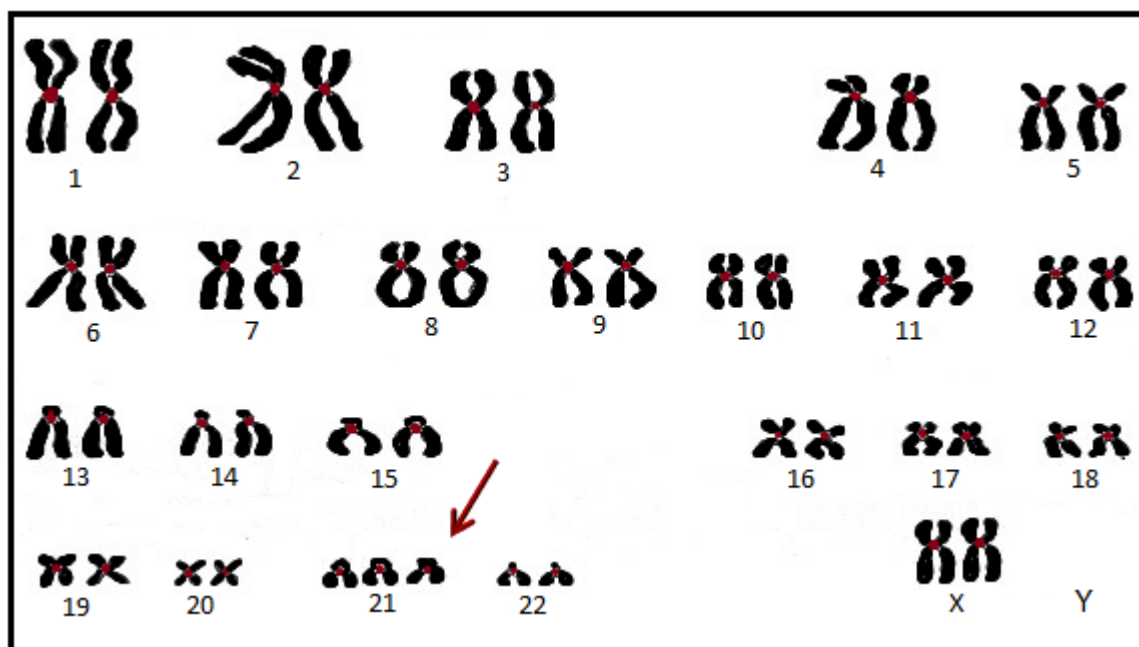
- Avaliar os parâmetros hematológicos tais como leucograma, eritrograma e plaquetograma de portadores de Síndrome de Down e de indivíduos controle.
- Determinar a atividade das enzimas NTPDase1 e acetilcolinesterase em linfócitos de portadores de Síndrome de Down e de indivíduos controle.
- Analisar a atividade da adenosina deaminase em soro de portadores de Síndrome de Down e de indivíduos controle.
- Investigar os níveis séricos das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-10 de portadores de Síndrome de Down e de indivíduos controle.

### 3. Revisão de Literatura

#### 3.1 Síndrome de Down

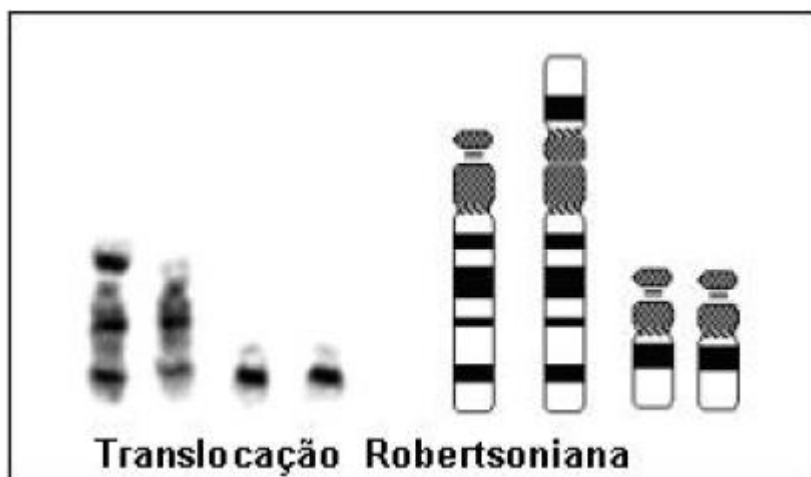
A síndrome de Down (SD) foi originalmente descrita pelo médico pediatra John Langdon Down em 1866 (JORDE et al., 2000). No entanto, somente em 1959, com o auxílio da citogenética, a equipe do Dr. Jerome Lejèune, desvendou a presença de um cromossomo 21 extra (BORGES & ROBINSON, 2001).

O excesso de material genético proveniente do cromossomo 21 pode ocorrer de três formas distintas: forma livre, em que há a presença de um cromossomo 21 extra (Figura 1); translocação cromossômica, mais especificamente a Translocação Robertsoniana (TR) (Figura 2), na qual há a inserção de um dos braços do cromossomo 21 em outro cromossomo, mais comumente nos 13, 14, 15, 22 ou no próprio 21 e de mosaico, onde parte de células do indivíduo exibem cariótipos normais, enquanto as demais apresentam a trissomia do cromossomo 21 (GRIFFITHS, 2001; JONES, 1997; YANG et al., 2002).



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

A trissomia livre do cromossomo 21 resulta, aparentemente, da não disjunção primária que ocorre na divisão reducional da meiose para a formação do gameta materno, os cromossomos pareados não se separam normalmente para os polos no final da anáfase da meiose I ou da meiose II e, como resultado, um ovócito recebe dois cromossomos 21 (SNUSTAD, 2001).



**Figura 2.** Translocação do tipo Robertsoniana, mostrando o cromossomo completo. (Adaptado de JONES, 1998)

A importância clínica da TR é que ela leva as alterações responsáveis pela maior parte dos casos de recorrência familiar da SD (NUSSBAUM, 2002). A TR que foi chamada por White em 1945 de translocação por fusão cêntrica, constitui um tipo especial de translocação recíproca que ocorre entre autossomos acrocêntricos, e podem iniciar-se pela fratura dos cromossomos em regiões muito próximas ao centrômero, sendo que em um dos cromossomos a quebra ocorre no braço superior, enquanto no outro ela se dá no braço inferior. Em consequência disso, os segmentos trocados entre eles constituem braços cromossômicos praticamente completos (JONES, 1998).

Na maioria dos casos, as mães desses indivíduos são clinicamente normais, porém têm apenas 45 unidades cromossômicas, uma das quais é formada pelo cromossomo que tem a translocação e outra por um cromossomo 21 livre. Assim, seu conjunto de genes é praticamente normal, apesar de terem uma unidade cromossômica a menos. Em vários casos o pai, e não a mãe é o portador da translocação (GRIFFITHS, 2001). Alguns pacientes desse tipo tem, entretanto, mãe e pai com cariótipo normal, o que leva a admitir que a translocação ocorreu durante

a gametogênese de um dos pais, ou que um deles era um mosaico com a translocação presente nas células das gônadas (GRIFFITHS, 2001).

Mães que já geraram uma criança com SD e que são portadoras da translocação apresentam um risco de 12% de gerar outra criança com SD e, quando é o pai, um risco de 3%. A razão deste fato ainda não está esclarecida. Sempre que uma criança apresentar SD devido à presença da translocação é indicada a realização do cariótipo dos pais. Em cerca de 3/4 dos portadores da SD, a translocação não está presente num dos genitores, sendo decorrente de um erro durante a gametogênese de um dos progenitores, originando um óvulo ou um espermatozóide apresentando uma translocação, podendo, assim, dar origem ao modelo mosaico com células normais e células com 45 cromossomos. Nos casos envolvendo a translocação, o risco de recorrência para nascimento de outros filhos afetados é de 2 a 3%. Os portadores de SD devido a translocações são indistinguíveis fenotipicamente daqueles com trissomia livre e, também, não há relação entre a translocação cromossômica e a idade materna (GRIFFITHS, 2001).

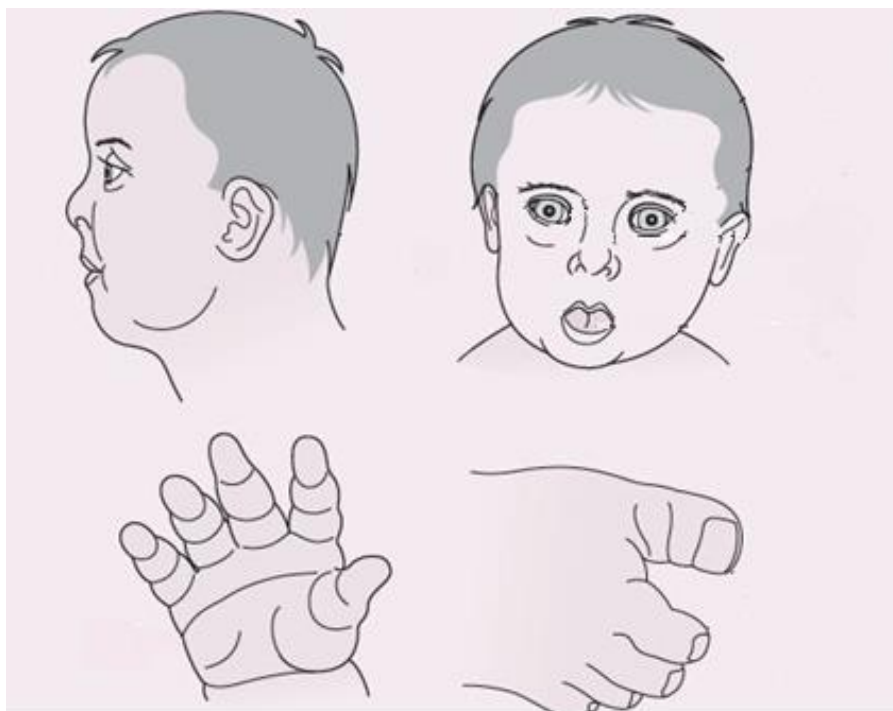
A incidência de SD na população geral é de aproximadamente 1 para 600 a 1.000 nascimentos, mas a ocorrência de SD pode variar conforme a idade materna e paterna: mães com 20 anos de idade o risco é de 0,07%, passando para 0,3% aos 35, 1% aos 40 e quase 3% após os 45 anos (YANG et al., 2002), pais com idade igual ou superior a 55 anos é de 5% (NAKADONARI & SOARES, 2006). No Brasil, estima-se que existam mais de 300.000 pessoas portadoras de SD, demonstrando assim, a importância e a magnitude epidemiológica que esta aneuploidia apresenta (PRADO et al., 2009).

A ocorrência de SD independente da idade pode estar relacionada, entre outros fatores, à mutação de genes que atuam no processo de disjunção meiótica. JAMES et al. (1999) referem que o metabolismo do folato em mães de crianças com SD é anormal e sugerem que uma mutação no gene da 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) associado a altos níveis de homocisteína e baixos níveis de folato no plasma podem aumentar o risco de ter um filho com SD, a MTHFR regula as reações celulares de metilação, podendo levar à hipometilação e, em consequência, a erros na segregação cromossômica. DA SILVA et al. (2002) investigou os genótipos dos polimorfismos dos genes MTHFR, MTR, MTRR e CBS em 150 mães de crianças com SD e controles, e consideraram a mutação C677T do gene MTHFR como um fator de risco para ocorrência do distúrbio. SHONN et al.

(2000) também destacam como importante fator de risco a ocorrência da mutação do gene  $MAD_2$ , essencial à associação das cromátides aos microtúbulos do fuso mitótico.

O diagnóstico da SD pode ser realizado até mesmo antes do nascimento através de exames pré-natais. As principais indicações para o diagnóstico pré-natal são: idade materna, história familiar; um dos pais portador de translocação cromossômica envolvendo o cromossomo 21; malformações fetais diagnosticadas pelo ultra-som e testes de triagem pré-natal alterados. Os métodos de diagnósticos utilizados incluem: coleta de vilosidades coriônicas, amniocentese, cordoncetese e, atualmente, com os avanços da biologia molecular pode-se utilizar novas técnicas de diagnóstico tais como Reação em Cadeia da Polimerase e técnica de FISH a partir de células fetais presente no sangue materno (STANGHELLINI R.B. & CAPONE, 2006). O diagnóstico pós-natal, com base em uma série de sinais e sintomas, pode ser confirmado, posteriormente, pelo estudo cromossômico (BITTLES et al., 2006; IRVING et al., 2008; SILVA & DESSEN, 2002).

Os portadores de SD possuem características dismórficas, produzindo um fenótipo distinto e característico, tais como a hipotonia observada em recém-nascidos, baixa estatura e braquicefalia com um occipúcio achatado. O pescoço é curto, apresentando pele redundante na nuca. A ponte nasal é plana, as orelhas são de implantação baixa e possuem uma aparência dobrada típica, os olhos exibem manchas de Brushfield ao redor da margem da íris. A boca permanece aberta, muitas vezes o paciente mostra a língua sulcada e saliente. As mãos são curtas e largas, frequentemente com uma única prega palmar transversa (“prega simiesca”) e os quintos dedos defletidos, ou clinodactilia. Os pés mostram um amplo espaço entre o primeiro e segundo dedos com um sulco estendendo-se próximo à face plantar (Figura 3) (THOMPSON et al., 1993; LIMA, 1996).



**Figura 3.** Características fenotípicas dos portadores de Síndrome de Down (Fonte: HOLM et al., 1993).

Juntamente com as alterações fenotípicas, várias patologias têm sido associadas com a SD. Em torno de 50% das crianças são acometidas por cardiopatias congênitas, sendo que a comunicação interventricular, defeito no septo atrioventricular, permanência do canal arterial e tetralogia de Fallot estão entre as alterações mais frequentes (ROIZEN, 2002). Dentre outras condições encontradas destacam-se os problemas auditivos, convulsões, problemas neurológicos, obesidade, envelhecimento precoce e diabetes mellitus que ocorre em apenas 1% deste grupo. Dentre as doenças autoimunes são comuns o hipotireoidismo, a artrite reumatóide e a doença celíaca (COOLEY & GRAHAM, 1991; ZACHOR et al., 2000; ROIZEN, 2002; DA ROSA et al., 2008).

Além dessas alterações, portadores da SD apresentam distúrbios psiquiátricos em até 25% dos casos sendo a demência de Alzheimer a mais prevalente, surgindo precocemente por volta dos 40 anos de idade. Além disso, tem sido descrito uma frequência aumentada de leucemia linfoblástica aguda que atinge 1 a cada 300 indivíduos (WISEMAN et al., 2009) e doenças infecciosas (MCGROTHER & MARSHALL, 1990; RIBEIRO et al., 2003). Dentre as infecções mais prevalentes destacam-se as infecções respiratórias como as mais

significativas, sendo a principal causa de admissão hospitalar e mortalidade entre os portadores (DOULL, 2001; MCGROTHER & MARSHALL, 1990).

O aumento da suscetibilidade às infecções vem sendo estudado há mais de 30 anos, e os estudos indicam que a SD é a síndrome genética com maior reconhecimento referente a alterações imunológicas (CRUZ et al., 2009). De fato, muitas diferenças entre o sistema imune de portadores da SD e indivíduos não-Down foram encontradas ao longo dos anos, e várias hipóteses foram formuladas, porém muitas alterações imunológicas ainda não foram completamente elucidadas (GOLDACRE et al., 2004).

### **3.2 Alterações imunológicas relacionadas com a Síndrome de Down**

Como descrito anteriormente, a SD está associada a uma variedade de condições patológicas, incluindo a imunodeficiência, a qual tem contribuído de maneira significativa para a morbidade e mortalidade destes indivíduos. De fato, muitas alterações no sistema imune de portadores da trissomia do 21 já foram descritas na literatura como pode-se observar na tabela abaixo:



**Tabela 1.** Achados relevantes encontrados em estudos realizados nas últimas décadas referente às alterações do sistema imune dos portadores de SD. (Adaptado de KUSTERS et al. 2011)

		Referência
<b>Imunoglobulinas</b>		
	<b>Nível</b>	
IgG	Aumentado	NESPOLI, 1993
IgM	Diminuído	UGAZIO, 1990
IgA	Aumentado	NESPOLI, 1993
IgG1	Aumentado	BARRADAS, 2002
IgG2	Diminuído	BARRADAS, 2002
IgG3	Aumentado	BARRADAS, 2002
IgG4	Diminuído	BARRADAS, 2002
<b>Resposta a Vacinações</b>		
	<b>Resposta</b>	
Pneumocócica	Diminuído	UGAZIO, 1990
Tétano	Diminuído	PHILIP, 1986
Pertussis	Diminuído	LIVOLTE, 1996
Hepatite B	Diminuído	GARCIA, 1990
Hepatite A	Normal	FERREIRA, 2004
Influenza	Diminuído	PHILIP, 1986
Polio (Oral)	Diminuído	MCKAY, 1978
<b>Subpopulação de Linfócitos</b>		
	<b>Nível</b>	
NK - CD3/CD16/CD56	Diminuído	HINGH, 2005
Linfócitos B -CD19	Diminuído	HINGH, 2005
Linfócitos T - CD3	Diminuído	HINGH, 2005
Linfócitos T helper - CD4/CD3	Diminuído	HINGH, 2005
Linf. T citotóxicos - CD8/CD3	Diminuído	HINGH, 2005
Razão Th1/Th2	Aumentado	FRANCIOTTA, 2006
Razão CD4/CD8	Aumentado	CUADRADO, 1996

Vários estudos têm demonstrado uma série de alterações anatômicas e funcionais do timo. O timo é o órgão essencial para a maturação de linfócitos T, e o seu tamanho e a sua capacidade de maturação é menor em indivíduos com trissomia do 21 (KUSTERS et al., 2011). Em consequência disso, ocorre uma diminuição da porcentagem de linfócitos T que ostentam os receptores de células T (TRC -  $\alpha/\beta$ ) afetando a resposta imune adaptativa desses indivíduos (MURPHY et al., 1990; HABERMEHL et al., 2003; JOSHI et al., 2011). Os TRC's são essenciais para a ligação com o complexo de histocompatibilidade (MHC) e está diminuído em crianças com SD (KUSTERS et al., 2011). Bloemers et al. (2011), em seu estudo, encontraram valores duas vezes menores para a atividade de TRC's em pacientes

SD em relação ao controle, tanto para linfócitos T-CD4 quanto para linfócitos T-CD8 e uma diminuição do número de TRC's apenas em linfócito T-CD8 (MURPHY et al., 1990).

Além disso, outros estudos também demonstram um aumento no número de linfócitos T-CD8 e uma diminuição no número de linfócitos B (TROTТА et al., 2011). Essa diminuição no número de linfócitos B já é observada em recém-nascidos e não é revertida com o avanço da idade (CETINER et al., 2010).

Outra forma indireta de observar a função dos linfócitos B e T dos portadores da SD é em relação às respostas de vacinação. A resposta de anticorpos específicos para antígenos de proteínas dependentes de células T requer o funcionamento concomitante entre os linfócitos T e B, e a atividade individual dos linfócitos B, ao passo que a resposta imune aos antígenos polissacarídeos células T-dependentes é determinada pela função individual dos linfócitos B (WEISKOPF et al, 2009). Nos portadores de SD, as respostas de anticorpos específicos de células T-dependente e células T-independente às vacinas são quantitativamente inferiores e diminuem mais rapidamente a sua afinidade em relação a indivíduos sadios, sugerindo assim uma alteração na comunicação entre os linfócitos T e B na SD (KUSTERS et al., 2011; COSTA-CARVALHO, et al., 2006; JOSHI et al., 2011).

Sabe-se que embora os níveis séricos de imunoglobulinas permanecem estáveis durante o envelhecimento das pessoas com Down, os anticorpos gerados na velhice são de baixa afinidade devido a uma diminuição da expansão clonal dos linfócitos B (KUSTERS et al., 2011). Também tem sido relatado uma diminuição do número de linfócios T helper do tipo 2 (Th-2), essenciais para a resposta imune humoral em portadores da trissomia do cromossomo 21 (ROAT et al., 2008).

As células do sistema imune são capazes de liberar uma série de mediadores inflamatórios. Esses mediadores são responsáveis, muitas vezes, pelo aumento da expressão de moléculas de adesão que levam ao recrutamento de mais células do sistema imune, e também podem amplificar a liberação de mais moléculas infamatórias (TROTТА et al., 2011). Linfócitos T helper do tipo1 (Th1) produzem citocinas tais como IFN- $\gamma$ , IL-2 e o TNF- $\alpha$  que estimulam respostas de linfócitos T citotóxicos bem como imunoglobulinas do tipo IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub>, enquanto que os linfócitos Th2 produzem as citocinas, tais como: IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que estimulam respostas de anticorpos pelos linfócitos B. Os Th2 também induzem a produção de IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>4</sub>. Nesse contexto, adultos com SD têm percentagens

significativamente mais elevados de IFN- $\gamma$  e uma maior relação Th1/Th2. Isso reflete no aumento dos níveis de IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> e diminuição dos níveis de IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>4</sub> na SD (FRANCIOTTA et al., 2006). Mehta et al. (1993) em seu estudo com um grupo de indivíduos mais velhos com SD, com uma idade média de 55 anos, demonstrou níveis elevados de anticorpos da classe IgG1 e os níveis diminuídos da subclasses de IgG2 em comparação com indivíduos com mesma idade.

Reforçando estes achados, Trotta et al. (2011) demonstraram que os níveis de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , e IL-10 estão mais elevados em pacientes com SD do que em indivíduos saudáveis. Esses resultados reforçam os indícios de imunossenescência de portadores de SD, com desequilíbrio na produção de citocinas, aparentemente sem evidência de estímulo antigênico e com predomínio da resposta imune inata (LICASTRO et al., 2005).

Baseado no que foi exposto acima, pode-se perceber que várias alterações imunológicas já foram descritas para essa desordem genética, incluindo alterações tanto em linfócitos T quanto B. A busca por terapias que possam interferir nessas disfunções imunes esbarra na necessidade de um melhor conhecimento sobre os aspectos celulares e moleculares envolvidos nessas alterações. As enzimas NTPDases, adenosina desaminase (ADA) e acetilcolinesterase (AChE) atualmente estão bem descritas na literatura, entretanto, o papel dessas enzimas na trissomia do 21 ainda foi pouco investigado. Sendo assim, o estudo destas enzimas na SD poderá apontar novas formas de intervenção terapêutica que possam restaurar a função imunológica em portadores dessa desordem genética.

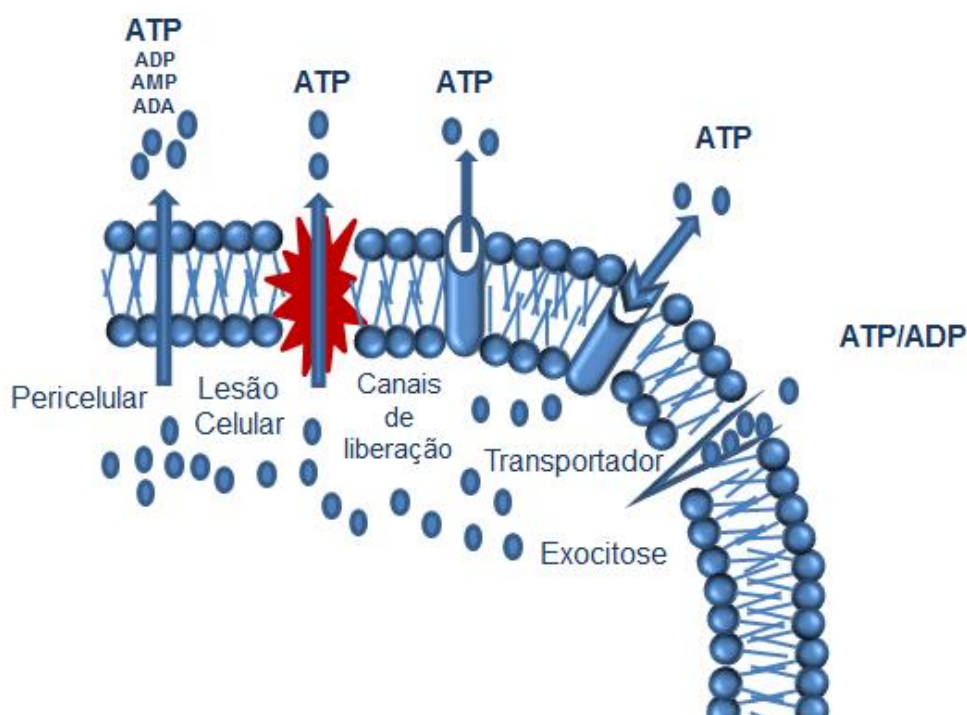
### **3.3 Sistema Purinérgico**

A sinalização purinérgica representa atualmente um importante alvo de estudos devido ao seu papel em modular uma variedade de processos biológicos incluindo respostas imunes e inflamatórias (ROBSON et al., 2006; DI VIRGILIO, 2007).

O sistema purinérgico envolve quatro componentes principais: os nucleotídeos e nucleosídeos de adenina, os transportadores de nucleosídeos, os receptores através dos quais estes nucleotídeos/nucleosídeos exercem seus efeitos, e as ectoenzimas responsáveis pelo controle dos níveis extracelulares destas moléculas (YEGUTKIN et al., 2008).

### 3.3.1 Nucleotídeos e nucleosídeos de adenina

Os nucleotídeos e os nucleosídeos de adenina (ATP, ADP, adenosina) participam de diversos efeitos biológicos (BURNSTOCK, 2007). Durante muito tempo foi atribuído aos nucleotídeos e nucleosídeos ações estritamente intracelulares. Porém, atualmente já está bem estabelecido o conceito de que estas moléculas atuam como mensageiros extracelulares, principalmente o ATP e a adenosina. Os nucleotídeos são liberados por vários mecanismos fisiologicamente relevantes, que incluem a exocitose, a difusão através dos canais transmembranas e via transportadores (YEGUTKIN, 2008). Além disso, essas moléculas são liberadas a partir da lise celular, sendo indicadores de dano celular (Figura 4) (BURNSTOCK, 2007).



**Figura 4.** Demonstração das vias de liberação dos nucleotídeos (adaptado de YEGUTKIN, 2008).

O ATP e a adenosina estão envolvidos na regulação de respostas imunes e inflamatórias. Os linfócitos T liberam ATP durante as fases iniciais de ativação através dos canais Panexina 1 (panx1) (SCHENK et al., 2008). Em outros tipos de células, tais como neutrófilos e monócitos/macrófagos, o ATP é liberado em resposta ao aumento da concentração de cálcio intracelular (LOCOVEI et al., 2006;

KRONLAGE et al., 2010). Esse nucleotídeo pode atuar como uma molécula pró-inflamatória, não só pela estimulação de respostas imunes inatas, mas também favorecendo a ativação de células T (WOEHRLE et al., 2010). O ATP liberado por linfócitos T ativados atua principalmente na estimulação dos receptores P2X e está envolvido na secreção das citocinas INF- $\gamma$  e IL-2 levando a proliferação de linfócitos (LANGSTON et al., 2003), induzindo migração e diferenciação nas células dendríticas (LA SALA et al., 2003), e ainda nos macrófagos estimulando a produção de IL-1 (ELSSNER et al., 2004) e TNF- $\alpha$  (GUERRA et al., 2003).

Em vários modelos animais de doenças inflamatórias e doenças autoimunes, o ATP demonstrou promover a inflamação através de inúmeros mecanismos como: ativação das células do sistema imune inato a partir do estímulo do receptor P2X<sub>7</sub>, com consequente liberação das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18 (DI VIRGILIO, 2007), estimulação das funções efetoras das células T (WOEHRLE et al., 2010) e depleção seletiva do subconjunto de células T regulatórias (ASWAD et al., 2005). No entanto, o ATP induz alterações na membrana celular alterando a sua permeabilidade, desempenhando desta forma uma atividade citotóxica (WEN et al., 2003).

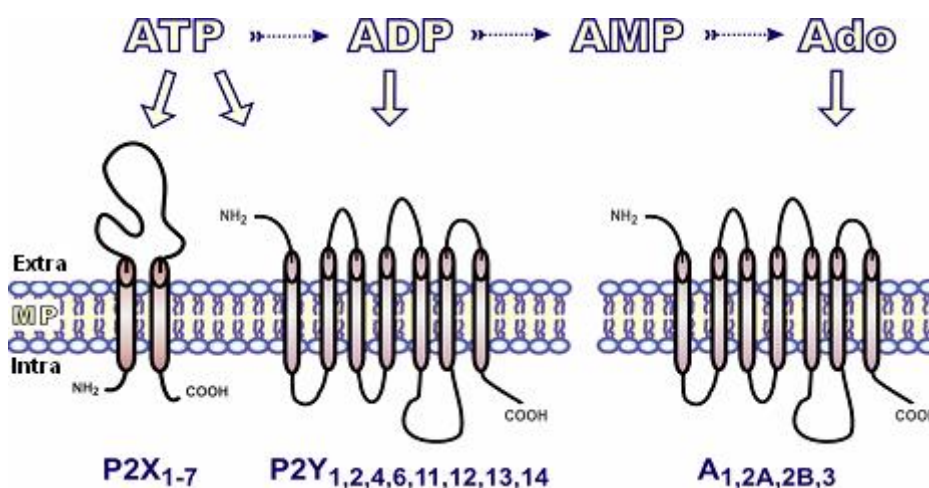
A adenosina, por sua vez, possui ações anti-inflamatórias regulando a função de linfócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e diretamente alterando a produção de citocinas (BOURS et al., 2006; HASKO et al., 2008). Estudos envolvendo camundongos demonstraram que a ativação dos receptores de adenosina, especificamente os receptores A<sub>2A</sub>, em linfócitos T-CD4 leva a uma diminuição das citocinas IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-4 (LAPPAS et al., 2005). Na maioria dos estudos, o foco das investigações está sobre os linfócitos T e pouca informação envolve os linfócitos B. Sendo assim, encontrar uma ligação entre os receptores de adenosina e alterações na função de células B poderia aumentar o conhecimento dos mecanismos que envolvem a adenosina na resposta imune humoral (SCHUETZ et al., 2011; GREBOWSKA et al., 2010).

### **3.3.2 Receptores purinérgicos**

A sinalização induzida pelo ATP e adenosina extracelular é mediada através de receptores purinérgicos localizados na superfície de vários tipos de células (Figura 5) (YEGUTKIN, 2008). Os receptores purinérgicos se dividem em dois

grupos: P2X e P2Y. A família de receptores P2X é composta por sete membros denominados de P2X<sub>1</sub>-P2X<sub>7</sub>. Estes receptores estão ligados a canais iônicos seletivos para cátions monovalentes e bivalentes. A porção amino e carboxi terminais dos subtipos P2X são ambas citoplasmáticas (NORTH & SURPRENANT, 2000). Os receptores P2Y são subdivididos em oito subtipos: P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>, e P2Y<sub>14</sub> e são receptores acoplados a proteína G apresentando sete regiões transmembrana com a porção aminoterminal voltada para o meio extracelular e a porção carboxiterminal voltada para o meio citoplasmático (LEE et al., 2003).

Já os receptores para adenosina incluem quatro tipos: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub> os quais também são proteínas transmembranas acoplados a proteína G. (ELTZSCHIG, 2009). Os receptores A<sub>2A</sub> são expressos nas células do sistema imune, principalmente em neutrófilos e linfócitos (WALLACE et al., 2010). Estudos farmacológicos demonstraram a função destes receptores no sistema imune, além de desempenharem um papel fundamental em ações anti-inflamatórias (CRONSTEIN et al., 1990, OHTA et al., 2001).

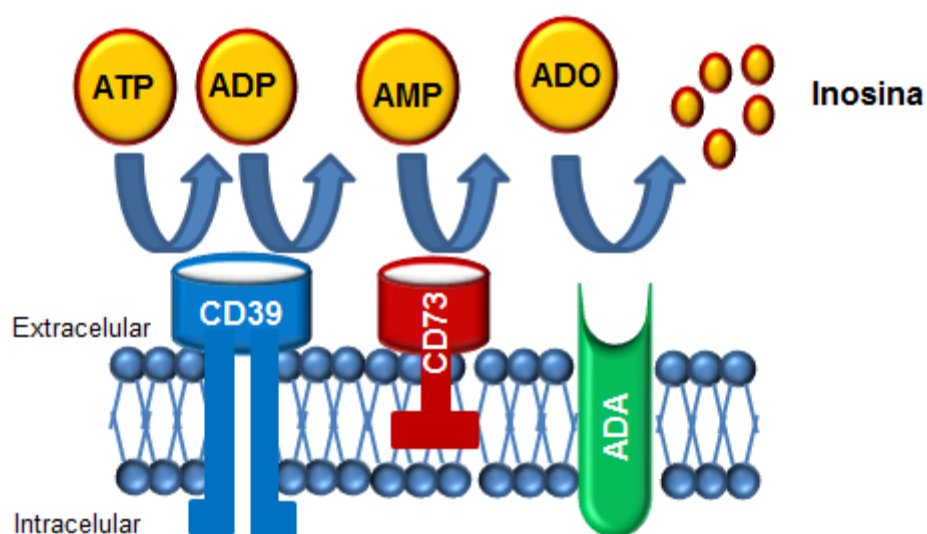


**Figura 5.** Tipos de receptores purinérgicos e seus ligantes (adaptado de YEGUTKIN, 2008).

### 3.3.3 Enzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeos de adenina

A sinalização induzida pelos nucleotídeos e nucleosídeos no meio extracelular pode ser diretamente relacionada com a ação das ectoenzimas, as quais são capazes de controlar a disponibilidade dos agonistas de receptores purinérgicos, como o ATP e a adenosina (ROBSON et al., 2006).

Nesse grupo de enzimas, que também são conhecidas como ectonucleotidasas, estão incluídas: as E-NTPDases, a ecto-5'-nucleotidase (CD73) e a ADA (ROBSON et al., 2006; ZIMMERMANN, 2001). Essas enzimas atuam em conjunto formando uma cascata enzimática que tem início com a ação da NTPDase, a qual hidrolisa ATP e ADP até AMP. Posteriormente, a enzima CD73 hidrolisa o AMP formando a adenosina, a qual é degradada a inosina pela ação da ADA (Figura 6). As ectonucleotidasas tem como função a degradação de nucleotídeos e a formação dos respectivos nucleosídeos, controlando assim o tempo que os mesmos permanecem no meio extracelular (ZIMMERMANN, 2001).



**Figura 6.** Enzimas envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina (Adaptado de ZHANG, 2010).

### 3.3.3.1 NTPDases

As NTPDases são uma família de enzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos di- e trifosfatados. Nos mamíferos foram clonados e caracterizados funcionalmente oito membros desta família de enzimas que diferem quanto à especificidade por substratos, distribuição tecidual e localização celular. Quatro dessas NTPDases estão localizadas na membrana plasmática com o seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (NTPDase1, 2, 3 e 8) enquanto que os outros quatro membros possuem localização intracelular (NTPDase 4, 5, 6 e 7) (ROBSON et al., 2006). Essas enzimas possuem um alto grau de similaridade na sua sequência de aminoácidos particularmente em cinco regiões conhecidas como “regiões conservadas da apirase” as quais são de extrema importância para a função catalítica (HANDA & GUIDOTTI, 1996).

A NTPDase1 foi a primeira enzima a ser descrita da família. Essa NTPDase1 é uma ectoenzima ancorada a superfície celular através de dois domínios transmembranas próximos ao grupamento amino e carboxi terminal com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular, sendo capaz de hidrolisar tanto o ATP quanto o ADP, formando AMP na presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (ZIMMERMANN, 2001).

A NTPDase1 já foi caracterizada em vários tipos celulares incluindo monócitos, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos B, bem como em alguns subconjuntos de células T e NK (DWYER et al., 2007; DEAGLIO et al., 2011; LEAL et al., 2005). Tem sido sugerido que a NTPDase1 possui um papel fundamental no controle nas funções dos linfócitos (FILIPPINI et al., 1990), incluindo o reconhecimento de antígenos e/ou ativação de atividades efetoras das células T citotóxicas. Além disso, a NTPDase1 pode também afetar a modulação celular através do controle dos níveis de ATP extracelulares (DWYER et al., 2007).

Sendo assim, devido à sua atividade e distribuição, a NTPDase1 tem um papel crucial na modulação e no efeito do ATP na inflamação. Sendo assim, nos últimos anos a atividade dessa enzima tem sido estudada em muitas condições patológicas (ARAÚJO et al., 2005; LUNKES et al., 2003; BAGATINI et al., 2008). De grande importância é o fato que a atividade dessa enzima encontra-se alterada em doenças inflamatórias e autoimunes (LEAL et al., 2005, SPANEVELLO et al., 2010), sugerindo assim que ela pode ser um importante alvo terapêutico em doenças as



quais a resposta imunológica está alterada. Cabe ressaltar que o papel dessa enzima ainda não foi investigado na SD, uma desordem genética caracterizada por imunodeficiência.

### 3.3.3.2 Adenosina deaminase

A adenosina desaminase (ADA) é uma enzima responsável pela desaminação de adenosina e desoxiadenosina nucleosídeos, formando inosina e desoxiinosina, respectivamente (PHILLIS, 1991). Duas isoformas da ADA já foram isoladas e diferem em relação ao peso molecular e propriedades cinéticas. A ADA<sub>1</sub> está presente em todos os tecidos e representa a maior atividade da ADA, a ADA<sub>2</sub> é a principal isoenzima da ADA presente no soro (GAKIS, 1996; UNGERER, 1992).

Um aumento da atividade total da ADA no soro, em processos inflamatórios, pode ser explicado pelo fato de que os monócitos e macrófagos regulam os níveis de adenosina, neste contexto há um aumentando especificamente a isoforma ADA<sub>2</sub> (FOZARD & HANNON, 1999). Sendo assim, as mudanças na atividade da ADA vêm sendo utilizadas amplamente para o acompanhamento das alternâncias das respostas do sistema imunológico (POURSHARIFI et al., 2009) e também como biomarcador de diagnóstico na triagem de doenças infecciosas (CORRAL et al., 2004).

Em particular, a ADA tem um papel importante na proliferação e diferenciação das células linfóides e desempenha um papel importante em várias fases de maturação de linfócitos (KHODADADI et al., 2011). Por outro lado, efeitos citotóxicos dos metabólitos da adenosina sobre os linfócitos de indivíduos com alterações no gene que codifica a ADA pode levar a imunodeficiência combinada severa (AIUTI et al., 2009).

A ADA é a principal reguladora da concentração de adenosina no plasma que está envolvida no desenvolvimento da resposta inflamatória e da produção de citocinas (ZIDEK, 1999). Estudos anteriores demonstraram alterações significativas da atividade da ADA em pacientes com artrite reumatóide, tuberculose, HIV positivos, bem como em pacientes com outras deficiências imunológicas (GOODARZI et al., 2010; POURSHARIFI et al., 2009). Estudos realizados na década de 80 demonstraram que a atividade da ADA encontra-se aumentada em linfócitos e eritrócitos de portadores de SD (Puukka et al., 1981; 1982, 1986) sugerindo assim,

que esta enzima pode ter um envolvimento nas disfunções imunológicas encontradas nessa síndrome.

### 3.4 Acetilcolinesterase

Além das enzimas do sistema purinérgico (NTPDases e ADA), outra enzima que possui funções importantes relacionadas a resposta imune é a AChE. Atualmente, tem sido bem documentado na literatura que os linfócitos possuem um sistema colinérgico completo incluindo acetilcolina (ACh) a enzima colina acetiltransferase, receptores nicotínicos e muscarínicos bem como a enzima AChE (KAWASHIMA & FUJII, 2000).

A ACh é uma molécula sintetizada a partir da colina, um produto do metabolismo dos lipídeos da dieta, e a acetil-CoA, um produto do metabolismo celular, através da ação da enzima colina aciltransferase sendo armazenada em vesículas onde permanece até sua liberação (SOREQ & SEIDMAN, 2001; PRADO et al., 2002). A função clássica da ACh é atuar como um neurotransmissor endógeno das sinapses e junções neuroefetoras colinérgicas tanto do sistema nervoso central (SNC) quanto periférico (SNP). Entretanto, estudos demonstram que a ACh pode ser sintetizada e liberada por linfócitos e que esta molécula possui um função crucial na resposta imunológica (KAWASHIMA & FUJII, 2000).

A ACh sintetizada é liberada pelos linfócitos e atua através de receptores nicotínicos e muscarínicos dos próprios linfócitos (KAWASHIMA & FUJII, 2000). A modulação da resposta imune inata pela ACh é específica e dependente das células imunes. Por exemplo, a ACh produzida pelos linfócitos tem funções específicas como controlar o recrutamento e aumentar a capacidade fagocítica dos neutrófilos e macrófagos (REARDON et al., 2013). Além disso, a ACh induz a sinalização através de receptores nicotínicos e muscarínicos nos macrófagos sendo que a ativação de receptores nicotínicos  $\alpha 7$  reduz a produção de TNF- $\alpha$  (WANG, 2003).

A ação da ACh é finalizada pela sua hidrólise pela AChE com liberação de ácido acético e colina (SOREQ & SEIDMAN, 2001). A AChE também chamada de colinesterase verdadeira ou específica, possui um papel regulatório clássico na neurotransmissão colinérgica. Ela é responsável pela hidrólise rápida da acetilcolina modulando a concentração deste transmissor na fenda sináptica. Entretanto, devido a presença de um sistema colinérgico não neuronal em linfócitos, essa enzima

também vem emergindo como um importante alvo terapêutico para regular respostas imunes e inflamatórias.

A AChE é uma glicoproteína globular encontrada nos neurônios colinérgicos e em concentrações elevadas na junção neuromuscular e também em eritrócitos, plaquetas e linfócitos (MASSOULIÉ et al., 1993; SILVA, 1998). O sítio ativo da AChE é composto por uma tríade catalítica composta por resíduos de aminoácidos de serina-203, histidina-447 e glutamato-334. A AChE é classificada como uma serina hidrolase e seu mecanismo catalítico assemelha-se ao de outras hidrolases, onde o grupamento hidroxila da serina torna-se altamente nucleofílico por um sistema de reposição de cargas que envolvem o grupamento carboxila do glutamato, o imidazol da histidina e a hidroxila da serina (SUSSMAN et al., 1991).

Estudos relatam que a inibição da AChE reduz a proliferação de linfócitos, porém o mecanismo envolvido neste processo permanece desconhecido (NIZRI., 2005). Além disso, o sistema colinérgico extraneural dos linfócitos possui ação direta sobre o controle da resposta imune inata. Gnatek et al. (2012) demonstraram em seus experimentos que a ACh leva a uma diminuição dos níveis de IL1- $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Além disso, Wang et al. (2010) em estudo com cultura de células gliais tratadas com ACh e inibidores da AChE confirmaram a ação anti-inflamatória da ACh. Como consequência de seu papel fisiológico chave a atividade dessa enzima também tem sido estudada em várias doenças inflamatórias. No entanto o papel da AChE não tem sido investigado em linfócitos de portadores de SD.

Sendo assim, considerando o importante papel da AChE bem como o notável papel imunomodulador dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina, torna-se relevante avaliar esses parâmetros em amostras de portadores de SD, uma vez que estes poderão futuramente ser úteis na clínica médica para o monitoramento das alterações imunológicas encontradas nessa síndrome genética.

## 4. Manuscrito

**The ectonucleotidase and acetylcholinesterase activities are altered in lymphocytes of Down syndrome subjects: relation with inflammatory parameters**

Rodrigo Rodrigues, Gabriela Debom, Fabiano Soares, Caroline Machado, Jéssica Pureza, William Peres, Marta Frescura Duarte, Maria Rosa Chitolina Schetinger, Elizandra Braganhol, Roselia Spanevello

*O manuscrito encontra-se nas normas na revista a qual foi submetido:  
Clinica Chimica Acta*

**The ectonucleotidase and acetylcholinesterase activities are altered in lymphocytes of Down syndrome subjects: relation with inflammatory parameters**

Rodrigo Rodrigues<sup>1</sup>, Gabriela Debom<sup>1</sup>, Fabiano Soares<sup>1</sup>, Caroline Machado<sup>1</sup>,  
Jéssica Pureza<sup>1</sup>, William Peres<sup>1</sup>, Marta Frescura Duarte<sup>2</sup>, Maria Rosa Chitolina  
Schetinger<sup>2</sup>, Elizandra Braganhol<sup>1</sup>, Roselia Spanevello<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário S/N, Pelotas, RS, Brasil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900 - Santa Maria, RS, Brasil.

**Corresponding author:**

Roselia Maria Spanevello, PhD

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário- Capão do Leão 96010-900 Pelotas, RS, Brasil.

E-mail addresses: [rspanevello@gmail.com](mailto:rspanevello@gmail.com)

Phone: +55 53 39217233

## Abstract

Down Syndrome (DS) is a chromosomal alteration characterized by the presence of an extra copy of chromosome 21. People with DS have an increased susceptibility to infections and autoimmune disorders. However, the molecular mechanisms leading to the immune defects have not been fully elucidated. ATP, adenosine, and acetylcholine contribute to fine-tuning immune responses and NTPDase, adenosine deaminase (ADA) and acetylcholinesterase (AChE) are important enzymes that control the extracellular levels of these molecules at the site of inflammation. In this study the activities of these enzymes were evaluated, as well as hematological parameters, cytokine levels such as IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL10 in the lymphocytes and serum from DS and healthy people. The population consisted of 23 subjects with DS and 23 healthy subjects as a control group. Blood was obtained from each subject and used for lymphocyte and serum preparation. Results showed that NTPDase activity using ADP as substrate was significantly increased in the lymphocytes of DS patients in relation to the control group ( $P \leq 0.05$ ); however, no alterations were observed on ATP hydrolysis and hematological parameters. A significant increase was on AChE activity in the lymphocytes and ADA activity in the serum of DS patients when compared to healthy subjects ( $P \leq 0.05$ ). In DS subjects an increase in the levels of IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  and a decrease in the IL-10 levels were also observed ( $P \leq 0.0001$ ). These findings suggest that alterations in NTPDase, ADA and AChE activities as well as changes in cytokines levels may contribute to immunological alterations observed in DS.

**Key words:** Down syndrome, lymphocytes, NTPDase, adenosine deaminase, acetylcholinesterase, cytokines, hematological parameters.

## 1. Introduction

Down syndrome (DS), also known as trisomy 21, is a chromosomal alteration characterized by the presence of an extra copy of chromosome 21 [1,2]. It is the most common genetic disorder affecting one in 700 newborns [3]. Data from literature showed that subjects with DS have an increased susceptibility to infections and autoimmune diseases, which are the main cause of mortality and morbidity observed in this genetic alteration [4].

Immune system dysfunction in DS has been associated to B lymphocyte decreased number, T-cell subset modifications as well as anti and pro-inflammatory cytokine level alterations [5-8]. However, the molecular mechanisms leading to immune defects and the contribution of these alterations to higher risk of infections have not been fully elucidated.

Extracellular adenine nucleotides and nucleosides such as ATP and adenosine have been recognized as key components of immune and inflammatory processes [9]. ATP, acting through specific cell surface purinergic receptors, is involved in pro-inflammatory actions such as lymphocyte stimulation and proliferation and cytokine release, including IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  [9,10]. In opposite, adenosine, a product of ATP hydrolysis, exhibits potent anti-inflammatory and immunosuppressive actions by inhibiting both proliferation of T cells and secretion of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  [11,12].

Extracellular ATP and adenosine levels are regulated by cell surface ectoenzymes such as ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) and adenosine deaminase (ADA). NTPDase1 is involved in the breakdown of ATP and ADP in to AMP which is hydrolyzed by ecto-5'-nucleotidase to adenosine [13,14]. ADA is considered a key enzyme in purine metabolism, catalyzing the irreversible

deamination of adenosine to inosine, thus regulating extracellular adenosine availability [15]. Since NTPDase1 and ADA activities potentially modulate extracellular levels of pro-inflammatory ATP and anti-inflammatory adenosine, the role of these enzymes has been evaluated in the pathogenesis of immune and inflammatory diseases [16,17].

Acetylcholinesterase (AChE) is another enzyme involved in immune functions. This enzyme is expressed in both T and B lymphocytes and promotes the hydrolysis of the acetylcholine (ACh) to choline and acetate [18]. ACh is known to promote anti-inflammatory actions by suppressing the production of pro-inflammatory cytokines [19,20]. (In this line,) AChE emerges as a potential contributor to the pathways controlling inflammatory and immune responses mediated by muscarinic and nicotinic receptors [21]. As a consequence of its activity AChE has been studied in different pathological and experimental conditions [22].

Although the importance of NTPDase1, AChE and ADA in modulating inflammatory and immune responses, to the best of our knowledge, there are few reports evaluating the activity of these enzymes in DS subjects. Considering the alterations in lymphocyte functions observed in DS, this study evaluated the NTPDase and AChE activities in lymphocytes, as well as the levels of cytokines and ADA activity in the serum of DS.



## 2. Material and Methods

### 2.1. Chemicals

Nucleotides, Trizma base, Acetylthiocholine iodide (ASCh), 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), Ficcoll - Histopaque (Lymphoprep™) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). All other reagents used in the experiments were of analytical grade high purity.

### 2.2. Study population

The sample consisted of 23 DS and 23 healthy individuals as a control group. The general characteristics of the individuals are shown in Table I. All subjects gave written informed consent to participate in this study. Written informed consents were obtained from parents/guardians of DS subjects. The Human Ethics Committee of the Health Science Center from Universidade Federal de Pelotas approved the study protocol. Twelve milliliters of blood were obtained from each subject and used for lymphocyte preparation and other biochemical determinations described as follows.

### 2.3. Hematological determination

A complete hemogram was performed in the blood samples collected in tubes containing 7.2 mg dipotassium EDTA anticoagulant (EDTA-K2). The hematological parameters were estimated by using an automatic counter Horiba ABX Pentra C + 60 (Horiba ® ABX), which associates the principles of electrical impedance, flow cytometry, and cytochemistry spectrophotometry for blood analysis. Hematological parameters of the DS group are shown in Table 2.

#### *2.4. Isolation of lymphocytes from human blood and protein determination*

Lymphocytes were isolated from human blood collected with EDTA and separated on Ficoll-Histopaque density gradients as described by Böyum (1968). Protein was measured by the Coomassie blue method according to Bradford (1976) using serum albumin as standard.

#### *2.5. NTPDase enzyme assays in lymphocytes*

After lymphocyte isolation, NTPDase activity was determined as described by Leal (2005) in a reaction medium containing 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM glucose and 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), at a final volume of 200  $\mu\text{L}$ . Twenty microliters of intact mononuclear cells suspended in saline solution were added to reaction medium (2-4  $\mu\text{g}$  of protein) and pre-incubated for 10 min at 37°C. The enzyme reaction was initiated by the addition of substrate (ATP or ADP) at a final concentration of 2 mM and it was stopped after 70 min of incubation by adding 200  $\mu\text{L}$  of 10% trichloroacetic acid (TCA). The released inorganic phosphate (Pi) was assayed by the method of Chan (1986) using malachite green as colorimetric reagent and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  as standard. Controls were carried out by adding the enzyme preparation after TCA addition to correct non-enzymatic nucleotide hydrolysis. All samples were run in triplicate and the specific activity is reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

#### *2.6. AChE enzyme assays in lymphocytes*

After lymphocyte isolation, AChE activity was determined by colorimetric assay as described by Ellman (1961) modified by Fitzgerald (1993). The reaction mixture was composed by 1 mM acetylthiocholine, 0.1 mM 5,5'-dithio-bis-2-

nitrobenzoic acid (DTNB), 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0) and 100  $\mu$ L of intact mononuclear cells suspended in saline solution were added to the reaction. The proteins of all samples were adjusted to 0.1-0.2 mg/mL. The absorbance was read on a spectrophotometer at 412 nm before and after incubation for 30 min at 27°C. All samples were run in triplicate and the specific activity of lymphocyte AChE was calculated from the quotient between lymphocyte AChE activity and protein content and the results were expressed as  $\mu$ mol of AcSch/h/mg of protein.

### *2.7. ADA enzyme assay in serum*

ADA activity in serum was determined according to Giusti (1971). Briefly, 50  $\mu$ L of serum reacted with 21 nmol/L of adenosine (pH 6.5) and the incubation was carried out at 37°C for 60 min. This method is based on the direct production of ammonia when ADA acts in excess of the adenosine. Results were expressed in units per liter (U/L). One unit (1 U) of ADA is defined as the amount of enzyme required to release 1 mmol of ammonia from adenosine per minute at standard assay conditions.

### *2.8. Quantification of Cytokines*

Cytokine quantification was assessed by ELISA using commercial kits for human IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 and IL-10 (eBIO-SCIENCE, San Diego, USA), according to the manufacturer's instructions. The cytokine presence and concentration were determined by the intensity of the color measured by spectrometry in a micro ELISA reader.

## 2.9 Statistical analysis

Data were analyzed statistically by the Student's t-test for independent samples using the program Graphpad Prism 5.  $P \leq 0.05$  were taken to indicate statistical significance. All data were expressed as mean  $\pm$  SEM.

## 3. Results

In the present study, a set of biomarkers of hematological changes was analyzed in 23 adults with DS 12 women with a mean age of 29.33 years and 11 men with a mean age of 26 years (Table I), these biomarkers hematological which comprise: number of cells (neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils and platelets), WBC (white blood cells), RBC (red blood cells), HCT (hematocrit), MCV (mean corpuscular volume) CHCM (mean corpuscular hemoglobin concentration) and hemoglobin. No significant differences were found in any parameter between DS individuals and control group (Table II). The results obtained in the present study showed that both NTPDase and AChE activities were altered in lymphocytes from DS individuals. As it can be observed in Figure 1, NTPDase activity using ADP as substrate was significantly increased in lymphocytes from DS individuals when compared to control group ( $P \leq 0.05$ ). However, no alteration was observed in ATP hydrolysis (Fig. 1). In addition, a statistically significant increase was also observed in AChE activity from lymphocytes of DS when compared to the control group (Fig. 2). Alterations in ADA activity were also observed. Figure 1 shows a significant increase in serum ADA activity in DS subjects when compared to controls ( $P \leq 0.0001$ ).

Figure 2 exhibits the results obtained for cytokines levels in serum from controls and DS subjects. As it can be observed, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  levels were significantly increased in serum from DS subjects when compared to control

group ( $P \leq 0.003$ ). In opposite, the IL-10 levels were decreased in adult (DS) subjects with DS when compared to controls ( $P \leq 0.0001$ ).

#### 4. Discussion

Alterations in the number and function of lymphocytes subsets have been correlated with the incidence of infections and autoimmune diseases in DS [7,28]. In line with this, we evaluated in the present study the role of NTPDase and AChE enzymes in lymphocytes from adult subjects with DS in order to contribute to the understanding of the impaired immunity observed in this genetic disorder. In addition, we also related these findings with hematological and inflammatory parameters.

Attenuation of anti-inflammatory and increase of pro-inflammatory mediators was showed in serum from DS individuals [8]. In agreement to altered immunological response observed in DS, we show in this study a systemic ablation of cytokine levels on DS individuals, which exhibited increased INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 and IL-6 pro-inflammatory cytokine levels, while the anti-inflammatory cytokine IL-10 was decreased. Corroborating with our results, others studies also demonstrated an increase of INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 levels in adults [29,30] and adolescents with DS [31]. Interestingly, Trotta and colleagues [32] showed that mononuclear cells from peripheral blood of adults with DS in culture released spontaneously higher levels of INF- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  when compared to controls. In opposite to our results, Guazzarotti et al. (2009) and Trotta et al. (2011) found increased values for IL-10.

The cytokines IL-1 and IL-6 are considered key orchestrators of immune and inflammatory responses [33]. IL1 stimulates B cell proliferation and maturation and induces immunoglobulin production, while IL-6 secreted by T cells and macrophages stimulates the immune response, which ultimately leads to inflammation [34]. In

addition, IFN- $\gamma$  is considered a pro-inflammatory cytokine because it augments TNF $\alpha$  activity [34]. IL-10 is the most important anti-inflammatory cytokine of immune system by inhibiting the release of Th1 pro-inflammatory cytokines, such as IL-2 and IFN- $\gamma$  [35]. In this context, the alterations in the levels of pro- and anti-inflammatory cytokines obtained in our study reinforce the idea that alterations of cytokine release may contribute to the disruption of an adaptive immune response development [32].

It has been established that purinergic signaling contributes to regulation of inflammatory and immune responses in many pathological conditions [17,36]. In the present investigation, we demonstrated that NTPDase1 activity was altered in lymphocytes of DS subjects when ADP was used as substrate, while no alterations were observed in the ATP hydrolysis. Previous studies also have been demonstrated that the activities of a number of purine metabolizing enzymes are altered in lymphocytes and erythrocytes from DS subjects [37]. These studies suggest that changes in the purine metabolism may be related to the immunological dysfunction found in subjects with DS.

Extracellular ATP is involved in pro-inflammatory function as stimulation and proliferation of lymphocyte [38]. In addition, ATP induces secretion of cytokines like IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-1, TNF- $\alpha$  from activated lymphocytes and macrophages [9,10]. NTPDase1 is the dominant ectonucleotidase in the immune system. It is expressed on surface of immune cells, including macrophages, dendritic cells, B and T lymphocyte subsets and it catalysis the conversion of ATP and ADP to AMP [9,13]. Hydrolysis of ATP by NTPDase1 seems to play a crucial role in immune suppression as it removes pro-inflammatory ATP and also generates immunosuppressive adenosine [39]. Surprisingly, our results show that only ADP hydrolysis was increased in lymphocytes from DS individuals, while the ATP hydrolysis was

unchanged. We suggest that the differential ATP and ADP hydrolysis pattern from DS lymphocytes may result from the contribution of other enzymes able to metabolize ATP. On the other hand, NTPDase1 is involved in the breakdown of ATP and ADP to AMP which is sequentially hydrolyzed by 5'-nucleotidase to adenosine. In addition, it is well known that DS is associated to increased platelet aggregation, which may constitute an additional source of extracellular ADP [13]. Thus, the increase in the ADP hydrolysis observed in lymphocytes from DS subjects may contribute for adenosine production. These alterations may represent an important compensatory mechanism to decrease inflammation and immune response in DS.

The levels of extracellular adenosine are controlled by ADA activity. Here we demonstrated a significant increase of ADA activity in blood serum of DS subjects. Corroborating with our results, others studies also have showed that ADA activity is increased in lymphocytes and erythrocytes from DS subjects [37]. ADA is widely distributed in human, especially in lymphoid tissues [13,20]. ADA activity is ten times greater in lymphocytic cells than in erythrocytes and is essential to lymphocyte differentiation. ADA is known to be divided in two isoenzymes ADA1 and ADA2, which have different molecular weights and kinetic properties. Interestingly, monocytes/macrophages and serum contain ADA2 with low substrate affinity ( $K_m$  for adenosine 2mM) [13]. Serum ADA is increased in many diseases, however the origin of ADA in serum and the mechanism by which serum activity is increased have not been fully elucidated [40].

Adenosine plays a crucial role in the regulation of inflammatory and immune responses by inhibiting lymphocyte activation and decreasing both Th1 and Th2 cytokines secretion through  $A_{2A}$  receptor activation [41]. It is important to note that in serum of DS subjects the up-regulation of ADA activity may degrades adenosine, a

molecule with immunosuppressive and anti-inflammatory actions and thus contribute to high level of the pro-inflammatory cytokines observed in this study.

The next set of experiments we evaluated the AChE activity in lymphocytes from DS and control subjects. Lymphocytes also express a complete cholinergic system consisting of ACh release, muscarinic and nicotinic receptors, choline acetyltransferase and AChE enzymes [42]. T cells were found to contain about three times the amount of ACh when compared to B-cells, and CD4<sup>+</sup> cells showed significantly high levels when compared to CD8<sup>+</sup>. In this line, also has been demonstrated that AChE is expressed in both T and B lymphocytes and has an important role in immune responses because ACh is rapidly hydrolyzed by this enzyme [42].

ACh is known to have anti-inflammatory actions and suppress the production of pro-inflammatory cytokines [18]. Studies have demonstrated that activation the nicotinic receptors in macrophages reduce significantly the liberation of pro-inflammatory cytokines like TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6, whereas production of anti-inflammatory cytokines, as IL-10 is not affected [43,44]. Similarly, Nizri et al. (2006) also demonstrated that the inhibition of AChE activity was able to reduce the levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in lymphocyte culture. In this context, moderate ACh levels are important for controlling immune and inflammatory functions, and AChE enzyme is a key contributor towards sustaining these levels. In fact, it has been demonstrated that inhibitors of AChE reduce lymphocyte proliferation and the secretion of pro-inflammatory cytokines and may attenuate inflammation by increasing the ACh concentration in the extracellular space [21].

In this regard, we observed an increase in the AChE activity in the lymphocytes from DS subjects. This result suggests that the increase of AChE



activity leads to a decrease of Ach level and it may contribute to the pro-inflammatory status. Although the role of lymphocytic cholinergic system is still unclear, alteration in the AChE activity supports the view that this system may contribute to the regulation of the immune responses in DS. These findings open the doors to the discovery of more specific mechanism for the treatment of immunodeficiency in this genetic disorder.

An important aspect to be discussed is that the increase in the lymphocytic enzymes observed in this study can be related to alterations in the lymphocytes function and it is not a consequence of immune cell counting. In fact, our results showed no alterations in number of cells (neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils and platelets) and other hematological parameters such as WBC (white blood cells), RBC (red blood cells), HCT (hematocrit), MCV (mean corpuscular volume) CHCM (mean corpuscular hemoglobin concentration) and hemoglobin between DS and control individuals.

It is well established in the literature that children with DS have many hematological alterations; however, these parameters in adults with DS are poorly documented in the literature. Increase in the VCM [45], neutrofilia [46], leukopenia [47, 48], trombocitopenia [49,50] and anemia [51] have been described in a number of the studies in children and newborns with DS. In addition, it also has been shown that the number of lymphocytes is decreased in the first year of life and the counting of these cells becomes normal over the time [52,53]. Changes in lymphocytes subpopulations such as increase in T-CD8 and NK lymphocytes, and a decrease of B lymphocytes also have been reported [53]. These alterations in the lymphocyte number have been attributed to thymus dysfunction [54-56] and B and T cell apoptosis [57]. In our study, no differences were observed in the lymphocyte

absolute number in adults, possibly these individuals possess a compensatory mechanism, such as an increase in IL-7 and IL-15, which has been reported as inducers of T cell proliferation and survival [53].

In conclusion, we demonstrated that NTPDase, AChE and ADA activities and cytokines levels were altered in DS individuals, suggesting that these alterations are very important in the immune dysfunction observed in this condition. The importance of these findings from clinical and therapeutic points of view should be investigated in future research and may help to devise novel strategies for the treatment of the immunodeficiency characteristic from DS.

### **Acknowledgments**

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial support. We also thank the foundation L'Oréal, UNESCO and Academia Brasileira de Ciências for the program "For Women in Science" which also contributed to financial support for this study development.

## References

- [1] Hernandez D, Fisher E. Down syndrome genetics: unravelling a multifactorial disorder *Hum. Mol. Genet.* 1996;5:1411-16.
- [2] Antonarakis SE, Lyle R, Dermitzakis ET, Raymond A, Deutsch S. Chromosome 21 and Down syndrome: from genomics to pathophysiology *Nature Reviews Genetics* 2004;5:725-38.
- [3] Seltzer MM, Krauss MW, Tsunematsu N. Adults with Down syndrome and their aging mothers: Diagnostic group differences. *American Journal on Mental Retardation* 1993;97:496-08.
- [4] Ram G, Chinen J. Infections and immunodeficiency in Down syndrome. *Clinical & Experimental Immunology* 2011;164:9-16.
- [5] Verstegen R, Kusters M, Gemen E, Vries E. Down Syndrome B-Lymphocyte Subpopulations, Intrinsic Defect or Decreased T-Lymphocyte Help. *Pediatric Research* 2010;67:563-69.
- [6] Guazzarotti L, Trabattoni D, Castelletti E, Boldrighini B, Piacentini L, Piergiorgio D, Beretta S, Pacei M, Caprio C, Viganago A, Natale B, Zuccotti G., Clerici M, Abbeduto L. T Lymphocyte Maturation Is Impaired in Healthy Young Individuals Carrying Trisomy 21 (Down Syndrome). *American Journal on Intellectual and Developmental Disabilities.* 2009;114:100-09.
- [7] Aburawi E, Sould A. Lymphocyte respiration in children with trisomy 21. *BMC Pediatrics* 2012;12:193-98.
- [8] Tanaka M, Giro E, Cavalcante L, Pires J, Apponi L, Valentini S, Spolidório D, Capela M, Rossa C, Scarel-Caminanga R. Expression of interferon  $\gamma$  e interferon  $\alpha$  and related genes individuals with down syndrome and periodontitis. *Cytokine* 2012;60:875-81.

- [9] Bours M, Swennen E, Di Virgilio F, Cronstein B, Dagnelie P. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacology & Therapeutics* 2006;112:358-04.
- [10] Langston H, Ke Y, Gewirtz A, Dombrowski K, Kapp J. Secretion of IL-2 and IFN- $\gamma$ , but not IL-4, by antigen - specific T cells requires extracellular ATP. *The Journal of Immunology* 2003;170:2962-70.
- [11] Chan K, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup> - ATPase activity. *Analytical Biochemistry* 1986;157:375-78.
- [12] Hasko G, Linden J, Cronstein B, Pacher P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev* 2008;7:759-70.
- [13] Yegutkin, G. Nucleotide and nucleoside - converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica et Biophysica Acta* 2008;1783:673-94.
- [14] Zebisch M, Krauss M, Schäfer P, Lauble P, Sträter N. Crystallographic Snapshots along the Reaction Pathway of Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolases. *Structure* 2013;21: 1460-75.
- [15] Phillis JW. Adenosine and adenine nucleotides as regulators of cellular function first. ed. Boca Raton, 1991, Florida, U.S.A: CRC press.
- [16] Leal DBR, Streher CA, Neu TN, Bittencourt FP, Leal CAM, Silva JEP, Morsch VM, Scherlinger MRC. Characterization of NTPDase (NTPDase 1: ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; E.C. 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005;1721:9-11.
- [17] Spanevello RM, Mazzanti CM, Bagatini M, Correa M, Schamatz R, Stefanello N, Thome G. Activities of the enzymes that hydrolyse adenine nucleotides in platelets from multiples sclerosis patients. *Journal of Neurology* 2010;257:24-30.

- [18] Kawashima, K.; Fujii, T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Science* 2003;74:675-96.
- [19] Skok MV, Grailhe R, Agenes F, Changeux JP. The role of nicotinic receptors in B-lymphocyte development and activation. *Life Sciences* 2007;80: 2334-36.
- [20] Reardon C, Duncan GS, Brüstle A, Brenner D. Lymphocyte-derived ACh regulates local innate but not adaptive immunity. *PNAS* 2013;110:1410-15.
- [21] Nizri E, Hamra-Amitay Y, Sicsic C, Lavon I, Brenner T. Anti-inflammatory properties of cholinergic up-regulation: a new role for acetylcholinesterase inhibitors. *Neuropharmacology* 2006;50:540-47.
- [22] Nizri E, Brenner T. Modulation on inflammatory pathways by the immune cholinergic system. *Amino Acids* 2013;45:73-85.
- [23] Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 1968;97:77-89.
- [24] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976;72:248-54.
- [25] Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 1961;7:88-95.
- [26] Fitzgerald BB, Costa LG. Modulation of muscarinic receptors and acetylcholinesterase activity in lymphocytes and brain areas following repeated organophosphate exposure in rats. *Fundamental and Applied Toxicology* 1993;20:210-16.

- [27] Giusti G, Gakis C. Temperature conversion factors, activation energy, relative substrate specificity and optimum pH of adenosine deaminase from human serum and tissues. *Enzyme* 1971;12:417-25.
- [28] Hingh Y, Vossen P, Gemen E, Mulder A, Hop W, Brus F, Vries E. Intrinsic abnormalities of lymphocyte counts in children with down syndrome. *Journal de Pediatria* 2005;147:744-47.
- [29] Franciotta D, Verri A, Zardini E. Interferon-gamma and interleukin-4-producing T cells in Down's syndrome. *Neurosci Lett* 2006;395:67–70.
- [30] Guazzarotti L, Trabattoni D, Castelletti E, Boldrighini B, Piacentini L, Duca P, Beretta S, Pacei M, Caprio C, Vigan Ago A, di Natale B, Zuccotti GV, Clerici M. T lymphocyte maturation is impaired in healthy young individuals carrying trisomy 21 (Down syndrome). *Am J Intellect Dev Disabil* 2009;114:100-09
- [31] 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;23:64-7.
- [32] Trotta MBF, Azul JBS, Wajngarten M, Fonseca SG, Goldberg AC, Kalil JE. Inflammatory and Immunological parameters in adults with Down syndrome. *Immunity & Ageing* 2011;8:4.
- [33] Watkins LR, Goehler LE, Relton J, Brewer MT, Maier S.F. Mechanism of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) hyperalgesia. *Brain-Res.* 1995;692:244-50.
- [34] Dinarello CA, Proinflammatory Cytokines. *Chest* 2000;118:503-08.
- [35] Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 2000;117:1162-72.
- [36] Jacob F, Novo C, Cachert C, Van Crombrugge. Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses. *Purinergic signaling* 2013;84:154-60.

- [37] Puukka R, Puukka M, Linna S, Leppilampi M, Kouvalainen K. Erythrocyte adenosine deaminase, purine nucleoside phosphorylase and phosphoribosyl transferase activity in patients with Down's syndrome. *Clinica Chimica Acta* 1982;126:275-81.
- [38] Trautmann A. Extracellular ATP in the immune system: more than just a danger signal. *Sci Signal* 2009;2:6.
- [39] Parodi A, Battaglia F, Kalli F, Ferrera F, Conteduca G, Tardito S, Stringara S, Ivaldi F, Negrini S, Borgonovo G, Simonato A, Traverso P, Carmignani G, Fenoglio D, Filaci G. CD39 is highly involved in mediating the suppression activity of tumor-infiltrating CD8+ T regulatory lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother* 2013;62:851-62.
- [40] Pourshari WP, Saghiri R, Ebrahimi-Rad M, Nazem H, Pourpak Z, Moin M, Shams S. Adenosine deaminase in patients with primary immune deficiency syndromes: the analysis of serum ADA1 and ADA2 activities. *Clin Biochem* 2009;42:1438-43.
- [41] Haskó G, Cronstein B. Regulation of inflammation by adenosine. *Front Immunol* 2013;8:85.
- [42] Kawashima K, Fujii T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacology & therapeutics* 2000;86:29-48, 2000.
- [43] Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000;405:458–462.
- [44] Wang H. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 2003;421:384-88.

[45] Kim DW, Kim HR, Shin MG, Baek HJ, Kook H, Hwang TJ, Shin JH. Distinctive hematological abnormalities in East Asian neonates and children with down syndrome. *Int Jnl Lab Hem* 2011;33:369-77.

[46] Henry E, Walker D, Wiedmeier SE, Christensen RD. Hematological abnormalities during the first week of life among neonates with Down syndrome: data from a multihospital healthcare system. *Am. J. Med. Genet. A* 2007;143:42-50.

[47] Mclean S, Mchale C, Enright H. Hematological abnormalities in adult patients with Down's syndrome. *Ir J Med Sci* 2009;178:35-38.

[48] Roizen NJ, Amarose AP. Hematological abnormalities in children with Down syndrome. *Am J Med Genet* 1993;46:510-12.

[49] Henry E, Walker D, Wiedmeier SE, Christensen RD. Hematological abnormalities during the first week of life among neonates with Down syndrome: data from a multihospital healthcare system. *Am. J. Med. Genet. A* 2007;143:42-50.

[50] Hord JD, Gay JC, Whitlock JA. Thrombocytopenia in neonates with trisomy 21. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1995;149:824-25.

[51] Tenenbaum A, Malkiel S, Wexler I, Levy-Khademi F, Revel-Vilk S, Stepensky P. Anemia in Children with Down Syndrome. *International Journal of Pediatrics* 2011;Article ID 81354.

[52] Hingh Y, Vossen P, Gemen E, Mulder A, Hop W, Brus F, Vries E. Intrinsic abnormalities of lymphocyte counts in children with down syndrome. *Journal de Pediatria* 2005;147:744-47.

[53] Bloemers BLP, 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. *The Journal of Immunology* 2011;186:000-0.



[54] Papadopoulos N, Simopoulos C, Venizelos J, Kotini A, Skaphida P, Tamiolakis D. Fetal thymic medulla functional alterations in Down's syndrome. *Minerva Med* 2003;94: 181-5.

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

[56] Kusters MAA, Verstegen RHJ, Gemen EFA, Vries E. Intrinsic defect of the immune system in children with Down syndrome: a review. *Clin Exp Immunol* 2011;156:189-93.

[57] Elsayed SM, Elsayed GM. Phenotype of apoptotic lymphocytes in children with Down syndrome. *Immunity & Ageing* 2009;6:1742-4933.

## Legends to Figures

**Figure 1.** NTPDase activity using ATP and ADP as substrates in lymphocytes from DS and control subjects. Bars represent means  $\pm$  SEM. NTPDase activity is expressed in nmol of Pi/min/mg of protein. AChE activity in lymphocytes from DS and control subjects. Bars represent means  $\pm$  SEM). AChE activity is expressed in  $\mu$ mol of AcSch/h/mg of protein. Adenosine deaminase activity in serum from DS and control subjects. Bars represent means  $\pm$  SEM. \*Represents statistical difference from control group (Student's t test,  $P \leq 0.0001$ ,  $n = 23$ ). ADA activity is expressed in U/L.

**Figure 2.** Cytokine levels in serum from DS and control subjects. Cytokine quantification was determined by Elisa as described in material and methods. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , IL-10 are expressed in pg/mL and IFN $\gamma$  in  $\mu$ g/mL. \*Represents statistical difference from control group (Student's t test,  $P \leq 0.003$ ,  $n=23$ ).

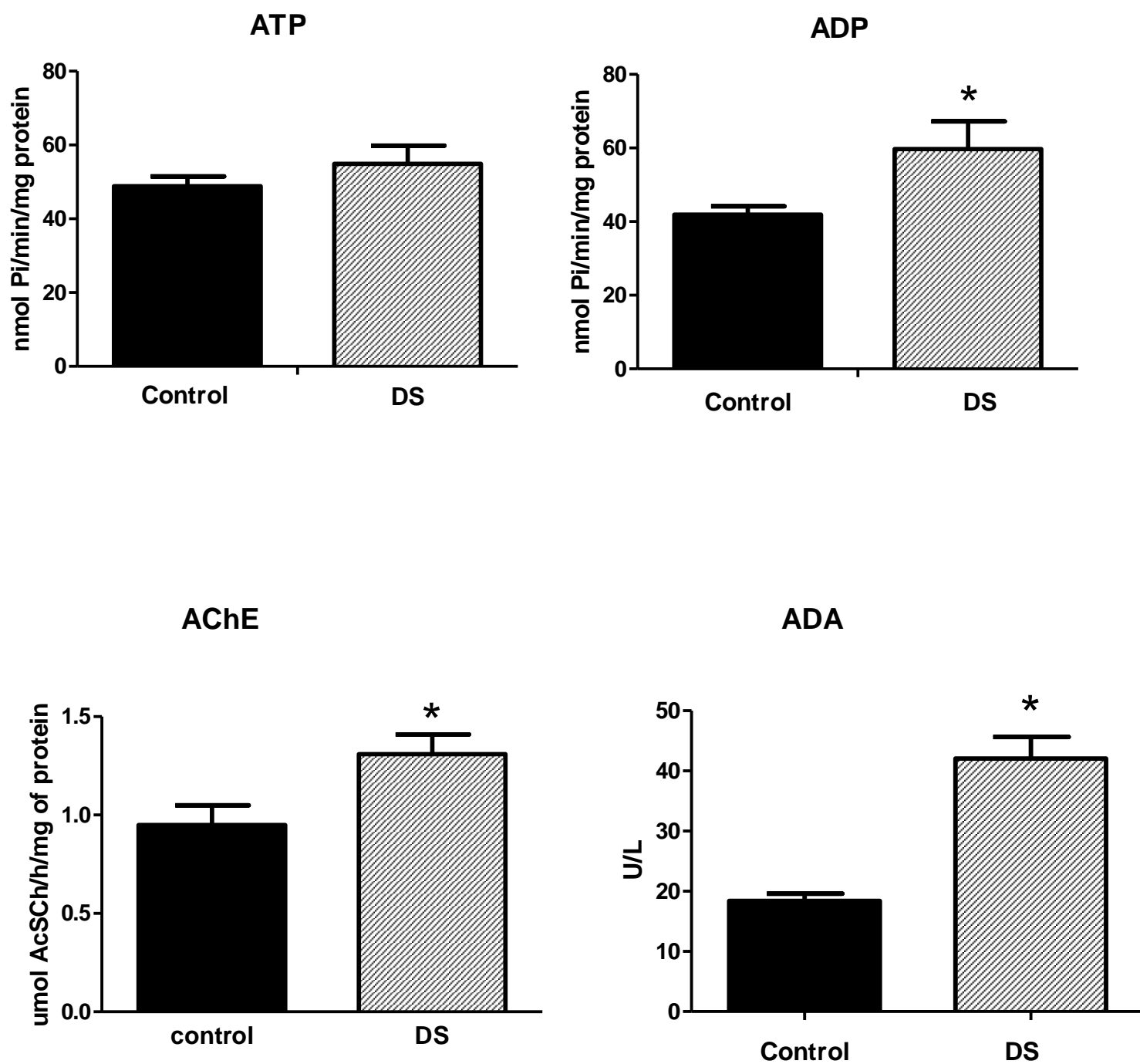


Figure 1

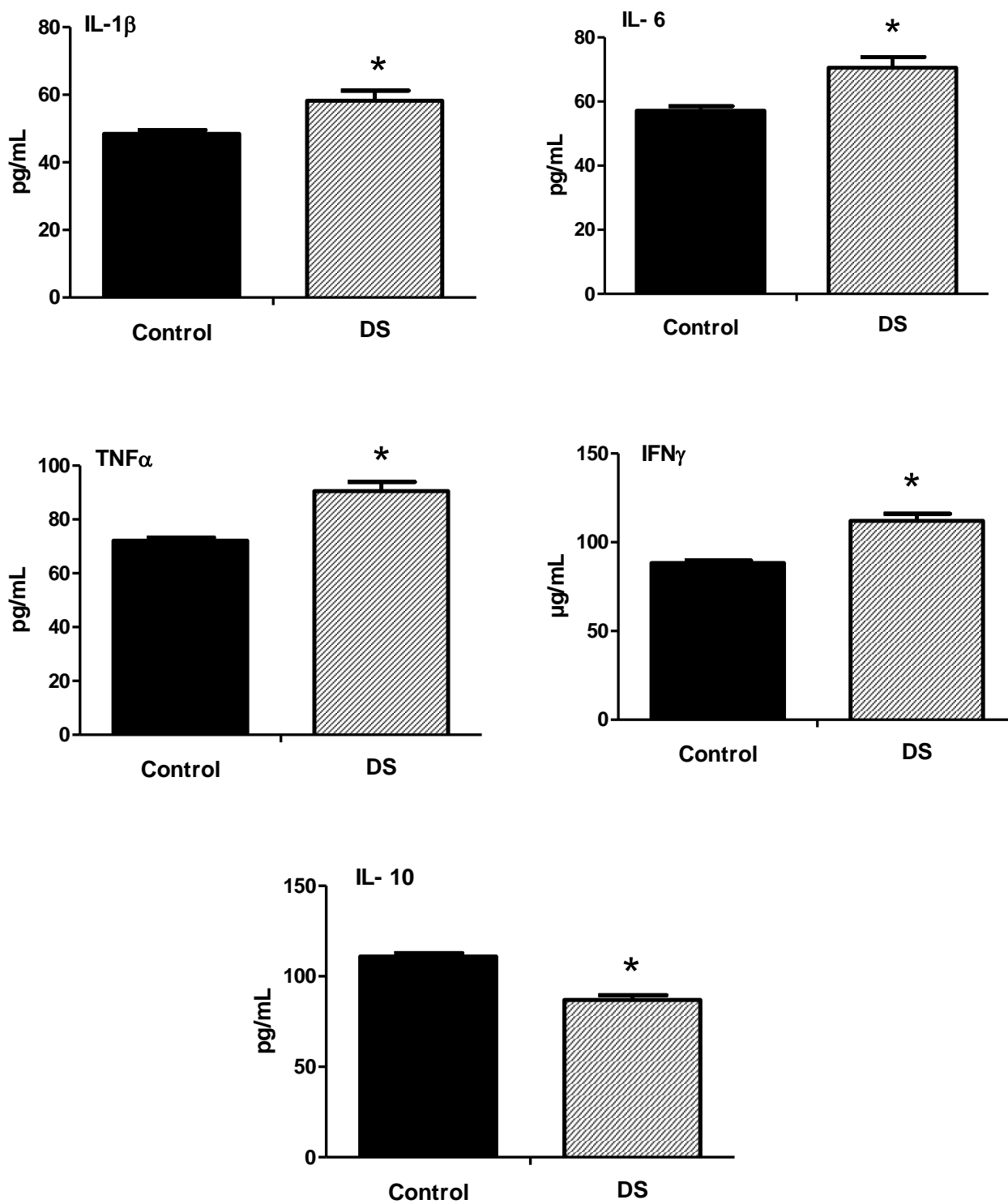


Figure 2

**Table I** Characteristics of Down Syndrome (DS) and control individuals applied in this study

	<b>Control</b>	<b>DS</b>
<u>Number</u>	23	23
Women	14	12
<u>Men</u>	9	11
Age women	29.66 ± 9.91	29.33 ± 9.78
Age men	26.15 ± 7.36	26.00 ± 7.1

**Table II** - General characteristics of hematological parameters in Down syndrome subjects and control group.

Item	DS	DS	Control	Control
	(Men)	(Women)	(Men)	(Women)
WBC ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	7.01 $\pm$ 2.04	5.54 $\pm$ 1.66	7.11 $\pm$ 1.36	7.76 $\pm$ 2.13
Neutrophils ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	3.66 $\pm$ 1.38	2.81 $\pm$ 1.39	3.77 $\pm$ 0.96	4.46 $\pm$ 1.53
Lymphocytes ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	2.39 $\pm$ 0.76	1.98 $\pm$ 0.61	2.35 $\pm$ 0.96	2.37 $\pm$ 0.76
Monocytes ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	0.58 $\pm$ 0.17	0.51 $\pm$ 0.25	0.59 $\pm$ 0.22	0.57 $\pm$ 0.15
Eosinophils ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	0.14 $\pm$ 0.11	0.11 $\pm$ 0.08	0.24 $\pm$ 0.14	0.22 $\pm$ 0.13
Basophils ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	0.04 $\pm$ 0.02	0.02 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.02
Platelets ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	238.58 $\pm$ 58,41	236.33 $\pm$ 54.80	212.66 $\pm$ 37.09	247.66 $\pm$ 39,81
RBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	4.74 $\pm$ 0.43	4.22 $\pm$ 0.30	5.05 $\pm$ 0.38	4.43 $\pm$ 0.38
Hemoglobin (g/dL)	15.06 $\pm$ 1.40	13.57 $\pm$ 0.56	15.11 $\pm$ 1.0	13.26 $\pm$ 0.93
HCT (%)	45.35 $\pm$ 4.82	40.92 $\pm$ 2.53	44.4 $\pm$ 2.87	39.24 $\pm$ 3.07
MCV (fL)	95.5 $\pm$ 5.21	97.17 $\pm$ 6.76	88.06 $\pm$ 3.28	88.56 $\pm$ 3.79
MCHC (g/dL)	33.27 $\pm$ 0.71	33.23 $\pm$ 1.31	34.08 $\pm$ 2.86	33.83 $\pm$ 0.41

Variables are presented as means  $\pm$  SEM and analyzed statistically by the Student's t test. RBC (red blood cells), HCT (hematocrit), MCV (mean corpuscular volume), CHCM (mean corpuscular hemoglobin concentration), WBC (white blood cells).

## 5. Conclusões

Uma vez que não foram observadas alterações nos parâmetros hematológicos dos SD, acreditamos que o aumento da atividade enzimática linfocítica esteja possivelmente relacionado a alterações na função e não no número absoluto de linfócitos.

Sabendo que o sistema purinérgico contribui para a regulação da resposta imune em inúmeras situações patológicas, as alterações do metabolismo do ADP e ATP por linfócitos de portadores de SD podem estar relacionadas com as variações imunológicas encontradas nestes indivíduos.

O aumento da atividade da ADA no soro, possivelmente pode estar diminuindo os níveis de adenosina, que é uma molécula imunossupressora e com ações anti-inflamatórias, e por tanto, contribui para o aumento dos níveis de citocina pró-inflamatória como observado neste estudo.

Também, nesse sentido, observou-se um aumento na atividade da AChE em linfócitos de indivíduos com SD. Este resultado sugere que o aumento da atividade da AChE leva a uma diminuição do nível de acetilcolina e, desta forma, pode contribuir para o estado de pró-inflamatório em indivíduos portadores de SD.

As alterações nos níveis de citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias obtidos no nosso estudo reforçam a ideia de que as alterações de libertação de citocinas podem contribuir para a ruptura de um desenvolvimento da resposta imunitária adaptativa em portadores de SD.

Em conclusão, demonstrou-se que a atividade das enzimas NTPDase, AChE e ADA, e os níveis de citocinas estão alterados em indivíduos com SD, sugerindo que estas alterações são muito importantes na disfunção imunológica observada nesta condição. A importância destes resultados a partir do ponto de vista clínico e terapêutico deve ser investigada em pesquisas futuras podendo assim, ajudar a desenvolver novas estratégias para o tratamento da imunodeficiência característica da SD.

## 6. Referências bibliográficas

AIUTI, A.; CATTANEO, F.; GALIMBERTI, S. Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. **New England Journal Medicine**, v. 360, p. 447-58, 2009.

ANDERSON C.M.; XIONG W.; YOUNG J.D.; CASS C.E.; PARKINSON F.E. Demonstration of the existence of mRNAs encoding N1/cif and N2/cit sodium/nucleoside cotransporters in rat brain. **Molecular Brain Research**, 42: 358-361, 1996.

ARAÚJO, M.C.; ROCHA, J.B.T.; MORSCH, A.; ZANIN, R.; BAUCHSPIESS, R.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R.C. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1740, p. 421-426, 2005.

ASWAD, F.; KAWAMURA, H.; DENNERT, G. High sensitivity of CD4\_CD25\_ regulatory T cells to extracellular metabolites nicotinamide adenine dinucleotide and ATP: a role for P2X7 receptors. **Journal of Immunology**, v. 175, n. 5, p. 3075-3083, 2005.

BAGATINI, M.; MARTINS, C.; BATTISTI, V.; SPANEVELLO, R.; GASPARETTO, D.; ROSA, C.; GONÇALVES, J.; SCHETINGER, M.; SANTOS, R.; MORSCH, V. Hydrolysis of adenine nucleotides in platelets from patients with acute myocardial infarction. **Clinical Biochemistry** 41: 1181-1185, 2008.

BARRADAS, C.; CHARLTON, J.; MENDOÇA, P. IgG subclasses sérum concentrations in a population of children with Down syndrome: comparative study with siblings and general population. **Allergol Immunopathology**, v. 30, p. 57-61, 2002.



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

BLOEMERS, B.L.P.; BONT, L.; WEGER, R.A.; OTTO, A.S.; BORGHANS, J.A.; TESSELAAR, K. Decreased Thymic Output Accounts for Decreased Naive T Cell Numbers in Children with Down Syndrome. **Journal of Immunology**, v. 186, p. 000–000, 2011.

BORGES-OSÓRIO, M.R.; ROBINSON, W.M. **Genética Humana**. 2° ed. Porto Alegre: Artmed, 2001.

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

BURNSTOCK, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiology Reviews**, v. 87, p. 659-797, 2007.

CETINER, S.; DEMIRHAN, O.; INAL, T.C.; TASTEMIR, D.; SERTDEMIR, Y. Analysis of peripheral blood T-cell subsets, natural killer cells and serum levels of cytokines in children with Down syndrome. **International Journal Immunogenetics**, v. 37, p. 233-237, 2010.

COOLEY, W.C.; GRAHAM, J.M. Down syndrome: An update and review for the primary pediatrician. **Clinical Pediatrics**, v. 30, p. 233-53, 1991.

CORRAL, I.; QUEREDA, C.; NAVAS, E. Adenosine deaminase activity in cerebrospinal fluid of HIV-infected patients: limited value for diagnosis of tuberculous meningitis. **European Journal Clinical Microbiology Infect Dis**, v. 23, n. 6, p. 471–6, 2004.

COSTA-CARVALHO B, MARTINEZ R, DIAS A ET AL. Antibody response to pneumococcal capsular polysaccharide vaccine in Down syndrome patients. **Brazilian Journal Medicine Biol Res**, v. 39, p. 1587 – 1592, 2006.

CRONSTEIN, B.N.; DAGUMA, L.; NICHOLS, D.; HUTCHISON, A.J.; WILLIAMS, M. The adenosine/neutrophil paradox resolved: human neutrophils possess both A1 and A2 receptors that promote chemotaxis and inhibit O<sub>2</sub> generation, respectively. **Journal Clin Invest**, v. 85, p.1150-7, 1990.

CRUZ, N.V.; MAHMOUD, S.A.; CHEN, H.; LOWERY-NORDBERG, M.; BERLIN, K.; BAHNA, S.L. Follow up study of immune defects in patients with dysmorphic disorders. **Ann Allergy Asthma Immunol**. v. 102, p. 426–31, 2009.

CUADRADO, E.; BARRENA, M. Immune dysfunction in Down's syndrome: primary immune deficiency or early senescence of the immune system? **Clinical Immunology Immunopathology**, v. 78, p. 209–14, 1996.

DA ROSA, U.S.R.; NISHIHARA, R.M.; NASS, F.R.; OLIVEIRA, N.P.; FIEDLER, P.T. Autoantibodies in patients with Down Syndrome: early senescence of the immune system or precocious markers for immunological diseases? **Journal Paediatrics Children Health**, v. 44, p. 182-6, 2008.

DA SILVA, L.R.J.; VERGANI, N.; BRUNONI, D.; LONGHITANO, S.B.; GALDERI, L.; PORTO, M.R.; D'ALMEIDA, V.; PEREZ A.B.A. Genes envolvidos no metabolismo da homocisteína e sua relação com risco aumentado para Síndrome de Down. In: **14º Congresso Brasileiro de Genética Clínica**, Anais, p. 21, Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética Clínica, 2002.

DEAGLIO, S.; ROBSON, S.C. Ectonucleotidases as regulators of purinergic signaling in thrombosis, inflammation, and immunity. **Adv Pharmacol**, v. 61, p. 301-332, 2011.

DI VIRGILIO, F. Purinergic signalling in the immune system. A brief update, **Purinergic Signalling**, v. 3, p. 1–3, 2007.

DI VIRGILIO, F. Liaisons dangereuses: P2X7 and the inflammasome. **Trends Pharmacol Sci**, v. 28, n. 9, p. 465-472, 2007

DOULL, I. Respiratory disorders in down's syndrome: overview with diagnostic and treatment options. In: **Forum of learning disability and the down's syndrome medical interest group, 2001**; London. Resumos. London: Royal Society of Medicine, 2001.

DWYER, K.M.; DEAGLIO, S.; GAO, W.; FRIEDMAN, D.; STROM, T.B.; ROBSON, S.C. CD39 and control of cellular immune responses. **Purinergic Signal**, v. 3, p. 171-80, 2007.

ELSAYED, S.M.; ELSAYED, G.M. Phenotype of apoptotic lymphocytes in children with Down syndrome. **Immunity & Ageing**, v. 6, p. 1742-4933, 2009.

ELSSNER, A.; DUNCAN, M.; GAVRILIN, M.; WEWERS, M.D. A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release. **Journal Immunological**, v. 172, n. 8, p. 4987-4994, 2004.

ELTZSCHIG, H.K. Adenosine: an old drug newly discovered. **Anesthesiology**, v. 111, p.904-15, 2009.

FERREIRA, C.; LEITE, J.; TANIGUCHI, A. Immunogenicity and safety of an inactivated hepatitis A vaccine in children with Down syndrome. **Journal Pediatrics Gastroenterology Nutr**, v. 39, p. 337-40, 2004.

FILIPPINI, A.; TAFFS R.E.; STITKOVSKY M.V. Extracelular ATP in T-lymphocyte activation: possible role in effector functions. **Proc Natl Acad Sci**, v. 87, p. 8267-8271, 1990.

FOZARD, J.R.; HANNON, J.P. Adenosine receptor ligands: potential as therapeutic agentes in asthma and COPD. **Pulm Pharmacol Therapy**, v. 12, n. 2, p. 111-114, 1999.

FRANCIOTTA, D.; VERRI, A.; ZARDINI, E. Interferon-gamma and interleukin-4-producing T cells in Down's syndrome. **Neurosci Lett**, v. 395, p. 67–70, 2006.

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

GARCIA, G.; BENGOCHEA, M.; CORTES, B. Response to recombinant DNA antihepatitis B vaccine in mentally retarded patients with Down syndrome. A controlled study. **Med Clin**, v. 94, p. 528–30, 1990.

GESSI, S.; VARINI, K.; MERIGHI, S.; FOGLI, E.; SACCHETTO, V.; BENINI, A.; LEUNG, E.; MAC-LENNAN, S.; BOREA, P. Adenosine and lymphocyte regulation. **Purinergic Signalling**, v. 3, p. 109-116, 2007.

GNATEK, Y.; ZIMMERMAN, G.; GOLL, Y.; NAJAMI, N.; SOREQ, H.; FRIEDMAN, A. Acetylcholinesterase loosens the brain's cholinergic anti-inflammatory response and promotes epileptogenesis. **Molecular Neurosc**, v. 5, ar. 66, 2012.

GOLDACRE, M.; WOTTON, C.; SEAGROATT, V.; YEATES, D. Cancers and immune related diseases associated with Down Syndrome: a record linkage study. **Arch Dis Child**. v. 89, p. 1014–17, 2004.

GOODARZI, M.T.; ABDI, M.; TAVILANI, H.; RASHIDI, M. Adenosine deaminase activity in COPD patients and healthy subjects. **Iran J Allergy Asthma Immunol**, v. 9, n. 1, p. 7–12, 2010.

GREBOWSKA, A.; MORAN, A.P.; BIELANSKI, W. Helicobacter pylori lipopolysaccharide activity in human peripheral blood mononuclear leukocyte cultures. **Journal Physiology Pharmacology**, v. 61, p. 437-442, 2010.

GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H. **Genética Moderna**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

GUERRA, A.N.; FISETTE, P.L.; PFEIFFER, Z.A.; QUINCHIA-RIOS, B.H.; PRABHU, U.; AGA, M.; DENLINGER, L.C.; GUADARRAMA, A.G.; ABOZEID, S.; SOMMER, J.A.; PROCTOR, R.A.; BERTICS, P.J. Purinergic receptor regulation of LPS-induced signaling and pathophysiology. **Journal of Endotoxin**, v. 9, n. 4, p. 256-263, 2003.

HABERMEHL, P.; KNUF, M.; KAMPMANN, C. Changes in lymphocyte subsets after cardiac surgery in children. **European Journal Pediatrics**, v. 162, p. 15–21, 2003.

HANDA, M.; GUIDOTTI, G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). **Biochem Biophys Res Commun**, v. 218, p. 916-923, 1996.

HASKO, G.; LINDEN, J.; CRONSTEIN, B.; PACHER, P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. **Nat Reviews**, v. 7, p. 759-770, 2008.

HINGH, Y.; VOSSEN, P.; GEMEN, E.; MULDER, A.; HOP, W.; BRUS, F.; VRIES, E. Intrinsic abnormalities of lymphocyte counts in children with down syndrome. **Journal de Pediatria**, p. 147, v. 744-747, 2005.

HOLM, V.A.; CASSIDY, S.B.; BUTLER, M.G.; HANCHETT, J.M.; GREENSWAG, L.R.; WHITMAN, B.Y.; GREENBERG, F. Prader-Willi syndrome: consensus diagnostic criteria. **Pediatrics**, v. 91, n. 2, p. 398-402, 1993.

IRVING, C.; BASU, A.; RICHMOND, S.; BURN, J.; WREN, C. Twenty years trends in prevalence and survival of Down Syndrome. **European Journal of Human Genetics**, v. 16, p. 1336-1340, 2008.

JAMES, S.J.; POGRIBNA, M.; POGRIBNY, I.P.; MELNYK, S.; HINE, J.B.; GIBSON, J.B.; YI, P.; TAFOYA, D.; SWENSON, D.H. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, p. 495-501, 1999.

JONES, K.L. **Smith's recognizable patterns of human malformations**. 5 ed. Philadelphia, PA: Saunders, 1997.

JONES KL. **Padrões Reconhecíveis de Malformações Congênitas**, 5ª edição, Editora: Manole, 1998.

JOSHI, A.; ABRAHAM, R.; SNYDER, M.; BOYCE, T. Immune evaluation and vaccine responses in Down Syndrome: Evidence for immunodeficiency? **Vaccine**, v. 29, p. 5040-5046, 2011.

JORDE, L.B.; CAREY, J.C.; BAMSHAD, M.J.; WHITE, L.L. **Citogenética Clínica: A base cromossômica da doença humana - Genética médica**. 2º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p: 101-5, 2000.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. **Pharmacology & therapeutics**, v. 86, p, 29-48, 2000.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. **Life Science**, v. 74, p. 675–696, 2003.

KHODADADI I.; ABDI, M.; AHMADI, A.; SALEH, M.; MENBARI S.; LAHOORPOUR F. Analysis of serum adenosine deaminase (ADA) and ADA1 and ADA2 isoenzyme activities in HIV positive and HIV–HBV co-infected patients. **Clinical Biochemistry**, v. 44, p. 980–983, 2011.

KRONLAGE, M.; SONG, J.; SOROKIN, L.; ISFORT, K.; SCHWERDTLE, T.; LEIPZIGER, J.; ROBAYE, B.; CONLEY, P.B.; KIM, H.C.; SARGIN, S., SCHON, P.; SCHWAB, A.; HANLEY, P.J. Autocrine purinergic receptor signaling is essential for macrophage chemotaxis. **Sci Signal**, v 3, p. 55, 2010.

KUSTERS, M.A.A.; VERSTEGEN, R.H.J.; GEMEN, E.F.A.; VRIES, E. Intrinsic defect of the immune system in children with Down syndrome: a review. **Clin Exp Immunol**. v. 156, p. 189–193, 2011.

KUSTERS, M.A.; JOL-VAN DER ZIJDE, C.M.; VAN TOL, M.J.; BOLZ, W.E.; BOK, L.A.; VISSER, M.; DE VRIES, E. Impaired avidity maturation after tetanus toxoid booster in children with Down syndrome. **Pediatr Infect Dis J**, v. 30, p. 357-359, 2011.

LA SALA, A.; FERRARI, D.; DI VIRGILIO, F.; IDZKO, M.; NORGAUER, J.; GIROLOMONI, G. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, n.3, p. 339-343, 2003.

LAKSHMI, K.T.; SUREKHA, R.H.; SRIKANTH, B.; JYOTHY, A. Serum cholinesterases in Down syndrome children before and after nutritional supplementation, **Singapore Med J**, v. 49, n. 7, p. 561, 2008.

LANGSTON, H.; KE, Y.; GEWIRTZ, A.; DOMBROWSKI, K.; KAPP, J.; Secretion of IL-2 and IFN- $\gamma$ , but not IL-4, by antigen - specific T cells requires extracellular ATP. **The Journal of Immunology**, v. 170, p. 2962-2970, 2003.

LAPPAS, C.M.; RIEGER, J.M.; LINDEN, J. A2A adenosine receptor induction inhibits IFN- $\gamma$  production in murine CD4+ T cells. **J Immunol**, v. 174, p. 1073-1080, 2005.

LEAL, D.B.; STREHER, C.A.; BERTONCHELI, C.; CARLI, L.; LEAL, C.; SILVA, J.; MORSCH, V.; SCHETINGER, M. HIV infection is associated with increased NTPDase activity that correlates with CD39 - positive lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1746, p. 129-134, 2005.

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

LEE, BC.; CHENG, T.; ADAMS, G.B.; ATTAR, E.C.; MIURA, N.; LEE, S.B.; SAITO, Y.; OLSZAK, I.; DOMBKOWSKI, D.; OLSON, D.P.; HANCOCK, J.; CHOI, P.S.; HABER, D.A.; LUSTER, A.D.; SCADDEN, D.T. P2Y-like receptor, GPR105 (P2Y14). Identifies and mediates chemotaxis of bone-marrow hematopoietic stem cells. **Genes Dev**, v. 17, p. 1592-1604, 2003.

LICASTRO, F.; CANDORE, G.; PORCELLINI, E.; LIO, D.; COLONA-RAMARO, G. Innate immunity and inflammation in ageing: a key for understanding age-related diseases, **Immun Ageing**. v. 2, p. 8, 2005.

LIMA, C.P. **Genética Humana**, 1 ed. Harbara, 1996.

LIVOLTE, S.; MATTINA, A. Safety and effectiveness of an acellular pertussis vaccine in subjects with Down syndrome. **Child Nerv Syst**. v. 12, p. 100–2, 1996.

LOCOVEI, S.; WANG, J.; DAHL, G. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. **FEBS Lett**, v. 580, p. 239-244, 2006.

LUNKES, G.; LUNKES, D.; STEFANELLO, F.; MORSCH, A.; MORSCH, V.; MAZZANTI, C.; SCHETINGER, M. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thrombosis Research**, v. 109, p. 189-194, 2003.

MASSOULIÉ, J.; PEZZEMENTI, L.; BON, S.; KREJCI, E.; VALETTE, F.M. Molecular and cellular biology of cholinesterase. **Progress in neurobiology**, v. 41, p. 31-91, 1993.

MCKAY, E.; HEMS, G.; MASSIE, A. Serum antibody to poliovirus in patients in a mental deficiency hospital, with particular reference to Down's syndrome. **J Hyg**, v. 81, p. 25–30, 1978.

MCGROTHER, C.W.; MARSHALL, B. Recent trends in incidence, morbidity and survival in Down's syndrome. **J Ment Defic Res**. v. 34, p. 49-57, 1990.



MEHTA, P.D.; DALTON, A.J.; MEHTA, S.P.; PERCY, M.E.; SERSEN, E.A.; WISNIEWSKI, H.M. Immunoglobulin G subclasses in older persons with Down syndrome. **J Neurol Sci**, v. 117, p. 186–91, 1993.

MILNE, G.R.; PALMER, T.M. Anti-inflammatory and immunosuppressive effects of the A2A adenosine receptor. **Scientific World Journal**, v. 11, p. 320–339, 2011.

MOREIRA, L.; HANI, C.; GUSMÃO, F. A síndrome de Down e sua patogênese: considerações sobre o determinismo genético. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, p. 22, p. 96-99, 2000.

MURPHY, M.; LEMPERT, M.; EPSTEIN, L. Decreased level of T cell receptor expression by Down syndrome (trisomy 21) thymocytes. **Am J Med Genet**. V. 7, p. 234–7, 1990.

NAKADONARI, E.K.; SOARES, A.A. Síndrome de Down considerações gerais sobre a influência da idade materna avançada. **Arq Mudi**, v. 10, p. 5-9, 2006.

NESPOLI, L.; BURGIO, G.; UGAZIO, A. Immunological features of Down's syndrome: a review. **J Int Dis Res**, p. 37, p. 543–51, 1993.

NIZRI, E.; ADANI, R.; MESHULAM, H.; AMITAL, G.; BRENNER, T. Bifunctional compounds eliciting both anti-inflammatory and cholinergic activity as potential frugs for neuroinflammatory impairments. **Neuroscience Letters**, v. 376, p. 46-50, 2005.

NORTH, R.A.; SURPRENANT, A. Pharmacology of cloned P2X receptors. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 40, p. 563-580, 2000.

NUSSBAUM RL. Thompson & Thompson: **Genética Médica**, 6ª edição, Editora: Guanabara Koogan, 2002.

OHTA, A.; SITKOVSKY, M. Role of G-proteincoupled adenosine receptors in down regulation of inflammation and protection from tissue damage. **Nature**, v. 414, p. 916-20, 2001.

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

PHILIP, R.; BERGER, A.C.; MCMANUS, N.H.; WARNER, N.H.; PEACOCK, M.A.; EPSTEIN, L.B. Abnormalities of the in vitro cellular and humoral responses to tetanus and influenza antigens with concomitant numerical alterations in lymphocyte subsets in Down syndrome (trisomy 21). **Journal of Immunology**, v. 136, p. 1661-1667, 1986.

POURSHARI, P.; SAGHIRI, R.; EBRAHIMI-RAD, M.; NAZEM, H.; POURPAK, Z.; MOIN, M.; SHAMS, S. Adenosina deaminase in patients with primary immunodeficiency syndromes: the analysis of serum ADA1 and ADA2 activities. **Clinical Biochemistry**, v. 42, p. 1438-43, 2009.

PRADO, M.B.; MESTRINHERI, L.; FRANGELLA, V.S.; MUSTACHI, Z. Acompanhamento nutricional de pacientes com síndrome de Down atendidos em um consultório pediátrico. **Mundo da Saúde; São Paulo (SP)**, v 33, n. 3, 335-346, 2009.

PRADO, M.A.M.; REIS, R.A.M.; PRADO, F.V.; MELLO, M.C.; GOMEZ, M.V.; MELLO, F.G. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. **Neurochemistry International**, v. 41, p. 291-299, 2002.

PUUKKA R, PUUKKA M, PERKKILÄ L, KOUVALAINEN K. Levels of some purine metabolizing enzymes in lymphocytes from patients with Down's syndrome. **Biochemical Medicine and Metabolic Biology** v.36, p.45-50,1986.

PUUKKA R, PUUKKA M, LINNA SL, JOENSUU T, KOUVALAINEN K. Elevated erythrocyte adenosine deaminase activity in Down's syndrome. **Acta Paediatrica Scandinavica** v. 70, p.739-741,1981.

PUUKKA R, PUUKKA M, LEPPILAMPI M, LINNA SL, KOUVALAINEN K. Erythrocyte adenosine deaminase, purine nucleoside phosphorylase and phosphoribosyltransferase activity in patients with Down's syndrome. **Clinica Chimica Acta**, v. 23, p 275-281,1982.

REARDON, C.; DUNCAN, G.S.; BRÜSTLE, A.; BRENNERA, D. Lymphocyte-derived ACh regulates local innate but not adaptive immunity. **PNAS**, v. 110, n. 4, p. 1410-1415, 2013.

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

RINNER, I.; KAWASHIMA, K., SCHAUENSTEIN, K. Rat lymphocytes produce and secrete acetylcholine in dependence of differentiation and activation. **Journal of Neuroimmunology**, v. 81, p. 31–37, 1998.

ROBSON, S.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v. 2, p. 409-430, 2006.

ROAT, E.; PRADA, N.; LUGLI, E.; NASI, M.; FERRARESI, R.; TROIANO, L.; GIOVENZANA, C.; PINTI, M.; BIAGIONI, O.; MARIOTTI, M.; DI IORIO, A.; CONSOLO, U.; BALLI, F.; COSSARIZZA, A. Homeostatic cytokines and expansion of regulatory T cells accompany thymic impairment in children with Down syndrome. **Rejuvenation Res**, v. 11, p. 573-583, 2008.

ROIZEN, N.J. Medical care and monitoring for the adolescent with Down Syndrome. **Adolesc Med**, v. 13, p. 345-58, 2002.

SAKURAGAWA, N.; MOHAMED, A. E.; FUJII, T.; KAWASHIMA, K. Possible dynamic neurotransmitter metabolism surrounding the fetus. **J Child Neurol**, v. 14, p. 265–266, 1999

SCHENK, U.; WESTENDORF, A.M.; RADAELLI, E. Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. **Sci Signal**, v.1, n. 39, p.6, 2008.

SCHUETZ, P.; CASTRO, P.; SHAPIRO, N.I. Diabetes and sepsis: Preclinical findings and clinical relevance. **Diabetes Care**, v. 34, p. 771-778, 2011.

SEN, C.K.; Exercise – induced oxidative stress and antioxidant nutrients. **Nutrition in Sports – Volume VII of Encyclopaedia of Sports Medicine** – Chapter. v. 22, 2001.

SHONN, M.A.; McCARROL, R.; MURRAY, A.W. Requirement of the spindle checkpoint for proper chromosome segregation in budding yeast meiosis. **Science**, v. 289, p. 300-303, 2000.

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

SILVA P. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan, p. 1314, 1998.

SNUSTAD, D.P.; SIMMONS, M.J. **Fundamentos da Genética**. 2° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. **Nature Reviews in Neuroscience**, v. 2, p. 294-302, 2001.

SPANVELLO, R.M.; MAZZANTI, C.M.; BAGATINI, M.; CORREA, M.; SCHAMATZ, R.; STEFANELLO, N.; THOME, G. Activities of the enzymes that hydrolyse adenine nucleotides in platelets from multiples sclerosis patients. **Journal of Neurology**, v. 257, n. 1, p. 24-30, 2010.

STANGHELLINI R.B. & CAPONE L. Quantitation of fetal DNA in maternal serum during the first trimester of pregnancy by the use of a DAZ repetitive probe. **Molecular Human Reproduction**, v. 12, p.587–91, 2006.

SUSSMAN, J.L.; HAREL, M.; FROLOW, F. Atomic structure of acetylcholinesterase from Torpedo California: A prototypic acetylcholine-binding protein. **Science**, v. 253, p. 872-879, 1991.

TAYEBATI, S.K.; EL-ASSOUAD, D.; RICCI, A.; AMENTA, F. Immunological and immunocytochemical characterization of cholinergic markers in human peripheral blood lymphocytes, **J. Neuroimmunol**, v. 132, p. 147–155, 2002.

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

TROTTA, M.B.F.; AZUL, J.B.S.; WAJNGARTEN, M.; FONSECA, S.G.; GOLDBERG, A.C.; KALIL, J.E. Inflammatory and Immunological parameters in adults with Down syndrome. **Immunity & Ageing**, v. 8, p. 4, 2011.

UGAZIO, A.; MACCARIO, R.; NOTARANGELO, L. Immunology of Down syndrome: a review. **Am J Med Genet Suppl**, v. 7, p. 204–12, 1990.

UNGERER, J.P.; OOSTHUIZEN, H.M.; BISSBORT, S.H.; VERMAAK, W.J. Serum adenosine deaminase: isoenzymes and diagnostic application. **Clin Chem**, v. 38, n. 7, p. 1322–1326, 1992.

WALLACE, K.L.; LINDEN, J. Adenosine A2A receptors induced on iNKT and NK cells reduce pulmonary inflammation and injury in mice with sickle cell disease. **Blood**, v.116, p. 5010-20, 2010.

WANG H. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. **Nature**, v. 421, n. 6921, p. 384–388, 2003.

WANG, J.; ZHANG, H.Y.; TANG, X.C. Huper zinea improves chronic inflammation and cognitive decline in rats with cerebral hypoperfusion. **J. Neurosci.Res**, v. 88, p. 807–815, 2010.

WEISKOPF, D.; WEINBERGER, B.; GRUBECK-LOEBENSTEIN, B. The aging of the immune system. **Transpl Int**, v. 22, p. 1041-1050, 2009.

WEN, L.; CALDWELL, C.C. Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) activation and changes in Bax protein expression associated with extracellular ATP-mediated apoptosis in human HEK293-P2X<sub>7</sub> cells. *Mol. Pharmacol.*, v. 63, p. 706–13, 2003.

WISEMAN, F.K.; ALFORD, K.A.; TYBULEWICZ, V.L.J.; FISHER, E.M.C. Down syndrome-recent progress and future prospects. *Hum Mol Genet*, v. 18, p. 75-83, 2009.

WOEHRLE, T.; YIP, L.; ELKHAL, A. Pannexin-1 hemichannel-mediated ATP release together with P2X1 and P2X4 receptors regulate T-cell activation at the immune synapse. *Blood*, v. 116, n. 18, p. 3475-3484, 2010.

YANG, Q.; RASMUSSEN, A.S.; FRIEDMAN, J.M. Mortality associated with Down's syndrome in the USA from 1983 to 1997: a population-based study. *Lancet*, v. 359, p. 1019-25, 2002.

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

ZACHOR, D.A.; MROCZEK-MUSULMAN, E.; BROWN, P. Prevalence of celiac disease in Down Syndrome in the United States. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, v. 31, p. 275-9, 2000.

ZHANG, B. CD73: A Novel Target for Cancer Immunotherapy. *Cancer Res*, v. 70, p. 6407-6411, 2010.

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

ZIMMERMANN, H.; BRAUN, N. Ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and functional roles in the nervous system. *Prog Brain Res*, v. 120, p. 371-385, 1999.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some developments and a note on nomenclature. **Drug Development Res**, v. 52, p. 44-56, 2001.

ZIMMERMANN, H.; MISHRA, S.; SHUKLA, V.; LANGER, D.; GAMPE, K.; GRIMM, I.; DELIC, J.; BRAUN, N. Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact. **Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia**, v. 73, p. 537-566, 2007.