

LUCIANA MARIA DE ANDRADE RIBEIRO

Imunorregulação central e periférica em pacientes com
Síndrome de Down e autoimunidade

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências

Área de Concentração: Pediatria
Orientadora: Profa. Dra. Cristina Miuki Abe
Jacob

**São Paulo
2011**

LUCIANA MARIA DE ANDRADE RIBEIRO

Imunorregulação central e periférica em pacientes com
Síndrome de Down e autoimunidade

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências

Área de Concentração: Pediatria
Orientadora: Profa. Dra. Cristina Miuki Abe
Jacob

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

**São Paulo
2011**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Ribeiro, Luciana Maria de Andrade

Imunorregulação central e periférica em pacientes com Síndrome de Down e autoimunidade / Luciana Maria de Andrade Ribeiro. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Pediatria.

Orientadora: Cristina Miuki Abe Jacob.

Descritores: 1.Síndrome de Down 2.Autoimunidade 3.Timo/anormalidades
4.Timo/imunologia 5.Rearranjo gênico da cadeia beta dos receptores de antígenos dos linfócitos T 6.Sub-populações de linfócitos T

USP/FM/DBD-347/11

*“Não importa o que você faz, mas o quanto de amor você coloca
nas suas ações”*

(Madre Teresa de Calcutá)

DEDICATÓRIA

Aos pacientes com Síndrome de Down e seus familiares, com quem tive o privilégio de conviver ao longo destes anos... Que estes estudos possam ajudá-los em sua caminhada!

Ao meu esposo Clayton, meu amor, amigo, companheiro de caminhada e porto seguro, compreendendo a importância da pesquisa em minha vida e amparando-me nos momentos mais difíceis.

Aos meus filhos Ligia e Pedro, presentes de Deus em nossas vidas, com quem tenho a felicidade de viver diariamente um amor incondicional!

AGRADECIMENTOS

À Dra. Cristina Jacob, pela inspiração, exemplo e orientação, frutos de uma amizade duradoura.

Ao Dr. Pastorino, pela amizade, apoio e disponibilidade para ajudar sempre.

À Profa. Dra. Magda Carneiro Sampaio pelo incentivo a todos da equipe do projeto temático sobre Autoimunidade na Criança.

Aos colegas da Unidade de Alergia e Imunologia do ICr, assistentes, pós-graduandos, complementandos e residentes pelo auxílio valoroso no atendimento dos pacientes com Síndrome de Down.

Aos professores e colegas da Unidade de Endocrinologia do ICr pela cooperação na formação da casuística deste estudo, particularmente Dr. Durval e Dr. Hamilton.

Ao professor Raymundo Soares de Azevedo Neto e Dr. Ulisses Doria Filho pelas orientações nas análises estatísticas.

Aos profissionais do LIM 36, em particular Claudia Zago, Silvia Bando e Fernanda, pela dedicação na realização das análises e orientações.

À FAPESP, pela viabilização desta pesquisa através do projeto temático “Autoimunidade na Criança: Investigação das Bases Celulares e Moleculares da Autoimunidade de Início Precoce” (2008/58238-4)

A todos os profissionais do Ambulatório do Instituto da Criança e do SAME, pela atenção e disposição em ajudar.

Aos colegas da Pediatria da PUC – Sorocaba, particularmente Dra. Izonete, Dr. José Eduardo, Dra. Marta, Dra. Alcinda e Dra. Izilda pelo apoio, compreensão e auxílio junto aos alunos nos momentos de maior necessidade.

Aos meus pais, Antonio e Maria Helena, pela pessoa que hoje sou.

Ao meu esposo Clayton e nossos filhos Lígia e Pedro, pela compreensão da ausência.

Aos pacientes e familiares que colaboraram com o estudo pela abnegação e disponibilidade de ajudar o próximo.

A Deus, que nos deu a vida, o maior de todos os milagres!

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, vigentes à época desta publicação:

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de Apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valérica Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo *com List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

SUMÁRIO

Lista de siglas

Lista de tabelas

Lista da figuras

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Autoimunidade e Síndrome de Down.....	4
1.2 Alterações imunológicas na Síndrome de Down.....	6
1.3 O timo na Síndrome de Down.....	8
1.4 Autoimunidade e tolerância em Síndrome de Down.....	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo principal.....	12
2.2 Objetivos Secundários.....	12
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	13
3.1 Casuística.....	13
3.1.1. Critérios de inclusão	13
3.1.2. Critérios de exclusão.....	13
3.1.3. Grupos de Avaliação.....	13
3.2 Metodologia.....	15
3.2.1. Coleta.....	15
3.2.2 Quantificação do n de cópias de TREC em sangue total....	15
3.2.3.1Obtenção do sangue total.....	16
3.2.3.2. PCR quantitativo.....	16
3.2.4 Expressão dos marcadores celulares FACS.....	17
3.3 – Aspectos Éticos.....	18
3.4 Análise Estatística.....	18
4. RESULTADOS.....	19
5. DISCUSSÃO.....	22
6. CONCLUSÕES.....	29
7. ANEXOS.....	30
8. REFERÊNCIAS.....	67

LISTA DE SIGLAS

AI	autoimunidade
CD	'Cluster of differentiation'
CO	controle
CRET	células recém emigradas do timo
DC	Doença celíaca
HLA	'Human leukocyte antigen'
ICAM	molécula de adesão
IgA	imunoglobulina A
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
IL	interleucina
IFN	interferon
NK	natural killer
PCR	polimerase chain reaction
SD	Síndrome de Down
T reg	linfócitos T reguladores
TCR	T cell receptor
TREC	T receptor excision circle

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Caracterização de 44 pacientes avaliados na Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança do HCFMUSP – 2011 quanto a idade e sexo..... 44
- Tabela 2 - Distribuição dos valores de leucócitos, linfócitos, subpopulações de linfócitos e células NK nos grupos de pacientes com Síndrome de Down (SD) e sem a síndrome (NSD) avaliados na Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança do HCFMUSP – 2011..... 44
- Tabela 3 - Distribuição dos valores das subpopulações de linfócitos T CD4+ nos grupos de pacientes com Síndrome de Down (SD) e sem a síndrome (NSD) avaliados na Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança do HCFMUSP – 2011..... 45
- Tabela 4 - Distribuição das medianas de concentrações de TREC/mL em pacientes com Síndrome de Down (SD) e sem a síndrome (NSD) avaliados na Unidade de Alergia e Imunologia do HCFMUSP – 2011..... 46
- Tabela 5 - Distribuição dos valores de leucócitos, linfócitos, subpopulações e células NK nos grupos de pacientes com Autoimunidade (CAI) e sem Autoimunidade (NAI) avaliados na Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança do HCFMUSP – 2011..... 47
- Tabela 6 - Distribuição dos valores de subpopulações de linfócitos T CD4+ nos grupos de pacientes com Autoimunidade (CAI) e sem Autoimunidade (NAI) avaliados na Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança do HCFMUSP – 2011..... 48
- Tabela 7 - Distribuição das concentrações de TREC/mL em pacientes com Autoimunidade (CAI) e sem Autoimunidade (NAI) avaliados na Unidade de Alergia e Imunologia do HCFMUSP – 2011... 49
- Tabela 8 - Distribuição dos valores de leucócitos, linfócitos, subpopulações e células NK nos grupos de pacientes com Síndrome de Down e Autoimunidade (SDAI), Síndrome de Down sem autoimunidade (SDNAI), pacientes com autoimunidade sem Síndrome de Down (AI) e controles (CO) avaliados na Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança do HCFMUSP – 2011..... 50
- Tabela 9 - Distribuição dos valores de leucócitos, linfócitos, subpopulações e células NK nos grupos de pacientes com Síndrome de Down e Autoimunidade (SDAI), Síndrome de Down sem autoimunidade (SDNAI), pacientes com autoimunidade sem Síndrome de Down (AI) e controles (CO) avaliados na Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança do HCFMUSP – 2011..... 51
- Tabela 10 - Distribuição das medianas de concentrações de TREC/mL nos grupos de pacientes com Síndrome de Down e Autoimunidade (SDAI), Síndrome de Down sem autoimunidade (SDNAI),

pacientes com autoimunidade sem Síndrome de Down (AI) e controles (CO) avaliados na Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança - HCFMUSP – 2011..... 52

Tabela 11 - Níveis de significância nas comparações entre as medianas de linfócitos T CD4+, linfócitos T CD4+ naive, linfócitos T CD4+ memória, linfócitos B CD19+ e concentrações de sjTREC/mL para os grupos de pacientes com Síndrome de Down e Autoimunidade (SDAI), Síndrome de Down sem autoimunidade (SDNAI), pacientes com autoimunidade sem Síndrome de Down (AI) e controles (CO) avaliados na Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança do HCFMUSP – 2011..... 53

Tabela 12 - Níveis de significância nas comparações entre as medianas de linfócitos T CD4+, linfócitos T CD4+ naive, linfócitos T CD4+ memória, linfócitos B CD19+ e entre as médias de sjTREC/mL para os grupos de pacientes com Síndrome de Down e Autoimunidade (SDAI) x Síndrome de Down sem autoimunidade (SDNAI), avaliados na Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança do HCFMUSP – 2011..... 54.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Grupos de avaliação definidos na casuística	58
Figura 2 – Distribuição de doenças autoimunes em pacientes com (SDAI) e sem SD (AI).....	58
Figura 3a - Distribuição dos valores absolutos de linfócitos T CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺ para os grupos com SD (SD) e sem a síndrome (NSD).....	59
Figura 3b - Distribuição dos valores percentuais de linfócitos T CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺ para os grupos com SD (SD) e sem a síndrome (NSD).....	59
Figura 4a - Distribuição dos valores absolutos de linfócitos T CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127-Foxp3 ⁺ para grupos com SD (SD) e sem a síndrome (NSD).....	60
Figura 4b - Distribuição dos valores percentuais de linfócitos T CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127-Foxp3 ⁺ para grupos com SD (SD) e sem a síndrome (NSD).....	60
Figura 5a - Distribuição dos valores absolutos de linfócitos T CD4 ⁺ CD28 ^{null} para os grupos com SD (SD) e sem a síndrome (NSD).....	61
Figura 5b - Distribuição dos valores percentuais de linfócitos T CD4 ⁺ CD28 ^{null} para os grupos com SD (SD) e sem a síndrome (NSD).....	61
Figura 6a - Distribuição dos valores absolutos de linfócitos B CD19 ⁺ para os grupos com SD (SD) e sem a síndrome (NSD).....	62
Figura 6b - Distribuição dos valores percentuais de linfócitos B CD19 ⁺ para os grupos com SD (SD) e sem a síndrome (NSD).....	62
Figura 7 - Distribuição dos valores de log ₁₀ TREC para os grupos com SD (SD) e sem a síndrome (NSD).....	63
Figura 8 - Distribuição dos valores absolutos de linfócitos T CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺ para os grupos com SD e autoimunidade (SDAI) com SD e sem autoimunidade (SDNAI), pacientes com autoimunidade isolada (AI) e controles saudáveis (CO).....	64
Figura 9 - Distribuição dos valores percentuais de linfócitos T CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127-Foxp3 ⁺ para os grupos com SD e autoimunidade (SDAI) com SD e sem autoimunidade (SDNAI), pacientes com autoimunidade isolada (AI) e controles saudáveis (CO).....	64
Figura 10 - Distribuição dos valores percentuais de linfócitos T CD4 ⁺ CD28 ^{null} para os grupos com SD e autoimunidade (SDAI) com SD e sem autoimunidade (SDNAI), pacientes com autoimunidade isolada (AI) e controles saudáveis (CO).....	65
Figura 11 - Distribuição dos valores percentuais de linfócitos B CD19 ⁺ para os grupos com SD e autoimunidade (SDAI) com SD e sem autoimunidade (SDNAI), pacientes com autoimunidade isolada (AI) e controles saudáveis (CO).....	65
Figura 12 - Distribuição dos valores de log ₁₀ TREC para os grupos com SD e autoimunidade (SDAI), com SD e sem autoimunidade (SDNAI),	

pacientes com autoimunidade isolada (AI) e controles saudáveis
(CO).....66

RESUMO

Ribeiro LMA. *Imunorregulação central e periférica em pacientes com Síndrome de Down e autoimunidade.* [Tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

Introdução: A Síndrome de Down (SD) é uma doença genética de alta prevalência, com várias alterações imunológicas decorrentes da disfunção tímica associada à doença. Neste estudo, avaliou-se a associação entre presença de autoimunidade e disfunção do timo em pacientes com SD.

Métodos: Foram avaliados 22 pacientes com SD (11 com autoimunidade e 11 sem), que preenchiam os critérios de inclusão: diagnóstico clínico e genético, idade \geq a 10 anos e sem uso de drogas imunossupressoras. Estes pacientes foram comparados a um grupo controle formado por adolescentes saudáveis (n=11) e outro de pacientes com doenças autoimunes, caracterizados por manifestações clínicas e presença de autoanticorpos (n=11). Todos os grupos foram pareados por idade e sexo. Os parâmetros laboratoriais avaliados foram: número de leucócitos, linfócitos CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, CD21⁺, CD4⁺CD28^{null}, células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺), linfócitos T 'naive' (CD4⁺CD45RA⁺CD62L⁺) e linfócitos T de memória (CD4⁺CD45RO⁺CD62L⁻) e célula NK (CD3⁻CD16⁺, CD56⁺) por citometria de fluxo. Foi também avaliada a concentração de sjTREC (*T receptor excision circles*) em sangue total por qRT-PCR. **Resultados:** Nos pacientes com SD, observou-se redução das concentrações séricas de sjTREC, do número de linfócitos B e aumento do número de células CD4⁺CD28^{null}. Na análise concomitante entre os grupos formados (SD com e sem autoimunidade, controle e autoimunidade sem SD), após correção de Bonferroni, observou-se que o grupo SD com autoimunidade apresentou redução de linfócitos T CD4, linfócitos 'naive' e linfócitos B. Quando comparados os grupos SD com e sem autoimunidade observou-se redução significativa das concentrações de TREC no primeiro grupo. Não houve alterações das Células NK. Em valores percentuais, os pacientes com SD e autoimunidade apresentaram elevação da subpopulação de células T reguladoras. **Conclusões:** Este estudo mostra que pacientes com SD

apresentam disfunção tímica quando avaliados pela quantificação de concentrações de TREC, sendo esta última mais expressiva nos pacientes com SD e autoimunidade. A redução dos linfócitos T naive associada a número normal de linfócitos T de memória sugere disfunção tímica primária, não compatível com processo de senescência. A observação do aumento do número de linfócitos $CD4^+CD28^{null}$ poderia ser consequência de múltiplos estímulos celulares provavelmente em consequência da linfopenia observada. A elevação de células Treg em pacientes com SD e autoimunidade poderia ser decorrente de alterações funcionais destas células bem como de alterações nos processos de homeostase.

SUMMARY

Ribeiro LMA. Central and peripheral immunoregulation in patients with Down syndrome and autoimmunity. [Thesis] São Paulo: Faculty of Medicine – Universidade de São Paulo, 2011

Introduction: Down syndrome (DS) is a genetic disease of high prevalence, with many immunological alterations as a consequence of thymic dysfunction associated to this disease. In this study, it was evaluated the association between the presence of thymic dysfunction and autoimmunity in patients with DS. **Methods:** It was evaluated 22 patients with DS (11 with and 11 without autoimmunity) who fulfilled the inclusion criteria: clinical and genetic diagnosis, and age ≥ 10 years and no use of immunosuppressive drugs. These patients were compared to a control group composed by healthy adolescents (n=11) and patients with autoimmune diseases, characterized by clinical manifestations and autoantibodies (n=11). All groups were matched for age and sex. The laboratory parameters evaluated were: number of leukocytes, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, CD4⁺CD28^{null} lymphocytes, regulatory T cells (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺), naive T lymphocytes (CD4⁺CD45RA⁺CD62L⁺), memory T lymphocytes (CD4⁺CD45RO⁺CD62L⁻) and NK cells (CD3⁻CD16⁺CD56⁺). The subpopulations of lymphocytes were determined by flow cytometry. It was also evaluated whole blood sjTREC (T receptor excision circles) concentrations by PCR. **Results:** In DS patients, there was reduction of sjTREC concentration, B lymphocytes number and increase of CD4⁺CD28^{null} cells number. When compared all the groups formed (SD with and without autoimmunity, autoimmunity without SD and control group), after Bonferroni correction, the SD group with autoimmunity showed a reduction of T CD4⁺lymphocytes, naïve cells and B lymphocytes. When SD with and without autoimmunity groups were compared it was observed significant reduction in the TREC concentrations in the first group. There were no changes in NK cells. Patients with DS and autoimmune diseases had huge percentages of T reg cells comparing different groups. **Conclusions:** This study showed that DS patients presented thymic dysfunction by reduced levels of whole blood sjTREC, and this condition is

more expressive to patients with DS and autoimmune disease associated. The reduction of TCD4⁺ naïve cells with normal TCD4⁺ memory cells is suggestive of primary thymic dysfunction against a senescent process. The elevated number of CD4⁺CD28^{null} in DS patients probably was a consequence of reduced T cell numbers. The elevation of Treg cells remains unclear, and could be a result of ineffective cells or deregulation of Thymus dependent immunity.

1 INTRODUÇÃO

A síndrome de Down (SD) enquanto conjunto de sinais e sintomas foi inicialmente descrita por John Langdon Down, em 1866, em sua monografia: "Observations on an ethnic classification of idiots", onde assim caracterizava os pacientes com SD: "os cabelos são escassos, a face é plana e longa, e destituída de proeminências. As bochechas são arredondadas, estendendo-se lateralmente. Os olhos são oblíquos e os cantos internos com maior distância entre eles que o habitual. A fissura palpebral é muito estreita. A fronte é enrugada transversalmente aos elevadores da pálpebra, que derivam do músculo occipitofrontal na abertura dos olhos. Os lábios são largos e grossos, com fissuras transversas. A língua é longa, grossa e muito áspera. O nariz é pequeno. A pele tem uma coloração levemente amarelada e encardida, e é deficiente em elasticidade, dando a aparência de ser muito grande para o corpo". Este autor denominou essa síndrome de mongolismo à semelhança da inclinação da fenda ocular dos mongóis e acreditava que a SD seria resultado de infecção congênita pela tuberculose, levando à degeneração das características do indivíduo ¹.

Somente em 1959, Jérôme Lejeune demonstrou que o então denominado mongolismo era determinado pela trissomia do cromossomo 21². Posteriormente a Organização Mundial da Saúde (OMS), definiu que o termo mongol fosse abolido e assim o epônimo Síndrome de Down vem sendo usado para definir a patologia.

Desde John L. Down, muitos estudos vêm sendo realizados sobre a síndrome, em seus aspectos genéticos, clínicos e imunológicos, entre outros. A SD constitui-se na primeira causa de retardo mental entre as síndromes genéticas, e é a doença cromossômica com maior número de estudos realizados ³.

Fenotipicamente, o diagnóstico pode ser realizado no período neonatal, baseado em características como as descritas por Hall ⁴:

Face achatada----- 90%

Hiporreflexia do Moro-----	85%
Hipotonia-----	80%
Hiperflexibilidade articular-----	80%
Prega cutânea em região cervical posterior-----	80%
Fenda palpebral oblíqua-----	80%
Displasia da pelve-----	70%
Anormalidades em pavilhão auricular-----	60%
Displasia da falange média do 5º dedo-----	60%
Prega única palmar-----	45%

Outras características clínicas associadas à síndrome de Down são: pele xerótica, alopecia areata, malformações do tubo digestivo, alterações da articulação atlanto-axial, baixa estatura e cardiopatias. O diagnóstico é feito baseado nos dados clínicos e pelo cariótipo ³.

A descoberta de uma etiologia genética para a síndrome de Down abriu caminho para os estudos a princípio cromossômicos e atualmente gênicos e moleculares. A trissomia do cromossomo 21 em 95% dos casos é simples (convencional), por erro de disjunção durante a meiose na formação dos gametas. Em 5 a 20% desses casos o erro disjuncional é paterno, porém grande parte dos estudos tem número pequeno de casos, muitas vezes com viés de seleção da população. O mosaico corresponde a 2% do total de casos, e 3% são relacionados à translocação parcial ou total do cromossomo 21, sendo mais comuns a translocação para os cromossomos 14 e o próprio 21. O diagnóstico da alteração genética é importante para o aconselhamento genético, determinando assim o risco de recorrência, que é em torno de 1% para as trissomias convencionais (5 vezes mais freqüente que na população geral), elevando-se no caso de translocação ^{5,6,7}.

A incidência da SD varia diretamente com a idade materna: de 15 a 29 anos, 1 em cada 1500 nascidos vivos; de 30 a 34 anos, 1 em 800; de 35 a 39 anos, 1 em 270; de 40 a 44 anos, 1 em 100; e acima de 45 anos, 1 em 50 ⁵.

O mecanismo pelo qual a trissomia leva às alterações morfofisiológicas da SD permanece obscuro, havendo algumas teorias. De

acordo com Epstein, a aneuploidia predisporia à expressão elevada em até 50% dos produtos gênicos do cromossomo excedente, e assim o conhecimento e mapeamento desses genes possibilitariam a previsão das alterações na criança acometida ⁸.

Para alguns genes, entretanto, a trissomia pode levar à inibição de expressão. Lima et al ⁹, avaliando o transcriptoma de timos de pacientes com SD observaram redução da expressão de 407 genes, em sua maioria relacionados a divisão celular, processamento e apresentação de antígenos, diferenciação e seleção intratímica de células T.

Embora a maioria dos indivíduos portadores da SD tenha trissomia completa, parte deles apresenta trissomia parcial do cromossomo com um subgrupo de alterações fenotípicas, o que levou ao conceito de “região crítica”, ou seja, um segmento cromossômico responsável por um subgrupo definido de alterações anatômicas e fisiológicas que ocorrem em todos os acometidos. Epstein e Koremberg definiram os seguimentos 21q22.1, 21q22.2 e 21q22.3 como responsáveis pelas alterações de fâcies, anomalias de mão, retardo mental e cardiopatia, sendo os seguimentos q11, q21 e q22.2 implicados no retardo mental ^{8,10}. No seguimento 21q22.3 também está localizado o gene AIRE, gene regulador de autoimunidade, cuja expressão encontra-se diminuída nas células tímicas de pacientes com SD ⁹. Entretanto, como alerta Epstein, não se deve reduzir as alterações a essas regiões, pois indivíduos com cromossomopatias diferentes apresentam sinais comuns, como o retardo mental e deficiência de crescimento, e pacientes com mesmas alterações genéticas e citogenéticas têm expressões fenotípicas diferentes ⁸.

Recentemente, o cromossomo 21 foi mapeado, revelando um total de 225 genes, sendo 127 genes conhecidos, 98 genes ainda não relacionados a síndromes clínicas e 59 pseudogenes ¹¹. Alguns genes vêm sendo estudados extensivamente, como o da proteína precursora do amilóide (APP), e o gene da Doença de Alzheimer familiar, implicados na fisiopatologia desta neuropatia, bem como na progressão do retardo mental da SD.

A expectativa de vida dos pacientes com SD encontra-se atualmente por volta dos 60 anos de idade nos países desenvolvidos, provavelmente em decorrência da melhoria dos cuidados de saúde, tais como o controle das doenças infecciosas, a correção cirúrgica precoce das cardiopatias e o diagnóstico precoce das doenças endocrinológicas, autoimunes e neoplásicas^{12,13}.

As manifestações clínicas descritas em pacientes com SD são semelhantes àquelas que ocorrem no envelhecimento, tais como o aumento da susceptibilidade às infecções bacterianas e virais, maior prevalência de doenças autoimunes e de doenças neoplásicas e evolução precoce para demência após os 40 anos de idade, sendo a SD considerada por muito tempo como doença progeróide^{13,14,15,16,17}.

1.1 Autoimunidade e Síndrome de Down

Entre as doenças autoimunes associadas à SD destacam-se o hipotireoidismo, doença celíaca, diabetes, disfunção adrenal, anemia perniciosa, vitiligo, alopecia e hepatite crônica ativa, entre outros¹⁸⁻³².

Goldacre et al.²⁵, em estudo de coorte realizado na Inglaterra de 1963 a 1999, compararam os riscos de doenças autoimunes em 1453 pacientes com SD *versus* 460.000 indivíduos sem SD e observaram riscos elevados para doença celíaca (4,7x), hipotireoidismo adquirido (9,4x) e diabetes mellitus (2,8x) nos portadores da SD em relação à população sem a síndrome. É importante ressaltar que 52% dos pacientes com SD tinham menos de cinco anos e 67% menos de 20 anos²⁵.

As alterações tireoidianas constituem a principal manifestação autoimune na SD, com prevalência de hipotireoidismo de 28 a 64%¹⁸⁻²⁴. A prevalência de hipotireoidismo congênito é maior nos pacientes com SD, bem como de alterações tireoidianas transitórias no período neonatal^{20,23}. Além de tireoidite autoimune sintomática, o hipotireoidismo subclínico também é prevalente em pacientes com SD, com presença de autoanticorpos em até 1/3 dos casos¹⁹. A idade de diagnóstico é precoce, por volta dos 10 anos de idade, com aumento da disfunção tireoidiana na

adolescência e na vida adulta ^{19,22,26}. Em relação à evolução do hipotireoidismo subclínico, Rubello et al ²⁷ verificaram prevalência de 32,5% de hipotireoidismo subclínico em 344 casos, com presença de autoanticorpos em 18% deles. Nos pacientes com elevação do TSH e presença de autoanticorpos houve evolução para hipo/hipertireoidismo evidente, enquanto nos indivíduos com ausência de autoanticorpos houve normalização espontânea e progressiva do TSH ²⁷. Zori et al. também observaram incidência elevada de hipotireoidismo em pacientes com SD e idade acima de 10 anos, sendo que a maior prevalência da positividade para auto-anticorpos (28%) ocorreu nessa faixa etária ²⁶.

Van Trostenburg e cols, em estudo observacional populacional de crianças com SD nascidas entre 1996 e 1997, encontraram 3,5% de crianças com triagem neonatal alterada para hipotireoidismo, comparadas com 0,5% da população controle. Destes pacientes, um quinto evoluiu confirmando o diagnóstico ²³.

Clinicamente o diagnóstico de hipotireoidismo em pacientes com SD é difícil, pois os principais sinais da doença fazem parte também do conjunto de alterações da própria síndrome, como por exemplo, o atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, retardo de crescimento, hérnia umbilical, constipação, pele seca e áspera, hipotonia e hiporreflexia. Na grande maioria dos casos o diagnóstico é laboratorial, fazendo-se necessária a avaliação periódica da função tireoideana.

A doença celíaca (DC) acomete cerca de 1 indivíduo a cada 2000 pessoas na população geral e até 1:333 na população suíça. A prevalência de DC em portadores de SD varia de 5 a 15%, conforme estudos europeus e americanos ²⁸⁻³¹.

Alguns autores descrevem a presença de associação de várias doenças autoimunes em um subgrupo de pacientes com SD ou mesmo maior agressividade dessas doenças, relacionando-as a presença de HLA específicos ³²⁻³⁵. Kinik et al. relataram o caso de um adolescente com DC, tireoidite de Hashimoto e diabetes mellitus associados à SD, cuja análise do perfil do HLA classe II demonstrou positividade para DRB107, DRB10301,

DRB3, DRB401 e DQB102³⁵. Griffin e cols evidenciaram alta prevalência de doenças da tireóide em pacientes com SD e diabetes mellitus insulino-dependente, sendo a diabetes de início precoce, o que poderia corresponder a um subgrupo dentro dos portadores de SD com risco elevado de doença autoimune mais agressiva³⁴.

1.2 Alterações imunológicas na SD

Alterações imunológicas são frequentemente encontradas em pacientes com SD, sendo por muito tempo associadas às infecções recorrentes, antigenemia positiva para hepatite B e/ou deficiência de zinco.

Durante a década de 80 estas alterações foram descritas como um modelo de senescência precoce do sistema imune, conceito este que permaneceu por décadas³⁶⁻⁴³. Estudos recentes têm refutado essa hipótese atribuindo às alterações tímicas morfofuncionais a causa destes achados. Algumas características imunológicas que diferem daquelas relacionadas à senescência têm sido descritas em SD, diminuindo a probabilidade das alterações da SD estarem relacionadas unicamente a essa teoria. Entre elas observamos as alterações da expansão de células T CD4⁺ “naive” dos primeiros anos de vida, a manutenção das células de memória em níveis normais mesmo em faixas etárias elevadas, as disfunções de interações entre linfócitos T e B e a redução de número e atividade de células NK CD3⁻ CD16⁺ CD56⁺⁴⁴⁻⁴⁹.

A imunidade celular é a mais acometida na SD, ocorrendo redução das subpopulações de linfócitos T CD3⁺ CD4⁺, ocasionalmente de linfócitos T CD3⁺ CD8⁺, assim como inversão da relação CD4/CD8^{41,44,45,47}. Em indivíduos normais, ao nascimento, os linfócitos T circulantes são em sua maioria linfócitos T “naive” (CD4⁺ CD45RA⁺ CD62L⁺). Nos primeiros anos de vida a maturação desses linfócitos ocorre através da ligação e estímulos com antígenos específicos, que leva a proliferação e aumento do pool de linfócitos T CD4⁺ com maturação para linfócitos T efetores e de memória

(CD4⁺ CD45RO⁺CD62L⁻). Alguns autores têm demonstrado que na vida adulta a proliferação extra-tímica de linfócitos "naive" passa a ter papel na manutenção dos linfócitos circulantes⁵⁰⁻⁵².

Crianças com SD podem apresentar número absoluto de linfócitos TCD4⁺ reduzidos ao nascimento, além de redução da expansão clonal de linfócitos T CD4⁺ naive nos primeiros anos, tanto para linfócitos T quanto linfócitos B. Os linfócitos B (CD19⁺) estão reduzidos em relação às crianças normais. Os linfócitos T gradualmente atingem os valores dos controles normais, por volta dos 10 anos de idade, entretanto os linfócitos B mantêm-se abaixo dos valores de normalidade das crianças controle para todas as faixas etárias^{44-46,48}.

Paradoxalmente à linfopenia B apresentada por estes pacientes, observa-se grande variação em relação às concentrações séricas de imunoglobulinas, dependendo da idade do paciente, com tendência à elevação das concentrações de IgG e IgA após os 6 anos de vida. Esses achados sugerem desregulação da interface T-B como causa ou associada a linfopenia B⁴⁹.

Estímulos infecciosos e/ou inflamatórios consecutivos dos linfócitos T levam a alterações funcionais e fenotípicas desta célula. Depois de repetidas ativações, o linfócito T apresenta redução acentuada da expressão de CD28 em linfócitos CD4⁺ caracterizando o linfócito T CD4⁺CD28^{null}^{51,53,54}. Esta perda da expressão do CD28 tem sido considerada como um bom marcador de senescência dos linfócitos T^{53,56}. Em pacientes sem SD com doenças autoimunes, estudos demonstram elevação da subpopulação de linfócitos T CD4⁺CD28^{null}^{55,57,58}. Estudos recentes descreveram a função de controle coestimulatório da molécula de CD28 na homeostase e função de células T reguladoras^{53,54}. Não há até o momento estudos publicados sobre linfócitos T CD4⁺CD28^{null} em pacientes com SD.

Em relação às células NK estudos iniciais demonstravam elevação destas células o que se assemelharia à evolução destas células no envelhecimento, porém sem distinção entre células NK (CD3⁻CD16⁺CD56⁺) e linfócitos CD3⁺CD16⁺CD56⁺^{14,59,60,61}. Entretanto, sabe-se hoje que as

células NK de pacientes com SD encontram-se reduzidas em números absolutos e ainda apresentam subpopulações distintas em relação à atividade lítica, o que se contrapõe aos achados relacionados ao envelhecimento^{44,45,62}.

1.3 O timo na SD

Estudos relacionados à estrutura e função tímica em pacientes com SD datam inicialmente da década de 60. Alterações estruturais e anatômicas do timo têm sido descritas em pacientes com SD, com perda da diferenciação córtico-medular, adelgaçamento do córtex, corpúsculos de Hassal com diâmetro aumentado e alterações císticas, depleção de timócitos e alterações de expressão de marcadores como LFA-1, CD1, CD2, CD3, TCR α,β , CD4 e CD8, bem como alterações de resposta a IL2 e IFN γ e ainda elevação da expressão de LFA-1 pelos linfócitos (esta codificada pelo cromossomo 21) e de ICAM-1 pelas células do estroma tímico. Essas alterações anatomofuncionais levariam a disfunções na diferenciação dos linfócitos, com alterações precoces da imunidade celular⁶³⁻⁷¹.

Em sangue fetal obtido por cordocentese, Thilaghanathan et al.⁷² observaram redução de subpopulações de linfócitos T, B e NK, comparados a fetos sem a síndrome, reforçando a hipótese de distúrbios de diferenciação do sistema imune já intra-útero, sugerindo que esse defeito seja não só de linfócitos timo-dependentes, mas também do sistema humoral e de células NK.

Todas as hipóteses até então elaboradas sugeriam que as alterações anatômicas e funcionais do timo de pacientes com SD seriam responsáveis pelos distúrbios do sistema imune e conseqüentemente levariam às infecções e neoplasias. Entretanto, pela falta de técnicas adequadas para análise da função tímica e pelo conceito vigente à época da involução do timo tornando-se apenas residual com declínio da função na vida adulta, desde a década de 90 até os últimos 3 anos não foram desenvolvidos estudos sobre o timo na SD.

Recentemente, uma nova tecnologia baseada no “real time PCR” tem permitido a avaliação da capacidade do timo em produzir e liberar novos linfócitos T. A recombinação das cadeias do receptor TCR durante o processo de maturação dos timócitos em linfócitos leva à geração de excisões de fragmentos de DNA, formando o chamado beta-TREC (“T cell receptor excision circles”). O processo de rearranjo das regiões variável (V), de diversidade (D) e junção (J) leva a recombinações da cadeia alfa do TCR com excisão de novos fragmentos circulares extracromossômicos do DNA, particularmente dos fragmentos que codificam as cadeias gama e delta do TCR, sendo que 70% dos linfócitos T alfa/beta recém liberados pelo timo expressam TREC. O fragmento pode ser (sj)TREC – com formação inicial do DNA episomal da região de sinalização de junção ou (cj)TREC – correspondente a região de codificação de junção do DNA para a cadeia alfa e com síntese posterior. Como a maturação dos linfócitos T e sua diferenciação quanto à função e especificidade são processos exclusivos do timo, a mensuração dos TRECs em linfócitos T “naive” circulantes realizada por “real time” PCR mostrou-se de grande valia na avaliação da função tímica em qualquer faixa etária. Os linfócitos que expressam o TREC em seu núcleo são denominados células recém emigradas do timo (CRET)⁷³⁻⁷⁷.

Até o nascimento, a maior parte do pool de células circulantes do indivíduo foi formada, porém o timo mantém papel importante na homeostase do pool de células imaturas até o final da adolescência. Após o nascimento, os precursores de linfócitos T provêm da medula óssea e existe grande queda na velocidade de liberação de linfócitos T imaturos na circulação, sendo que os níveis de TREC e de CRET circulantes decaem progressivamente até por volta dos vinte anos de idade^{74,76}.

A avaliação da expressão de TREC em células mononucleares mostra-se reduzida nos pacientes com SD e essa redução está diretamente relacionada à idade^{48,78,79}. Estes estudos ressaltam a importância deste achado e colocam a possibilidade de que citocinas poderiam modular a função do timo e assim poderiam se usadas para tratamento das imunodeficiências associadas à SD⁷⁸.

1.4 Autoimunidade e Tolerância em SD

O desenvolvimento de doenças autoimunes pressupõe a perda do fenômeno de tolerância central a/ou periférica.

A tolerância central corresponde à manutenção da homeostase entre o sistema imunológico do indivíduo e seus autoantígenos, através da seleção positiva para linfócitos viáveis e antígeno-específicos e seleção negativa para linfócitos que reajam contra determinantes antigênicos do próprio indivíduo. O processo de seleção é bastante competente, entretanto permite liberação de poucas células reativas^{50,51}. O timo também é responsável pela diferenciação de linfócitos T em células T reguladoras, denominadas Treg naturais, que expressam CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺⁸⁰.

Linfócitos T “naive” com reatividade para auto-antígenos que escapem à seleção negativa e atinjam a periferia serão reconhecidos pelas células Tregs naturais, ou por Treg induzidas na periferia (CD4⁺CD25-Foxp3⁺), formadas a partir do amadurecimento e ativação de linfócitos T “naive” circulantes, além de outras células com ação reguladora. Este processo é denominado tolerância periférica^{50,51}. Em tecidos periféricos, a tolerância se dá através de anergia, apoptose ou supressão dos clones de células que reconhecem autoantígenos.

A quantificação de células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺Foxp3) em sangue periférico (Treg) tem sido realizada em diversas doenças autoimunes, como esclerose múltipla, lupus eritematoso sistêmico, alopecia areata, diabetes mellitus insulino dependente, artrite reumatóide e doença enxerto versus hospedeiro, e em auto-imunidade associada a imunodeficiência comum variável⁸¹⁻⁸³.

Em pacientes com SD Roat et al.⁷⁸ observaram elevação do número de células Treg em sangue periférico em relação aos controles de mesmo sexo e idade.

A Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança do HCFMUSP vem mantendo como uma de suas linhas de pesquisa a

avaliação das alterações imunológicas da SD e tem o interesse de expandir estes estudos, avaliando fatores que possam estar relacionados à ocorrência de autoimunidade nestes pacientes. Assim, pelo que já se encontra descrito em literatura, a hipótese elaborada para este estudo é:

- A disfunção tímica que ocorre precocemente em pacientes com SD tem como consequência a perda da tolerância, que pode predispor o paciente com SD ao desenvolvimento de autoimunidade. Essa disfunção é variável para cada paciente, podendo haver relação entre intensidade da disfunção tímica e expressão de doenças autoimunes nestes pacientes.

2 OBJETIVOS

Para avaliação desta hipótese, elaborou-se este projeto que tem como objetivo:

2.1 Objetivo principal:

Avaliar a função tímica em pacientes com SD e a presença de possível relação entre disfunção tímica e autoimunidade nestes pacientes.

2.2 Objetivos secundários:

1 - Avaliar as subpopulações de linfócitos circulantes (*naïve* e memória) nos pacientes com SD;

2 - Avaliar a subpopulação de linfócitos T CD4⁺CD28^{null} em sangue periférico nestes pacientes.

3 – Avaliar a subpopulação de células Treg naturais em sangue periférico dos pacientes com SD.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS:

3.1 Casuística:

3.1.1 Critérios de inclusão:

Foram incluídos os pacientes que preenchiam os critérios abaixo:

- diagnóstico de SD confirmado por fenótipo clínico e estudo genético em acompanhamento ativo na Unidade de Alergia e Imunologia até dezembro de 2010 e

- idade acima de 10 anos: este critério foi adotado pela menor variação dos parâmetros imunológicos avaliados no estudo acima desta faixa etária e

- concordância por escrito do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos responsáveis.

3.1.2 Critérios de exclusão:

Foram excluídos os pacientes com um ou mais dos critérios abaixo:

- retornos irregulares e que após convocação por 3 vezes consecutivas não compareceram aos retornos;

- uso de imunossupressores;

- uso de imunoglobulina endovenosa;

- pacientes com SD sem manifestações clínicas de doença autoimune que apresentassem autoanticorpos.

Para controlar os efeitos da idade e sexo sobre as variáveis estudadas, os pacientes para os grupos de comparação sem SD foram emparelhados por idade em todos os casos e preferencialmente por sexo com os pacientes com SD.

3.1.3 Grupos de Avaliação

Dos 48 pacientes com Síndrome de Down em seguimento ativo no Ambulatório da Unidade de Alergia e Imunologia, 22 preenchiam os critérios acima definidos.

Os grupos para análise da função tímica ficaram assim constituídos (Figura 1):

- **Grupo SD** (n=22) - pacientes com SD.

Estes foram subdivididos em 2 grupos:

- **Grupo SDAI** (n=11) – SD associada a autoimunidade
- **Grupo SDNAI** (n=11) – SD sem doenças autoimunes e sem autoanticorpos detectáveis

Além dos grupos previamente descritos, foram incluídos dois grupos considerados como controle:

- **Grupo AI** (n=11) - pacientes sem SD com doenças autoimunes semelhantes às dos pacientes com SD, sem terapêutica imunossupressora, sendo incluídos pacientes em seguimento na Unidade de Endocrinologia do Instituto da Criança – HCFMUSP – SP.
- **Grupo CO** (n=11) - pacientes controle saudáveis de outras unidades do Departamento de Pediatria, em acompanhamento de Puericultura ou mesmo em investigação para distúrbios não imunológicos e que não estivessem sob tratamento com imunossupressores, ou então familiares de pacientes sem queixa aguda e sem diagnóstico de doenças autoimunes.

Para as análises iniciais foram formados 2 grandes grupos, para avaliação da função tímica em pacientes com Síndrome de Down (**SD; n=22**) e sem a síndrome (**NSD; n=22**, correspondente à **junção dos grupos AI e CO**).

Para podermos avaliar a relação entre disfunção tímica e autoimunidade, os pacientes foram então reagrupados de acordo com a presença ou não de autoimunidade em dois novos grupos:

Grupo **CAI (n=22)** - pacientes com ou sem SD, portadores de **doenças autoimunes**, definidas como manifestações clínicas de doenças autoimunes e presença de autoanticorpos (**correspondentes à junção dos**

grupos SDAI e AI). A mediana de idade foi de 14 anos e 10 meses com variação de 11 anos e 8 meses a 19 anos e 3 meses.

Grupo **NAI** (n=22) – pacientes com ou sem SD, que não apresentavam doenças autoimunes e nem autoanticorpos. A mediana de idade foi de 14 anos e 5 meses com variação de 11 anos e 7 meses a 17 anos e 6 meses.

Para fins de avaliação da função tímica na associação das condições SD e AI, os grupos **SDAI**, **SDNAI** e **AI** foram comparados um a um com o grupo **CO**, além da comparação entre os grupos SDAI e SDNAI.

3.2 Metodologia

Todos os pacientes com Síndrome de Down foram submetidos a um protocolo padronizado (ANEXO A) aplicado pela pesquisadora responsável, onde foram incluídos dados clínico-epidemiológicos tais como: idade, sexo, presença de cardiopatias, cirurgias cardíacas progressas, infecções recorrentes, manifestações relacionadas a doença celíaca, doenças da tireóide, diabetes mellitus, anemia hemolíticas, artropatias, entre outras manifestações de doenças autoimunes. Estes pacientes foram também submetidos à coleta de exames laboratoriais, conforme descritos abaixo.

3.2.1. Coleta:

O sangue para realização da avaliação laboratorial foi coletado por punção venosa antecubital com o paciente em jejum, sem sintomatologia infecciosa ou uso de antibióticos nos últimos 7 dias antes da coleta. Foram colhidos no total 10 a 15 ml de sangue de cada paciente para realização dos exames, de acordo com as precauções universais, com agendamento prévio. Todas as coletas foram realizadas na sala de coleta do Instituto da Criança.

As análises foram realizadas no Laboratório do Instituto da Criança, no Laboratório do Instituto Central e no Laboratório de Investigação Médica do Departamento de Pediatria (LIM 36).

3.2.2. Quantificação do número de cópias de TREC em sangue total

3.2.2.1 Obtenção do DNA total

O DNA total foi obtido a partir de 300 uL de sangue total utilizando kit Illustra Blood Genomic Prep Spin Kit (GE Healthcare) seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram eluídas em 150 uL de água bidestilada e verificadas quanto a concentração e pureza através do nanoespectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare).

3.2.2.2 PCR quantitativo (qPCR)

O número de cópias de TREC foi determinado através de PCR em tempo real utilizando o método da curva padrão. A curva padrão foi obtida utilizando o fragmento de sjTREC clonado em um plasmídeo⁷⁶. As diluições de 10x para a construção da curva padrão variaram desde 10^{10} até 10^4 cópias de TREC e para a quantidade de DNA variaram (diluições de 2x) a partir de 400 ng até 25 ng. Todas as amostras foram realizadas em triplicata. As reações foram realizadas no termociclador StepOne Plus Real Time PCR (Applied Biosystems). Foram utilizados 200 ng de DNA total em um volume final de 25 uL contendo 500 nM de cada primer e 12,5 uL de reagente SYBR Green (QuantiFast SYBR Green PCR KIT). Os “primers” utilizados para a reação de PCR para sjTREC foram: senso 5'-CCCTTTCAACCATGCTGACA-3'e anti-senso 5'-AGGTGCCTATGCATCACCGT-3' e para o gene da beta-actina foram: senso 5'- AAG ATG ACC CAG GTG AGT GG - 3' e anti-senso 5'- AAC GGC AGA AGA GAG AAC CA - 3'. As condições de ciclagem da PCR foram: 10 minutos a 95°C, seguidos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C, e 30 segundos a 72°C por 50 ciclos consecutivos.

Determinação do número de cópias por mililitro de sangue

A determinação do número de cópias/mL de sangue total foi obtida através da seguinte fórmula ⁷⁶:

$$\left(\frac{(\text{DNA total } (\mu\text{g}) \text{ em } 300 \mu\text{L de sangue total})}{(\text{DNA } (\mu\text{g}) \text{ amplificado em qRT-PCR})} \right) \times (\text{no. de TREC}) \times \left(\frac{1000}{300} \right)$$

3.2.3. Análise da expressão dos marcadores celulares por citometria de fluxo.

A imunofenotipagem por citometria de fluxo dos linfócitos foi realizada no citômetro LRS II Fortessa (BD) utilizando-se sangue total coletado em EDTA K3. Após a incubação com solução de lise LYSING BUFFER (BD Pharm Lyse - San Diego - CA) e sucessivas lavagens, as amostras foram ressuspendidas em PBS.

Foram utilizados os anticorpos com as seguintes especificidades antigênicas e fluorocromos: CD3(PE-Cy7), CD4(APC-Cy7/PECy7), CD8(APC-Cy7), CD19(V500), CD16(V450), CD56(PerCP), CD28(FITC), CD40(APC-Cy7), CD45RA(V450), CD45RO(APC), CD62L(PerCP), CD127(V450), controles isotípicos IgG2a,k-PE adquiridos da Pharmingen (BD Pharmingen - San Diego – CA e CD25(PerCP) (EXBIO - Praga-República Tcheca) e Foxp3(PE) (eBioscience - San Diego – CA).

1×10^6 células foram incubadas com diferentes combinações tituladas de anticorpos por 30 minutos em ambiente protegido de luz, para determinação das seguintes subpopulações de linfócitos: linfócitos T auxiliares ($\text{CD3}^+\text{CD4}^+$), linfócitos T citotóxicos ($\text{CD3}^+\text{CD8}^+$), linfócitos B ($\text{CD19}^+\text{CD40}^+$), células NK ($\text{CD3}^-\text{CD16}^+\text{56}^+$), linfócitos T “naive” ($\text{CD4}^+\text{CD45RA}^+\text{CD62L}^+$), linfócitos T de memória ($\text{CD4}^+\text{CD45RO}^+\text{CD62L}^-$), linfócitos T reguladores ($\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{CD127}^-\text{Foxp3}^+$). Após a incubação as células foram lavadas e ressuspendidas em PBS para leitura do citômetro.

Para as marcações de Foxp3 e seu respectivo controle isotípico, após a marcação externa como descrito acima, as células foram incubadas com solução de permeabilização (Cytotfix/Cytoperm - BD Pharmingen - San Diego - CA) por 30 minutos, lavadas e incubadas, por mais 30 minutos, com PBS contendo 1% Paraformaldeído 0,5% Tween 20. Após esse período, as

amostras foram lavadas e incubadas por 2 horas com o anticorpo anti-Foxp3 ou controle isotípico IgG2a,k. As amostras foram lidas imediatamente do citômetro de fluxo LRS II Fortessa.

Todas as análises foram realizadas no software FlowJo (Tree Star - Ashland, OR) e os valores obtidos em percentuais foram convertidos em números absolutos de acordo com o hemograma.

3.3 Aspectos Éticos

Este estudo foi aprovado pela CAPPesq sob número 0633/08.

Os responsáveis pelos pacientes e pelos controles saudáveis foram informados sobre o estudo, métodos e necessidade de exames laboratoriais (coleta de sangue), sendo os pacientes e os controles incluídos no estudo apenas após a anuência dos pais ou responsáveis legais com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), de acordo com as normas do Comitê de Pesquisa e Ética desta Instituição. (ANEXOS B, C, D)

3.4 Análise Estatística

As análises foram realizadas em softwares estatísticos SPSS 16.0 e GraphPad InStat 3, adotando-se nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$). As figuras foram elaboradas no software Graphpad PRISM 5.0.

Variáveis qualitativas ordinais foram descritas pela mediana e intervalo de variação e para comparação entre elas foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

Na comparação dos grupos de pacientes SDAI, SDNAI e AI com o grupo de controles um a um, utilizamos o teste de Mann-Whitney com aplicação da correção de Bonferroni^{83,84}.

4 RESULTADOS

A síntese dos dados clínico-epidemiológicos dos pacientes com SD com e sem AI encontra-se na Tabela 1 e Figura 2.

O grupo **SD** apresentou mediana de idade à época da coleta dos exames de 14 anos e 6 meses com variação de 11 anos e 8 meses a 19 anos e 3 meses, sendo 7 do sexo femininos e 15 masculino. Todos apresentavam trissomia livre (cariótipo 47XX+21G ou 47XY+21G).

O grupo **NSD** teve mediana de idade de 15 anos e 10 meses e variação 11 anos e 6 meses a 17 anos e 1 mês.

Sete dos 22 pacientes com SD apresentavam cardiopatia congênita, sendo comunicação interventricular, comunicação interatrial, hipertensão pulmonar, persistência do canal arterial e associações entre estas malformações as mais frequentes. Um dos pacientes havia sido submetido a correção cirúrgica para CIV porém sem timectomia.

Dos 11 pacientes com SD e doença autoimune 4 eram do sexo masculino e 7 feminino, com mediana de idade de 14 anos e 11 meses e variação de 11 anos e 8 meses a 19 anos e 7 meses. Destes, 10 apresentavam hipotireoidismo e um deles hipertireoidismo. Dos pacientes com hipotireoidismo (n=10), a mediana de idade de início da doença foi de 2 anos e 3 meses (8 meses a 10 anos), sendo em todos eles presentes os autoanticorpos no momento do diagnóstico, confirmando assim a autoimunidade em sua fisiopatologia. Entre os pacientes com hipotireoidismo, uma adolescente apresentava diabetes tipo I, outra, doença celíaca e uma terceira apresentava associação entre ambas as doenças. Ainda uma paciente com hipotireoidismo apresentava alopecia.

Os pacientes dos grupos SDNAI, AI e CO apresentavam idade e sexo semelhantes aos do grupo SDAI ($p < 0,05$)(Figura 1).

Os pacientes com doença autoimune sem SD apresentavam sexo e idade semelhantes aos do primeiro grupo e foram pareados também por doença com o grupo SDAI. Assim, 10 crianças apresentavam hipotireoidismo; destas, 4 apresentavam diabetes mellitus tipo I associado,

uma criança tinha hipertireoidismo (doença de Graves). Nenhum destes pacientes apresentava síndromes genéticas (Figura 2).

Os resultados das comparações entre os grupos de pacientes com Síndrome de Down (SD) e sem a síndrome (NSD) para leucócitos, linfócitos e suas subpopulações encontram-se resumidos nas Tabelas 2 e 3.

Observamos que os ***pacientes com SD apresentaram redução significativa da subpopulação de células T naive*** (Figuras 3a e 3b) ***e de linfócitos B CD19+*** (Figuras 4a e 4b) ***e elevação de linfócitos T CD4⁺CD28^{null} em valores absolutos e percentuais*** (Figuras 5a e 5b), ***bem como linfócitos Treg elevados em valores percentuais*** (Figuras 6a e 6b) em relação aos pacientes sem a síndrome.

A tabela 4 demonstra a distribuição das concentrações de sjTREC/mL de sangue total expressas em log para os grupos SD e NSD. Observamos que os ***pacientes com SD apresentaram concentrações de TREC/mL significativamente menores que os pacientes sem a SD*** (Figura 7).

Ao avaliarmos os pacientes subdividindo-os de acordo com a presença (**CAI**) ou ausência de doenças autoimunes (**NAI**), para observação do comprometimento da função tímica e alterações imunológicas nestes pacientes, em valores absolutos, observamos os dados das Tabelas 5 e 6.

Os pacientes com doença autoimune apresentaram reduções significativas de leucócitos, linfócitos totais e particularmente linfócitos T CD4⁺ e suas subpopulações (T naive e T memória) em valores absolutos, o que não se repetiu na análise dos valores percentuais, em relação aos controles sem autoimunidade, não havendo diferenças entre os grupos para as demais subpopulações de linfócitos T CD4⁺ (CD4⁺CD28^{null}, Treg) para outros linfócitos (linfócitos T CD8⁺, linfócitos B CD19⁺) e para células NK em ambas as análises.

A tabela 7 demonstra a distribuição das concentrações de TREC/mL de sangue total expressas em log para os grupos CAI e NAI. Não houve diferença entre os grupos na expressão do TREC em sangue periférico.

Para avaliar se o grupo SDAI apresentava disfunção tímica em relação ao SDNAI e controles saudáveis, foi realizada comparação entre o

grupo controle e os grupos SDAI, SDNAI e AI, com 11 pacientes em cada grupo.

Os resultados obtidos com a comparação entre os grupos SDAI, SDNAI, AI e CO encontram-se expressos nas tabelas 8 e 9.

As tabelas 10, 11 e 12 ilustram os valores de p para cada comparação realizada. Após a correção de Bonferroni, **observamos que pacientes com SD com doença autoimune (SDAI) apresentaram redução de linfócitos T CD4⁺ em relação aos controles, com diminuição dos linfócitos T naive** (Figura 8) **e de linfócitos B CD19⁺** (Figura 9).

Os pacientes do grupo SDNAI não tiveram diferenças significantes em relação aos controles quanto a subpopulação de linfócitos T CD4⁺; entretanto também apresentaram redução das células T naive e de linfócitos B CD19⁺. Para ambos os grupos comparados isoladamente com o controle, os níveis de TREC após a correção de Bonferroni não apresentaram diferenças significantes.

Isoladamente, entretanto, a análise apontou diferenças entre os grupos SDAI e CO e também SDNAI e CO com relação às medianas de sjTREC .

A comparação entre os grupos SDAI e SDNAI evidenciou diferença significativa para as concentrações de TREC, tendo os pacientes com SD e doença imune associada apresentado concentrações menores de TREC que aqueles sem autoimunidade.

5 DISCUSSÃO

A Síndrome de Down representa até hoje uma doença intrigante, por se apresentar com características imunológicas semelhantes às daquelas do envelhecimento, antes atribuído à disfunção tímica que se acreditava ocorrer em ambos os processos. Desde o conhecimento de que o timo apresenta função reduzida, mas presente em idosos, o estudo do timo na SD foi bastante ampliado, chegando a ser proposto que a disfunção tímica da SD pode ser peculiar a esta síndrome, caracterizando esta doença como uma doença imunológica primária⁴⁵. Esta linha de pesquisa se consolidou na Unidade de Alergia e Imunologia após o estudo das imunodeficiências na SD, quando observamos presença significativa de autoimunidade, em especial da tireóide, nos pacientes em seguimento⁸⁵. Inicialmente atribuímos a autoimunidade aos processos infecciosos de repetição e à senescência, e só após a publicação de vários estudos sobre timo, em especial nos pacientes com defeitos da linha média, pensamos também neste paralelismo com a SD. A associação entre cardiopatia e disfunção tímica poderia estar mais uma vez presente, levando a defeitos da função tímica. Pensar nesta disfunção e na presença de autoimunidade foi consequência natural, porém ainda restava a dificuldade do estudo da função tímica. A possibilidade de avaliar a função tímica pela quantificação de células recém imigradas do timo foi de grande valia e a partir disso idealizou-se este estudo. Até o momento, não há estudos semelhante em nosso meio e os resultados aqui encontrados podem estimular outros pesquisadores a adotar esta linha de pesquisa.

Pacientes com SD apresentam expressão fenotípica variável para cardiopatias, alterações neurológicas, infecções e doenças autoimunes. As alterações imunológicas observadas nestes pacientes também tem espectro fenotípico variável e os estudos recentes sugerem que estas alterações são decorrentes de distúrbios na diferenciação destes linfócitos devidos a alterações de estrutura e função tímica. Sabendo que as doenças autoimunes podem resultar de distúrbios na tolerância central e/ou periférica, e sendo o timo o principal responsável direta ou indiretamente por estes

mecanismos, seria de se esperar que diferentes graus de acometimento do timo levassem a expressão de diferentes fenótipos, com maior risco para doenças autoimunes na SD.

Os grupos aqui analisados permitiram observar os efeitos isolados e em associação da SD e da AI nas alterações tímicas e de subpopulações de linfócitos para estes grupos.

Nesta casuística observou-se que a SD levou à menor expressão de sjTREC/mL em sangue total na comparação com indivíduos sem esta síndrome; o mesmo não foi observado ao avaliarmos a autoimunidade isoladamente. Os estudos correlacionando autoimunidade e alterações tímicas observaram que para doenças como a artrite idiopática juvenil e esclerose múltipla, ocorre redução nas concentrações periféricas de células TREC+⁵⁶. Esta casuística tem como característica doenças autoimunes órgãos específicas, principalmente tireoidite de Hashimoto e em menor percentual diabetes mellitus. Estudos sobre função tímica nestas patologias são escassos e para o diabetes, em particular, apontam para elevação dos níveis de TREC como efeito secundário de medicamentos como a reposição insulínica⁸⁷.

Prada et al.⁷⁹ e Roat et al.⁷⁸ avaliaram o percentual de células mononucleares que expressavam sjTREC, realizando “PCR real time” em PBMC, em crianças com SD de faixa etária de 1 a 10 anos observando redução de células TREC+ nos pacientes analisados, com grande influência da idade nos resultados^{78,79}.

Pacientes com SD apresentam já ao nascimento redução significativa de linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD4⁺ “naive”. Embora a expansão desses linfócitos normalmente observada na população geral nos primeiros meses de vida também esteja comprometida na SD, no decorrer dos anos os pacientes com SD gradualmente expandem o pool de células T aproximando-se dos níveis de linfócitos considerados normais para a população por volta dos 10 anos de idade, às custas de proliferação periférica dos linfócitos.

O fragmento TREC é formado durante a recombinação VDJ na formação dos linfócitos T intratímico e não se divide ou multiplica durante a proliferação periférica do linfócito. Assim os TRECs são distribuídos em sua progenia e a relação TREC/célula é sensivelmente alterada por esta proliferação.

Assim o baixo débito tímico de linfócitos T naive já ao nascimento e durante a vida dos pacientes com SD, associado à proliferação periférica progressiva durante os primeiros anos de vida e diferenciação dos linfócitos nestes pacientes poderiam ser um viés de análise e justificar as grandes discrepâncias observadas na literatura entre os pacientes com SD e controles normais quando se avalia TREC/célula. Talvez este não seja o método mais fidedigno para avaliar estes pacientes.

Este é o primeiro estudo em pacientes com SD que mensura sjTREC em sangue total (sjTREC/mL), e não em células mononucleares isoladas (TREC/cél). A padronização da determinação dos níveis de TREC em sangue total demonstra que os resultados são comparáveis àqueles obtidos em PBMC e em linfócitos T CD4⁺ purificados, sendo considerado atualmente o método mais fidedigno em relação à análise da função tímica por desconsiderar em sua metodologia o número de linfócitos, não sofrendo portanto interferência com a proliferação periférica de linfócitos dos primeiros anos de vida ⁷⁶.

Nesta casuística a média de idade dos pacientes é maior que nos estudos anteriores. Embora relevantes, as diferenças entre as concentrações de sjTREC/mL não foram de grande magnitude, talvez devido ao método, que retira de sua análise o viés acima descrito, bem como devido à faixa etária, onde as variações reduzem sua magnitude.

A comparação entre os pacientes com SD e doença autoimune e aqueles com SD sem autoimunidade demonstrou que *os pacientes com SD e AI expressam menor quantidade de TREC que os pacientes com SD sem AI nas análises individuais*. Esses achados sugerem que na *população de pacientes com SD poderia haver um subgrupo com maior acometimento da*

função tímica que estaria predisposto a doenças autoimunes (portanto um fenótipo imunológico de risco).

Estudos com maior número de casos e comparando as duas metodologias de quantificação do TREC em SD seriam necessários para a confirmação destes dados.

Os leucócitos totais não estão alterados nesta população de SD em comparação aos indivíduos sem a SD, mesmo naqueles que apresentaram linfopenia. A leucopenia não é um achado associado à SD na literatura, sendo relatados apenas distúrbios funcionais de fagócitos (quimiotaxia, atividade fagocítica e produção de anion superóxido)⁸⁶.

A leucopenia observada nos pacientes com AI em relação àqueles sem doença autoimune associou-se a linfopenia. Os estudos sobre linfopenia e autoimunidade em humanos são escassos; entretanto, modelos experimentais em ratos BB e camundongos NOD demonstraram a associação entre linfopenia e tireoidite e/ou diabetes, havendo controvérsias se a linfopenia seria fator causal ou um fenômeno concomitante nestas doenças⁸⁹⁻⁹¹.

A observação das diversas subpopulações de linfócitos simultaneamente permite levantar hipóteses sobre a função tímica e as inter-relações celulares.

Neste estudo não observamos diferenças entre os grupos de pacientes com SD e sem SD para os números absolutos de linfócitos T CD4⁺ “naive” e memória. Entretanto cabe aqui considerar que os pacientes com AI estavam distribuídos em ambos os grupos, e como estes eram linfopênicos, podem ter reduzido a mediana do grupo NSD. Para testarmos essa hipótese comparamos então os pacientes com SD subdivididos em com e sem autoimunidade apenas com os controles saudáveis, observando assim que ambos os grupos de pacientes com SD, com e sem doença autoimune, apresentaram redução significativa de linfócitos T CD4⁺ “naive” em relação aos controles, sem diferenças nos valores absolutos de T CD4⁺ de memória.

Quando inicialmente descritos, os linfócitos T naive (CD4⁺CD45RA⁺CD62L⁺) eram considerados linfócitos recém egressos do

timo e portanto marcadores de função tímica recente, encontrando-se reduzidos em pacientes timentomizados⁹². Esta subpopulação de linfócitos encontra-se reduzida nos pacientes com SD desta casuística, sendo este achado comparável com os de Kusters et al⁴⁵ e Bloemers et al.⁴⁸. Estudos recentes demonstram que a expressão em células T CD4+ periféricas de CD31 delimitaria a população efetivamente recém egressa do timo, caracterizada como T CD4⁺TREC^{high}CD31^{+thymic} e assim estudos com este marcador na SD e autoimunidade tornam-se necessários para melhor entendimento da função tímica nestes pacientes⁹³.

Não há estudos correlacionando valores de linfócitos T naive periféricos com tireoidite ou diabetes. Entretanto uma publicação recente comparou as concentrações desses linfócitos em sangue periférico e tecido tireoideano, observando maior influxo destes linfócitos no tecido tireoideano nos primeiros 30 meses de doença. Esse achado sugere a possibilidade de mecanismos fisiopatológicos intrateciduals que não estão sendo contemplados nas análises realizadas em sangue periférico⁹⁴.

Até o presente momento não há estudos publicados sobre a avaliação dos linfócitos T CD4⁺CD28^{null} em pacientes com SD.

Embora seja marcante a mudança de paradigma na SD no que concerne às alterações imunológicas decorrentes da senescência e mesmo com o conceito atual de defeitos intrínsecos do sistema imune, particularmente o timo-dependente, alguns achados ainda sugerem senescência precoce do sistema imune, não como um todo, mas particularmente de linfócitos T e sua interação com linfócito B.

O CD28 é uma molécula co-estimulatória expressa pelos linfócitos T cuja função principal é a indução da produção de IL-2 pelos linfócitos T, atuando assim na proliferação e diferenciação de linfócitos T, bem como na interação linfócito T-linfócito B. Durante a ativação do linfócito T a molécula de CD28 tem sua expressão reduzida transitoriamente. Sob repetidas ativações, os linfócitos T progressivamente reduzem a expressão de CD28, sendo caracterizados imunofenotipicamente como CD4⁺CD28^{null}, representando assim linfócitos terminalmente diferenciados.

Nesta casuística observamos que *os pacientes com SD tem subpopulação de linfócitos CD4⁺CD28^{null} significativamente elevada em relação aos pacientes sem SD*. Considerando-se a diminuição do pool de linfócitos T CD4⁺ “naive” nos pacientes com SD, e sendo a exposição ambiental destes pacientes semelhantes a crianças normais, os linfócitos T dos pacientes com SD estariam susceptíveis a maior número de estímulos por linfócito individualmente, o que levaria a senescência precoce destes linfócitos, caracterizada pela diminuição de expressão de CD28.

Alguns autores observaram o aumento de linfócitos T CD4⁺CD28^{null} em doenças autoimunes como artrite reumatoide, esclerose múltipla e diabetes mellitus, sugerindo assim o papel destas células na fisiopatologia de algumas doenças autoimunes.

Não observamos diferenças entre os grupos com e sem autoimunidade nos valores de linfócitos T CD4⁺CD28^{null}. Há que se lembrar que as principais doenças autoimunes nestes pacientes foram a tireoidite (90% dos casos) seguida de diabetes mellitus tipo I (36,6%) em um número pequeno de casos. Modelos experimentais em camundongos demonstram o papel da molécula de CD28 na homeostase de células Treg e prevenção de tireoidite^{94,95}. Não há estudos sobre linfócitos T CD4⁺CD28^{null} em doenças autoimunes da tireóide. Para o diabetes mellitus estudos apontam a elevação no número desses linfócitos, correlacionado esse aumento com maior risco cardiovascular em adultos⁹⁶.

Também não observamos diferenças significantes entre os valores desta subpopulação de linfócitos quando dividimos o grupo de paciente com SD com e sem autoimunidade, o que sugere assim que a SD seria a principal responsável pela elevação destas células e que as doenças autoimunes por estes pacientes apresentados não teriam relação com os linfócitos em questão.

Mais estudos são necessários para confirmar estes achados, bem como ampliar a caracterização destas células quanto a outros marcadores de ativação e interrelação com outras células.

Os pacientes com SD e aqueles com autoimunidade não apresentaram, nesta casuística, diferenças em relação aos controles nos valores absolutos de linfócitos T reguladores naturais. Nossos achados não são comparáveis aos de Roat et al.⁷⁸, pois estes analisaram o percentual de células T reg, além da população por eles analisadas ser de faixa etária menor.

A linfopenia B tem sido observada em vários estudos de pacientes com SD. Ao contrário dos linfócitos T, que se elevam progressivamente com o passar dos anos, os linfócitos B na SD são reduzidos desde o nascimento mantendo-se assim por toda a infância e vida adulta, com mais de 80% dos pacientes abaixo do percentil 10 de normalidade⁴⁴.

Neste estudo os pacientes com SD apresentaram linfopenia B significativa quando comparados aos pacientes sem SD. A autoimunidade não demonstrou papel relevante na alteração dos linfócitos B CD19+.

Quando comparados em relação à célula NK, não houve diferenças entre os grupos com e sem AI e nem naqueles com e sem SD, o que está de acordo com os estudos mais recentes sobre a quantificação destas células.

6 CONCLUSÕES

- Este estudo evidenciou a presença de disfunção tímica em pacientes com SD, mais evidente naqueles pacientes com SD associada a autoimunidade quando se avaliam as concentrações séricas de TREC.

- A redução dos linfócitos T naive associada a número normal de linfócitos T de memória sugere disfunção tímica primária, não compatível com processo de senescência.

- A observação do aumento do número de linfócitos CD4+CD28null poderia ser decorrente de múltiplos estímulos em um número menor de linfócitos, o que provavelmente provocaria a diferenciação terminal destes linfócitos.

- A comparação dos valores percentuais de células Treg entre os grupos demonstra elevação de células Treg nos pacientes com SD, particularmente para aquele subgrupo com autoimunidade associada.

7 ANEXOS

ANEXO A: PROTOCOLO CLINICO- EPIDEMIOLÓGICO-LABORATORIAL PROTOCOLO: SÍNDROME DE DOWN E AUTOIMUNIDADE

NOME: _____ PRONTUÁRIO: _____

DN: ___/___/___ Local: _____

Procedência: _____

Mãe: _____ Idade: _____

Pai: _____ Idade: _____

Endereço: _____

Telefone para contato : _____

CONSANGUINIDADE: () SIM () NÃO

DOENÇAS AUTOIMUNE EM FAMILIARES () SIM () NÃO

Quem _____ Quais _____

IDADE MATERNA AO NASCIMENTO: _____

CARDIOPATIA: () SIM () NÃO

Qual? _____

() CIRURGIA CARDÍACA

INFECÇÕES: () SIM () NÃO Quais?

OUTRAS INTERCORRÊNCIAS:

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS RELACIONADAS À DOENÇA CELÍACA :

Idade início sintomas: _____ Idade diagnóstico:

() DIARRÉIA CRÔNICA

- () BAIXA ESTATURA
- () ANEMIA FERROPRIVA REFRACTÁRIA A TRAT/O
- () ANEMIA POR DEF DE FOLATO E VITAMINA B12
- () OSTEOPOROSE
- () HIPOPLASIA DO ESMALTE DENTÁRIO
- () ARTRALGIAS OU ARTRITES
- () CONSTIPAÇÃO INTESTINAL REFRACTÁRIA AO TRATAMENTO
- () ATRASO PUBERAL, IRREGULARIDADE DO CICLO MENSTRUAL
- () ESTERILIDADE
- () ABORTOS DE REPETIÇÃO
- () ATAXIA, EPILEPSIA, NEUROPATIA PERIFÉRICA, MIOPATIA
- () MANIFESTAÇÕES PSIQUIÁTRICAS (DEPRESSÃO, AUTISMO, ESQUIZOFRENIA)
- () ÚLCERA AFTOSA RECORRENTE

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DE DOENÇAS DA TIREÓIDE:

Idade início sintomas: _____ Idade diagnóstico: _____

- () BAIXO GANHO ESTATURAL
- () GANHO DE PESO
- () MIXEDEMA
- () RINORRÉIA
- () RETARDO DO DNPM
- () QUEDA DE CABELOS
- () CONSTIPAÇÃO INTESTINAL
- () BÓCIO
- () PELE XERÓTICA
- () DERRAME PERICÁRDICO E PLEURAL
- () ATRASO PUBERAL
- () CRESCIMENTO LENTO DE UNHAS E CABELOS
- () HIPOATIVIDADE, SONOLÊNCIA

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS RELACIONADAS AO DIABETES MELLITUS:

Idade início sintomas: _____ Idade diagnóstico: _____

- () CÇAS < 1 ANO () IRRITABILIDADE, DESCONFORTO, IRRITAÇÃO
 () TORPOR, COMA
 () ENURESE APÓS CONTROLE ESFINCTERIANO
 () CÇAS > 3 ANOS () POLIÚRIA
 () POLIDIPSIA
 () POLIFAGIA
 () PERDA DE PESO
 () Piodermites
 () Monilíase vaginal ou vulvar recorrentes

OUTRAS DOENÇAS AUTOIMUNES ASSOCIADAS À SD:

- () MANIFESTAÇÕES ARTICULARES: () ARTRALGIA
 () EDEMA E CALOR LOCAL
 () ANEMIA HEMOLÍTICA / TRANSFUSÕES
 () ALOPÉCIA
 () HEPATITE

AVALIAÇÃO CLÍNICO- LABORATORIAL:

DATA							
Peso							
Estatura							
Hb							
Ht							
Leuc							
Neut							

Linf							
Plaq							
IgG							
IgM							
IgA							
IgE							
FAN							
FR							
T4I							
TSH							
Anti micros							
AntiTG							
AntiPO							
TRAB							
Glicemia							
Anti insulina							
Anti ilhota							
IgA tGT							
Anti endomis							
HLA DQ2 e DQ8							
CD3+							
CD4+							
CD8+							
CD19+							
CD 16+ ou 56+							
CD28null (+)							
CD4+CD45RA+							
CD4+CD45RO+							
CD4(+)CD25(+)							
TREC							

Foxp3							
-------	--	--	--	--	--	--	--

Biópsia de intestino delgado:

TRATAMENTOS: (início e drogas utilizadas)

Doença celíaca:

Tireóide:

Diabetes:

Outras doenças:

ANEXO B: TERMO DE CONSENTIMENTO PARA PACIENTES COM SD**HOSPITAL DAS CLÍNICAS**

DA

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

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

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **IMUNORREGULAÇÃO CENTRAL E PERIFÉRICA EM PACIENTES COM SÍNDROME DE DOWN E AUTOIMUNIDADE**

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Cristina Miuki Abe Jacob

CARGO/FUNÇÃO: Chefe da Unidade de Alergia e Imunologia

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 36304

UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto da Criança

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO () RISCO MÍNIMO **X** RISCO MÉDIO ()
RISCO BAIXO () RISCO MAIOR ()

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

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

Essas informações estão sendo fornecidas para a participação voluntária de seu (sua) filho (a) neste estudo cujo objetivo é avaliar a presença de doenças auto-imunes e as alterações da função imunológica em crianças portadoras de síndrome de Down. A doença de seu filho (a) (Síndrome de Down) pode estar associada com alterações do sistema de defesa que se apresentam com o passar dos anos, levando a infecções repetidas ou a doenças chamadas auto-imunes, como por exemplo, doenças da tireóide, diabetes, intolerância ao glúten, entre outros. Nos portadores da síndrome de Down essas doenças são mais freqüentes e parecem estar relacionadas a envelhecimento precoce do sistema de defesa. O diagnóstico precoce através de investigação ativa dessas doenças possibilita o tratamento precoce e adequado destas doenças. O timo é um dos órgãos do sistema imune relacionado ao desenvolvimento das funções acima descritas, sendo importante a avaliação de sua função, que será realizada neste estudo. Será feita coleta de sangue de cerca de 20 ml divididos em duas datas diferentes para pesquisar a presença de anticorpos contra alguns órgãos de seu filho (a) que podem estar presentes nas doenças auto-imunes, para estudar o funcionamento do sistema de defesa de seu filho e ainda para avaliar alguns defeitos genéticos que podem estar relacionados com essas doenças. Poderá haver a formação de estoque de amostras (soroteca) a depender de condições técnicas. Não haverá risco neste estudo exceto o risco mínimo relativo à punção para coleta dos exames. Não haverá procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para seu (sua) filho (a) além dos próprios resultados da pesquisa.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

Como responsável pelo seu (sua) filho (a), você terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas e liberdade de retirar seu

consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência. Os dados são sigilosos, sendo salvaguardados a confidencialidade, sigilo e privacidade. Seu (sua) filho (a) terá disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa, pois ele está matriculado no Ambulatório de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança. Como a pesquisa inclui apenas procedimentos diagnósticos in vitro e não avaliações terapêuticas, não estão previstos danos e indenizações.

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

Cristina Miuki Jacob: Av Enéas Carvalho de Aguiar, 647 – Telefone: 30698585 / 30698512

Luciana Maria de Andrade Ribeiro: Av Enéas Carvalho de Aguiar, 647 – Telefone: 30698585 / 30698512

Angela Bueno Ferraz Fomin: Av Enéas Carvalho de Aguiar, 647 – Telefone: 30698585 / 30698512

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

São Paulo, de de 2.....

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

ANEXO C: TERMO DE CONSENTIMENTO PARA PACIENTES CONTROLE HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: IMUNORREGULAÇÃO CENTRAL E PERIFÉRICA EM PACIENTES COM SÍNDROME DE DOWN E AUTOIMUNIDADE

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Cristina Miuki Abe Jacob

CARGO/FUNÇÃO: Chefe da Unidade de Alergia e Imunologia

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 36304

UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto da Criança

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO () RISCO MÍNIMO **X** RISCO MÉDIO ()

RISCO BAIXO () RISCO MAIOR ()

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

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

Essas informações estão sendo fornecidas para a participação voluntária de seu (sua) filho (a) neste estudo cujo objetivo é avaliar as alterações da função imunológica em crianças portadoras de síndrome de Down e comparar o funcionamento do sistema imunológico dessas crianças com crianças saudáveis, ou seja, crianças sem doenças auto imunes (doenças da tireóide, diabetes, intolerância ao glúten) e sem síndromes genéticas. O timo é um dos órgãos do sistema imune relacionado ao controle das doenças auto imunes, sendo importante a avaliação de seu funcionamento, que será realizada neste estudo. Será feita coleta de sangue de cerca de 20 ml para pesquisar a atividade do timo, para estudar o funcionamento do sistema de defesa de seu filho e ainda para avaliar alguns defeitos genéticos que podem estar relacionados com essas doenças. Poderá haver a formação de estoque de amostras (soroteca) a depender de condições técnicas. Não haverá risco neste estudo exceto o risco mínimo relativo à punção para coleta dos exames. Não haverá procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para seu (sua) filho (a) além dos próprios resultados da pesquisa.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

Como responsável pelo seu (sua) filho (a), você terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas e liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência. Os dados são sigilosos, sendo salvaguardados a confidencialidade, sigilo e privacidade. Seu (sua) filho (a) terá disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa, pois ele está matriculado no Ambulatório de Endocrinologia do Instituto da Criança. Como a pesquisa inclui apenas procedimentos diagnósticos in vitro e não avaliações terapêuticas, não estão previstos danos e indenizações.

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

Cristina Miuki Jacob: Av Enéas Carvalho de Aguiar, 647 – Telefone: 30698585 / 30698512

Luciana Maria de Andrade Ribeiro: Av Enéas Carvalho de Aguiar, 647 – Telefone: 30698585 / 30698512

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

São Paulo, de de 2.....

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

**ANEXO D: TERMO DE CONSENTIMENTO PARA PACIENTES COM
DOENÇA AUTOIMUNE
HOSPITAL DAS CLÍNICAS**

DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: IMUNORREGULAÇÃO CENTRAL E
PERIFÉRICA EM PACIENTES COM SÍNDROME DE DOWN E
AUTOIMUNIDADE

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Cristina Miuki Abe Jacob

CARGO/FUNÇÃO: Chefe da Unidade de Alergia e Imunologia

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 36304

UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto da Criança

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO () RISCO MÍNIMO **X** RISCO MÉDIO ()

RISCO BAIXO () RISCO MAIOR ()

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

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

Essas informações estão sendo fornecidas para a participação voluntária de seu (sua) filho (a) neste estudo cujo objetivo é avaliar as alterações da função imunológica em crianças portadoras de síndrome de Down e doenças auto imunes (doenças da tireóide, diabetes, intolerância ao glúten) e comparar com as alterações imunológicas de pacientes com doença auto imunes sem Síndrome de Down. O timo é um dos órgãos do sistema imune relacionado ao controle das doenças autoimunes, sendo importante a avaliação de seu funcionamento, que será realizada neste estudo. Será feita coleta de sangue de cerca de 20 ml para pesquisar a presença de anticorpos contra alguns órgãos de seu filho (a) que podem estar presentes nas doenças auto-imunes, para estudar o funcionamento do sistema de defesa de seu filho e ainda para avaliar alguns defeitos genéticos que podem estar relacionados com essas doenças. Poderá haver a formação de estoque de amostras (soroteca) a depender de condições técnicas. Não haverá risco neste estudo exceto o risco mínimo relativo à punção para coleta dos exames. Não haverá procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para seu (sua) filho (a) além dos próprios resultados da pesquisa.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

Como responsável pelo seu (sua) filho (a), você terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas e liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência. Os dados são sigilosos, sendo salvaguardados a confidencialidade, sigilo e privacidade. Seu (sua) filho (a) terá disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa, pois ele está matriculado no Ambulatório de

Endocrinologia do Instituto da Criança. Como a pesquisa inclui apenas procedimentos diagnósticos in vitro e não avaliações terapêuticas, não estão previstos danos e indenizações.

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

Cristina Miuki Jacob: Av Enéas Carvalho de Aguiar, 647 – Telefone: 30698585 / 30698512

Luciana Maria de Andrade Ribeiro: Av Enéas Carvalho de Aguiar, 647 – Telefone: 30698585 / 30698512

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

São Paulo, de de 2.....

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

ANEXO E: CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO QUANTO AOS VALORES OBTIDOS DAS ANÁLISES

Caracterização laboratorial dos pacientes com SD

GRUPO	IDADECOLETA	LEUC	LINF	CD4	NAIVE	MEMORIA	CD8	TREG	CD28NULL	CD19	CD56	TREC
SDAI	19,3	9300	2167	901	185	34	635	8	28	32	327	513243301
SDAI	17,33	5800	1970	510	200	62	150	38	11	190	280	138296914
SDAI	15,05	6900	3310	510	169	73	470	25	19	490	50	506067210
SDAI	16,57	3600	600	300	54	62	130	13	2	30	60	74264752
SDAI	13,13	4200	890	390	70	74	700	3	130	70	10	290959
SDAI	14,84	6500	2000	1060	262	114	200	36	74	130	20	317389990
SDAI	14,19	8400	1340	510	163	92	170	45	86	110	90	531593285
SDAI	14,71	4200	1090	380	137	34	400	26	11	30	70	736487602
SDAI	11,67	4500	2230	790	317	108	350	52	154	120	190	194382730
SDAI	14,2	9600	1800	540	169	55	260	5	55	130	130	101128580
SDAI	17,26	11400	1600	610	200	55	300	52	18	90	60	125122455
SD	17,05	13000	2560	340	104	72	1090	14	34	30	220	51590972
SD	17,06	6200	2180	700	166	182	320	4	40	320	400	693003476
SD	14,1	6900	2900	1190	499	178	930	20	56	80	200	902762080
SD	16,82	11400	2980	650	100	180	330	34	188	120	680	90715749
SD	13,06	12500	4430	1080	323	196	800	42	63	190	890	1268627948
SD	14,51	12100	1890	640	172	85	210	1	400	80	20	1230338836
SD	14,41	8900	2870	1160	487	99	1000	42	68	170	460	806161915
SD	13,84	5200	1740	790	314	172	270	69	257	50	90	3556810576
SD	11,69	7800	1290	480	83	15	200	11	28	80	60	709561749
SD	13,53	11000	710	170	48	36	140	9	3	10	50	145794972
SD	14,51	12100	1890	640	172	85	210	1	400	80	20	1230338836

Caracterização laboratorial dos pacientes dos grupos controle

GRUPO	IDADECOLETA	LEUC	LINF	CD4	NAIVE	MEMORIA	CD8	TREG	CD28NU	CD19	CD56	TREC
AI	17,54	7900	1210	530	170	91	100	39	7	100	10	41122974
AI	17,07	8600	550	220	152	19	140	1	11	30	70	793369122
AI	15,09	7200	3580	1540	1105	185	440	55	15	40	40	5725755193
AI	15,83	5600	3248	643	36	266	542	39	235	591	179	35257474
AI	13,32	4600	1330	300	96	75	190	31	208	120	110	2845663730
AI	16,1	10600	3240	1580	652	42	440	137	46	540	130	2507586904
AI	12,97	7200	1050	280	32	88	140	10	20	110	10	1063914732
AI	12,86	7000	1680	790	474	76	250	42	23	270	90	2724747123
AI	12,32	10200	2142	600			129	6	0	20	20	702748258
AI	13,78	6000	1030	250	20	96	230	5	4	160	100	1710857502
AI	15,24	9100	1170	140	27	36	120	13	1	80	110	1174869241
NL	17,5	10660	3030	1330	521	213	430	21	3	200	30	913558528
NL	17,08	9300	3830	1390	802	110	780	22	19	950	40	528729582
NL	16,87	6230	1610	430	170	67	160	17	2	210	20	31600584
NL	15,81	6300	1130	439			125	14	0	130	200	1747512326
NL	12,65	7600	1620	700	414	42	170	7	9	340	110	222562898
NL	15,81	6100	2280	870	440	77	390	3	50	470	80	2507586902
NL	13,52	7800	2660	1130	447	156	380	10	38	320	120	1126800587
NL	14,1	8900	1600	689	200	158	176	40	14	304	106	683965773
NL	11,61	6500	2431	972	617	112	559	64	8	301	188	2407576902
NL	13,52	7800	2660	1130	447	156	380	10	38	320	120	1126800587
NL	16,87	11000	2840	1330	481	299	340	6	85	360	30	91149117

Tabela 1: Caracterização de 44 pacientes avaliados na Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança do HCFMUSP – 2011 quanto a idade e sexo.

Grupo	Sexo	Idade (Mediana)	Idade (Variação)
SDAI	7F:4M	14a11m	11a8m-19a7m
SDNAI	5F:6M	14a5m	11a8m-17a
AI	6F:5M	15a1m	12a4m-17a7m
CO	7F:4M	15a9m	11a7m-17a6m

Tabela 2 - Distribuição dos valores de leucócitos, linfócitos, subpopulações de linfócitos e células NK nos grupos de pacientes com Síndrome de Down (SD) e sem a síndrome (NSD) avaliados na Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança do HCFMUSP – 2011

Células	SD	NSD	P
Mediana	(n=22)	(n=22)	
célsx10⁹/L			
(Min-Max)			
Leucócitos	8,10 (3,60-13,00)	7,70 (4,60-11,00)	0,707
Linfócitos	1,93 (0,60-4,43)	1,91 (0,55-3,83)	0,879
Linfócitos T CD4+	0,62 (0,17-1,19)	0,70 (0,14-1,58)	0,425
Linfócitos T CD8+	0,31 (0,13-1,09)	0,24 (0,10-0,78)	0,170
Linfócitos CD19+	0,08 (0,01-0,49)	0,24 (0,02-0,95)	0,006*
Células NK	0,09 (0,01-0,89)	0,09 (0,01-0,20)	0,217

* p<0,05

Tabela 3 - Distribuição dos valores das subpopulações de linfócitos T CD4+ nos grupos de pacientes com Síndrome de Down (SD) e sem a síndrome (NSD) avaliados na Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança do HCFMUSP – 2011

Células	SD	NSD	P
Mediana célsx10⁹/L	(n=22)	(n=22)	
(Min-Max)			
Linfócitos T CD4+ naive	0,17 ¹ (0,05-0,50)	0,430 (0,02-1,10)	0,144
Linfócitos T CD4+ memória	0,08 (0,01-0,20)	0,09 (0,02-0,30)	0,273
Linfócitos CD4+CD28null	0,05 (0,02-0,40)	0,01 (0,000-0,23)	0,008
Linfócitos T CD4+CD25+	0,05 (0,02-0,40)	0,06 (0,02-0,19)	0,121
Linfócitos Treg	0,02 (0,001- 0,07)	0,01 (0,001-0,14)	0,888

* p<0,05

Tabela 4 - Distribuição das medianas de concentrações de TREC/mL em pacientes com Síndrome de Down (SD) e sem a síndrome (NSD) avaliados na Unidade de Alergia e Imunologia do HCFMUSP – 2011

	SD (n=22)	NSD (n=22)	P
Log TREC/mL	8,7050 (5,4600-9,550)	9,0400 (7,500- 9,760)	0, 04*

Tabela 5 - Distribuição dos valores de leucócitos, linfócitos, subpopulações e células NK nos grupos de pacientes com Autoimunidade (CAI) e sem Autoimunidade (NAI) avaliados na Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança do HCFMUSP – 2011

Células	CAI	NAI	P
Mediana	(n=22)	(n=22)	
célsx10⁹/L			
(Min-Max)			
Leucócitos	7,10 (3,60-11,40)	8,35 (5,20-11,00)	0,041*
Linfócitos	1,64 (0,55-3,58)	2,35 (0,71-4,43)	0,045*
Linfócitos T CD4+	0,52 (0,14-1,58)	0,74 (0,17-1,39)	0,023*
Linfócitos T CD8+	0,24 (0,10-0,40)	0,33 (0,12-1,09)	0,139
Linfócitos CD19+	0,11 (0,02-0,59)	0,19 (0,01-0,95)	0,105
Células NK	0,08 (0,01-0,33)	0,11 (0,02-0,89)	0,231

*p<0,05

Tabela 6 - Distribuição dos valores de subpopulações de linfócitos T CD4+ nos grupos de pacientes com Autoimunidade (CAI) e sem Autoimunidade (NAI) avaliados na Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança do HCFMUSP – 2011

Células	CAI	NAI	p
Mediana	(n=22)	(n=22)	
célsx10⁹/L			
(Min-Max)			
Linfócitos T CD4+ naive	0,17 (0,02-1,16)	0,32 (0,05-0,80)	0,025*
Linfócitos T CD4+ memória	0,07 (0,02-0,26)	0,11 (0,01-0,30)	0,021*
Linfócitos CD4+CD28null	0,02 (0,00-0,23)	0,04 (0,00-0,40)	0,467
Linfócitos T CD4+CD25+	0,05 (0,01-0,16)	0,06 (0,01-0,14)	0,991
Linfócitos Treg	0,03 (0,001-0,14)	0,01 (0,001-0,17)	0,291

*p<0,05

Tabela 7 - Distribuição das concentrações de TREC/mL em pacientes com Autoimunidade (CAI) e sem Autoimunidade (NAI) avaliados na Unidade de Alergia e Imunologia do HCFMUSP – 2011

	CAI (n=22)	NAI (n=22)	P
Log	8,718 ¹	8,906	0,485
TREC/mL	(5,464-9,758)	(7,713-9,551)	

Tabela 8 - Distribuição dos valores de leucócitos, linfócitos, subpopulações e células NK nos grupos de pacientes com Síndrome de Down e Autoimunidade (SDAI), Síndrome de Down sem autoimunidade (SDNAI), pacientes com autoimunidade sem Síndrome de Down (AI) e controles (CO) avaliados na Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança do HCFMUSP – 2011

	SDAI (n=11)	SDNAI (n=11)	AI (n=11)	CO (n=11)
Leucócitos	6,50 (3,60-11,40)	11,00 (5,20-13,00)	7,20 (4,60-10,60)	7,80 (6,10-11,00)
Linfócitos	1,80 (0,60-3,31)	2,18 (0,71-4,43)	1,33 (0,55-3,58)	2,43 (1,13-3,83)
Linfócitos T CD4+	0,51 (0,30-1,06)	0,650 (0,17-1,19)	0,530 (0,14-1,58)	0,97 (0,43-1,39)
Linfócitos T CD8+	0,30 (0,13-0,70)	0,32 (0,14-1,09)	0,19 (0,10-0,54)	0,38 (0,12-0,78)
Linfócitos CD19+	0,11 (0,03-0,49)	0,08 (0,01-0,32)	0,11 (0,02-0,59)	0,32 (0,13-0,95)
Células NK	0,07 (0,01-0,33)	0,20 (0,02-0,89)	0,09 (0,01-0,18)	0,10 (0,02-0,20)

Tabela 9 - Distribuição dos valores de leucócitos, linfócitos, subpopulações e células NK nos grupos de pacientes com Síndrome de Down e Autoimunidade (SDAI), Síndrome de Down sem autoimunidade (SDNAI), pacientes com autoimunidade sem Síndrome de Down (AI) e controles (CO) avaliados na Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança do HCFMUSP – 2011

	SDAI (n=11)	SDNAI (n=11)	AI (n=11)	CO (n=11)
Linfócitos T CD4+ naive	0,17 (0,07-0,26)	0,17 (0,05-0,49)	0,15 (0,02- 1,11)	0,45 (0,17-0,80)
Linfócitos T CD4+ memória	0,06 (0,03-0,11)	0,10 (0,04-0,19)	0,08 (0,02- 0,18)	0,16 (0,04-0,30)
Linfócitos CD4+CD28null	0,03 (0,002- 0,15)	0,06 (0,003-0,04)	0,01 (0-0,23)	0,01 (0-0,08)
Linfócitos T CD4+CD25+	0,05 (0,01-0,09)	0,03 (0,01-0,10)	0,04 (0,02- 0,19)	0,07 (0,02-0,14)
Linfócitos Treg	0,03 (0,003- 0,05)	0,01 (0,001-0,07)	0,03 (0,001- 0,14)	0,01 (0,003-0,06)

Tabela 10 - Distribuição das medianas de concentrações de TREC/mL nos grupos de pacientes com Síndrome de Down e Autoimunidade (SDAI), Síndrome de Down sem autoimunidade (SDNAI), pacientes com autoimunidade sem Síndrome de Down (AI) e controles (CO) avaliados na Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança - HCFMUSP – 2011

	SDAI (n=11)	SDNAI (n=11)	AI (n=11)	CO (n=11)
Log TREC/mL	8,290 (5,460- 8,870)	7,710 (8,910- 9,500)	7,550 (7,070- 9,760)	8,960 (7,500- 9,400)

Tabela 11 - Níveis de significância nas comparações entre as medianas de linfócitos T CD4+, linfócitos T CD4+ naive, linfócitos T CD4+ memória, linfócitos B CD19+ e concentrações de sjTREC/mL para os grupos de pacientes com Síndrome de Down e Autoimunidade (SDAI), Síndrome de Down sem autoimunidade (SDNAI), pacientes com autoimunidade sem Síndrome de Down (AI) e controles (CO) avaliados na Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança do HCFMUSP – 2011

	SDAI x CO	SDNAI x CO	AI x CO
Linfócitos T CD4+	0,019 [†]	0,133	0,065
Linfócitos T CD4+ naive	<0,001*	0,013*	0,063
Linfócitos T CD4+ memória	0,010*	0,809	0,143
Linfócitos B CD19+	0,001*	<0,001*	0,016
SjTREC	0,030	0,9738	0,2784

[†] Nível de significância (Mann Whitney)

Tabela 12 - Níveis de significância nas comparações entre as medianas de linfócitos T CD4+, linfócitos T CD4+ naive, linfócitos T CD4+ memória, linfócitos B CD19+ e entre as médias de sjTREC/mL para os grupos de pacientes com Síndrome de Down e Autoimunidade (SDAI) x Síndrome de Down sem autoimunidade (SDNAI), avaliados na Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança do HCFMUSP – 2011

	SDAI x SDNAI (n=11)
Linfócitos T CD4+	0,270
Linfócitos TCD4+ naive	0,797
Linfócitos TCD4+ memória	0,076
Linfócitos BCD19+	0,748
SjTREC	0,030*

[†] Nível de significância (Mann Whitney)

Figura 1 – Grupos de avaliação definidos na casuística.

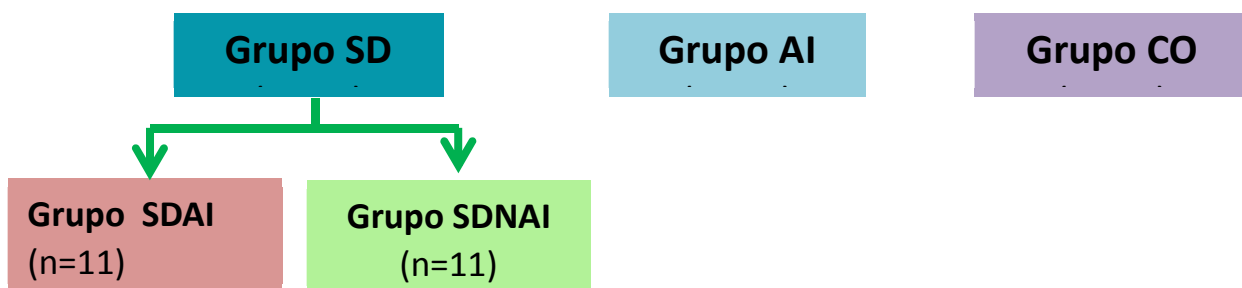


Figura 2 – Distribuição de doenças autoimunes em pacientes com (SDAI) e sem SD (AI).

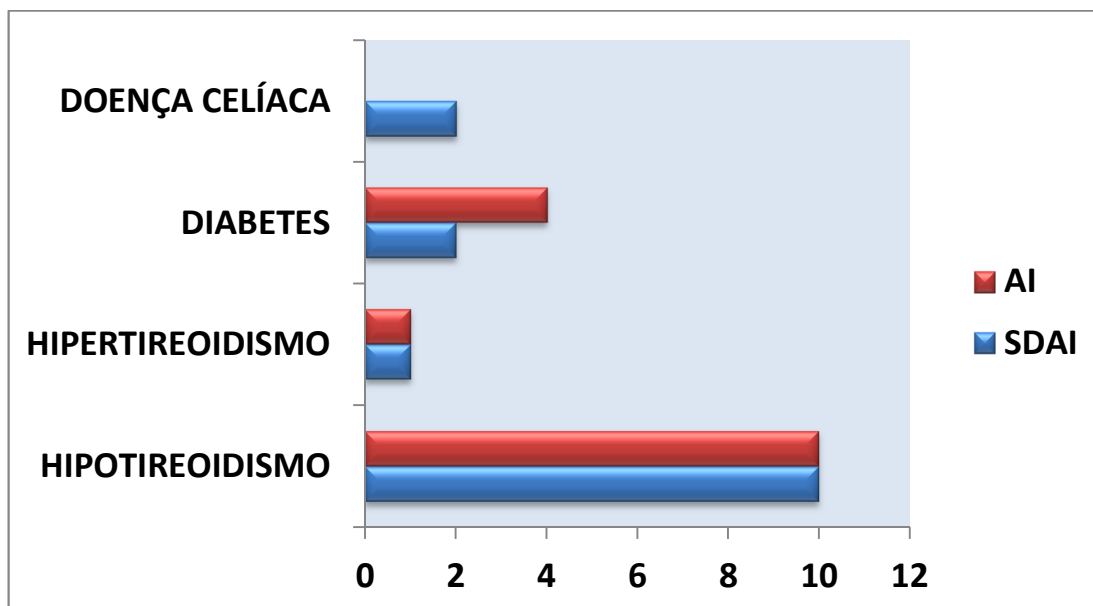


Figura 3a - Distribuição dos valores absolutos de linfócitos T CD4+CD45RA+CD62L+ para os grupos com SD (SD) e sem a síndrome (NSD)

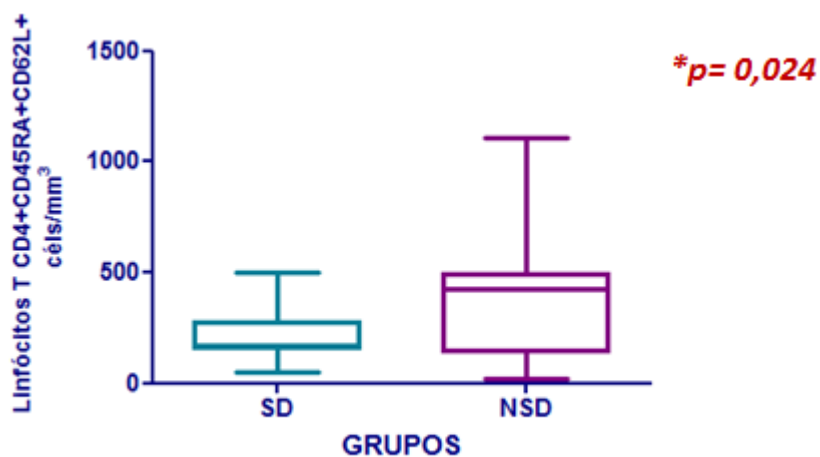


Figura 3b - Distribuição dos valores percentuais de linfócitos T CD4+CD45RA+CD62L+ para os grupos com SD (SD) e sem a síndrome (NSD)

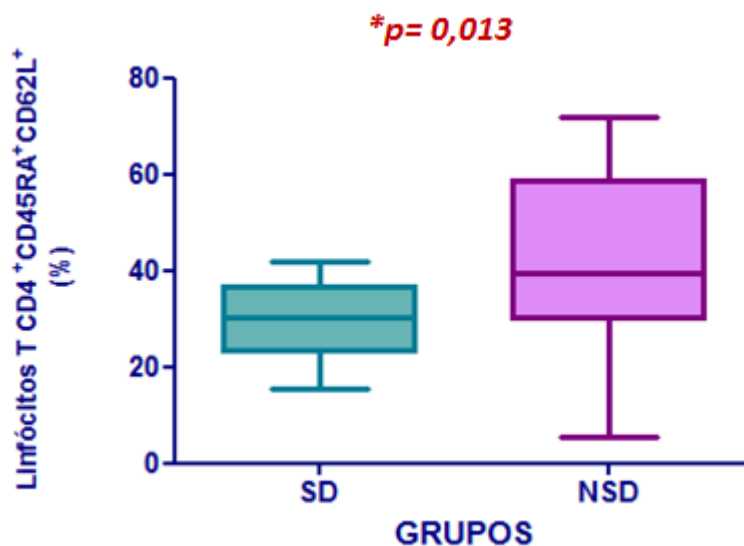


Figura 4a - Distribuição dos valores absolutos de linfócitos T CD4+CD25+CD127-Foxp3+ para os grupos com SD (SD) e sem a síndrome (NSD)

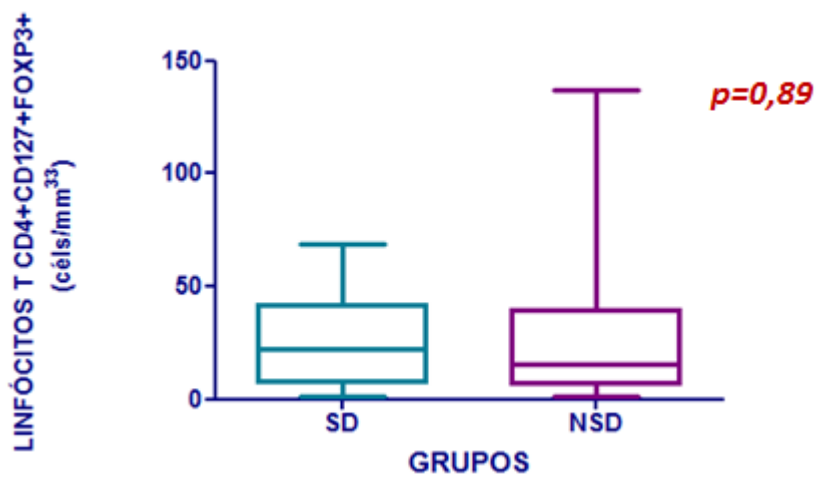


Figura 4b - Distribuição dos valores percentuais de linfócitos T CD4+CD25+CD127-Foxp3+ para os grupos com SD (SD) e sem a síndrome (NSD)

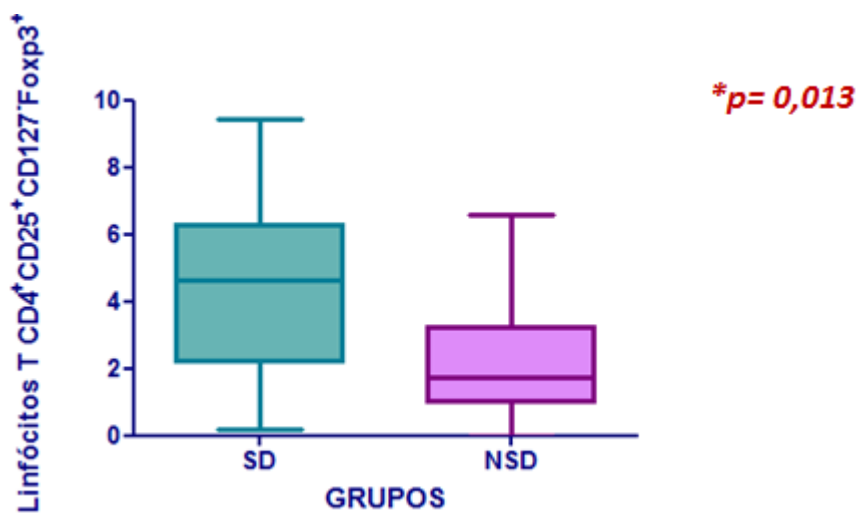


Figura 5a - Distribuição dos valores absolutos de linfócitos T CD4⁺CD28^{null} para os grupos com SD (SD) e sem a síndrome (NSD)

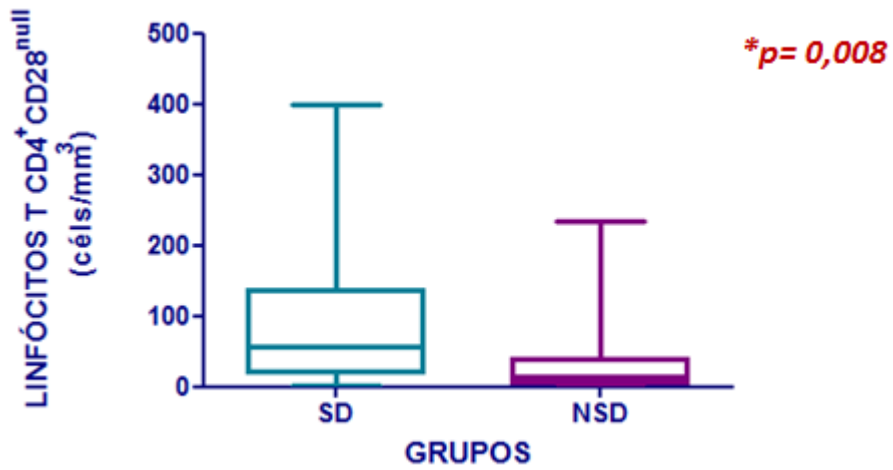


Figura 5b - Distribuição dos valores percentuais de linfócitos T CD4⁺CD28^{null} para os grupos com SD (SD) e sem a síndrome (NSD)

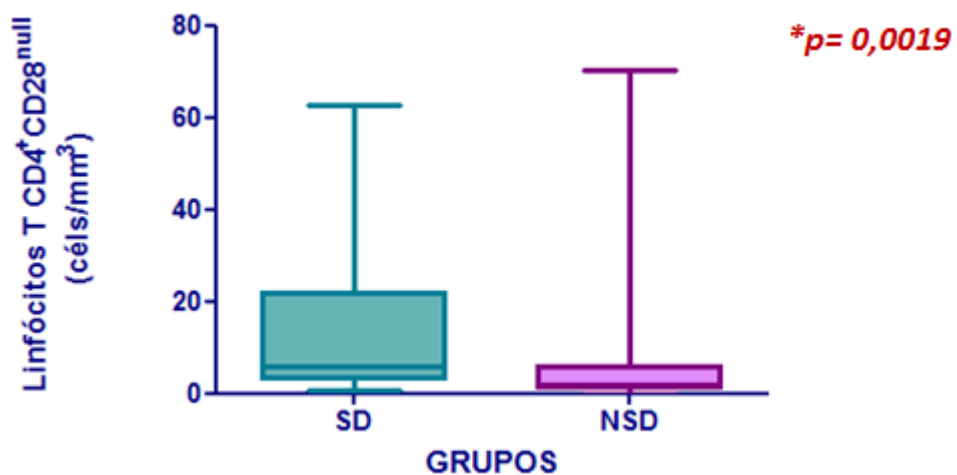


Figura 6a - Distribuição dos valores absolutos de linfócitos B CD19⁺ para os grupos com SD (SD) e sem a síndrome (NSD)

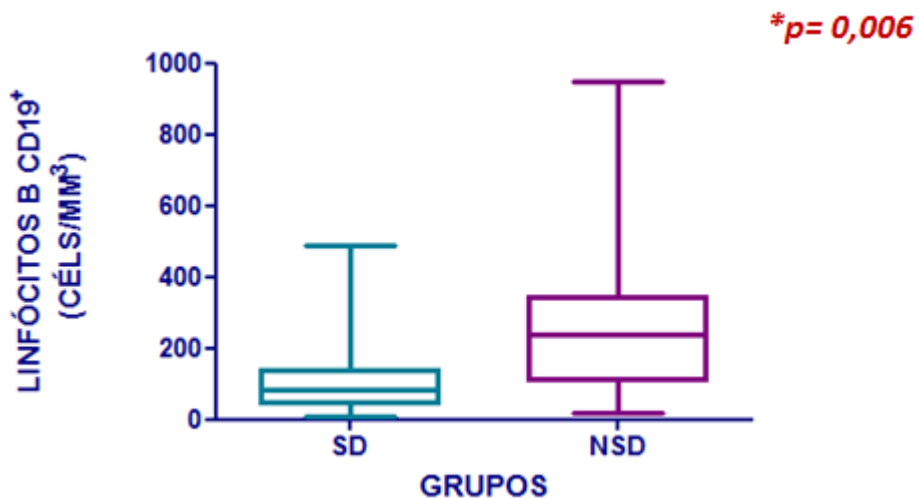


Figura 6b - Distribuição dos valores percentuais de linfócitos B CD19⁺ para os grupos com SD (SD) e sem a síndrome (NSD)

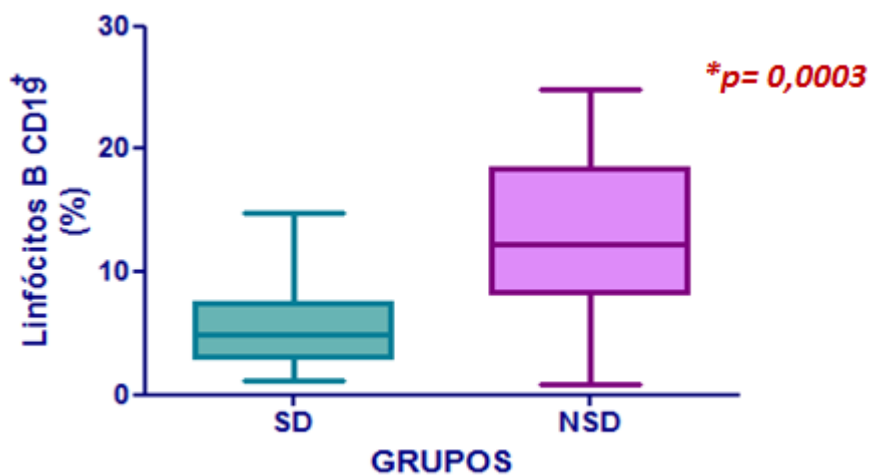


Figura 7 - Distribuição dos valores de \log_{10} TREC para os grupos com SD (SD) e sem a síndrome (NSD)

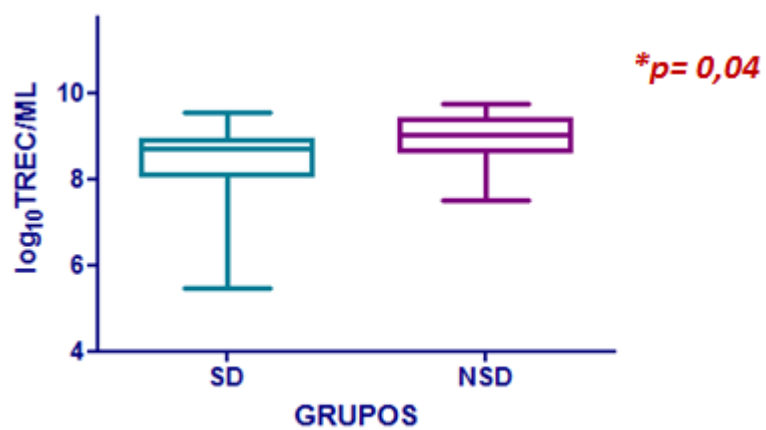


Figura 8 - Distribuição dos valores absolutos de linfócitos T CD4⁺CD45RA⁺CD62L⁺ para os grupos com SD e autoimunidade (SDAI) com SD e sem autoimunidade (SDNAI), pacientes com autoimunidade isolada (AI) e controles saudáveis (CO).

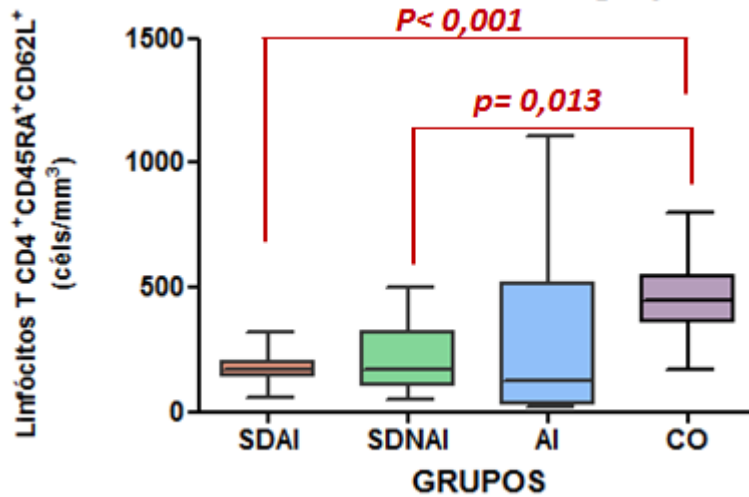


Figura 9 - Distribuição dos valores percentuais de linfócitos T CD4⁺CD25⁺CD127⁻Foxp3⁺ para os grupos com SD e autoimunidade (SDAI) com SD e sem autoimunidade (SDNAI), pacientes com autoimunidade isolada (AI) e controles saudáveis (CO).

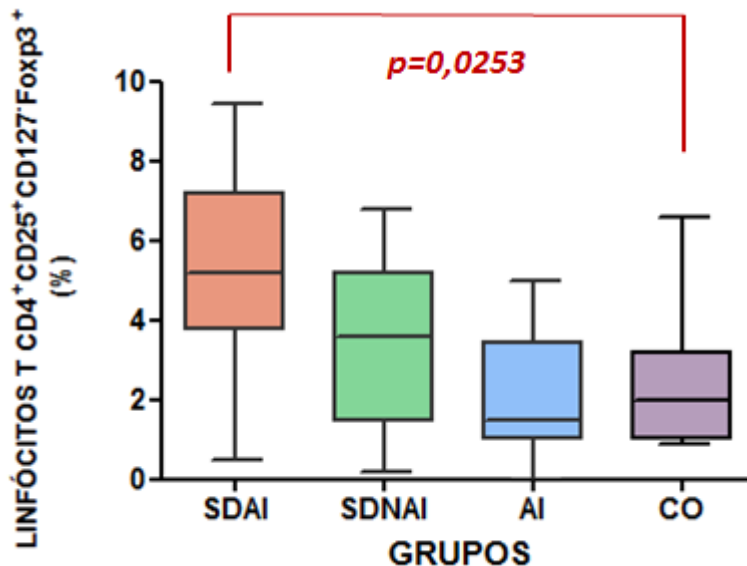


Figura 10 - Distribuição dos valores percentuais de linfócitos T CD4⁺CD28^{null} para os grupos com SD e autoimunidade (SDAI) com SD e sem autoimunidade (SDNAI), pacientes com autoimunidade isolada (AI) e controles saudáveis (CO).

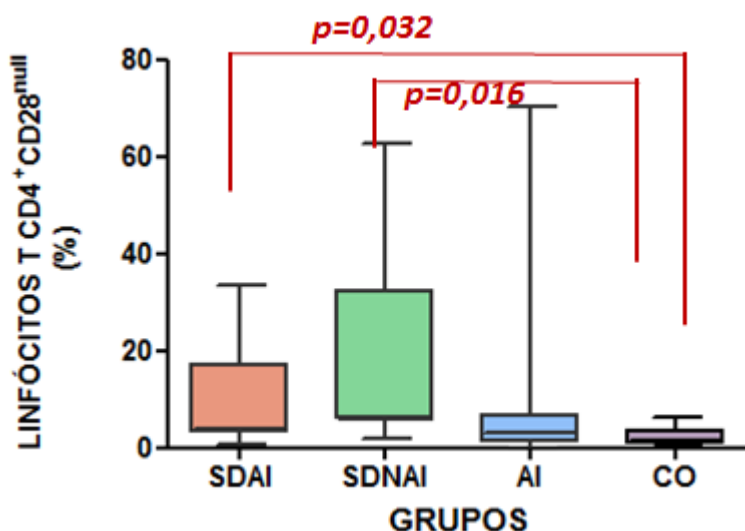


Figura 11 - Distribuição dos valores percentuais de linfócitos B CD19⁺ para os grupos com SD e autoimunidade (SDAI) com SD e sem autoimunidade (SDNAI), pacientes com autoimunidade isolada (AI) e controles saudáveis (CO).

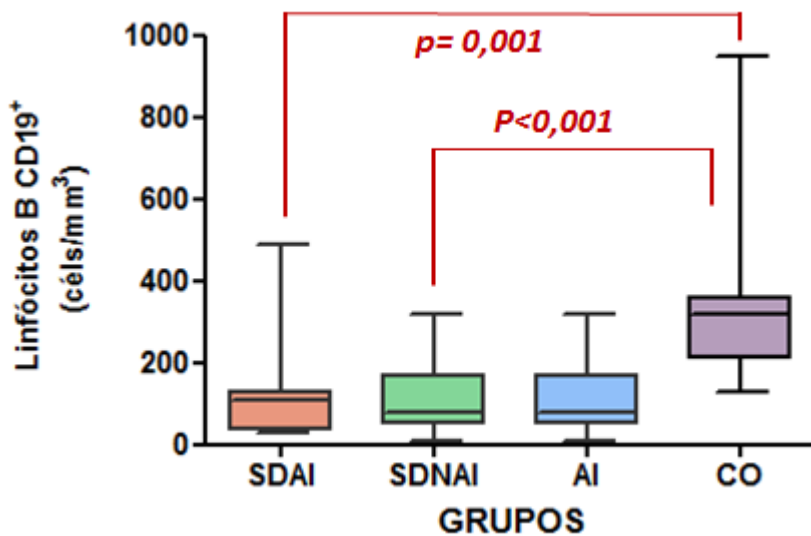
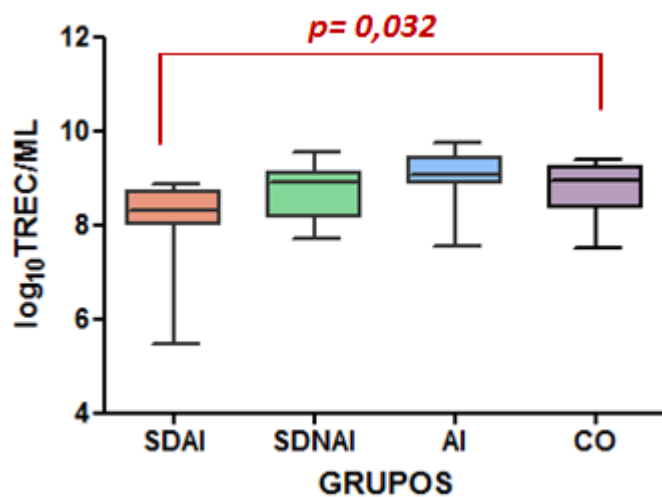


Figura 12 - Distribuição dos valores de \log_{10} TREC para os grupos com SD e autoimunidade (SDAI), com SD e sem autoimunidade (SDNAI), pacientes com autoimunidade isolada (AI) e controles saudáveis (CO).



8 - REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Down JLH. Observations on an ethnic classification of idiots. *Ment Retard.* 1995; 33:54-56.
2. Lejeune, J; Gautier, M; Turpin, R. Ethude des chromossomes somatique des neufs enfants mongoliens. *Acad. Sci. Paris.* 1959; 248:171-172.
3. Jones, KL. Recognizable patterns of malformation. In: Jones, KL. Smith's recognizable patterns of human malformation. 5th ed. Philadelphia, Saunders, 1997, p8-87.
4. Hall, B. Mongolism in newborn infants. *Clin Pediatr. Phila.* 1966; 5:4.
5. Hassold T, Jacobs P. Trisomy in man. *Ann Rev Genet.* 1984; 18:69-97.
6. Penrose, LS. The relative effects of paternal and maternal age in mongolism. *J Genet.* 1993; 27:2
7. Takaesu, N; Jacobs, PA, Cockwell, A e cols. Nondisjunction of chromosome 21. *Am J Med Gen.* 1990; 7: 175-81, Suppl.
8. Epstein, CJ. The consequences of chromosome imbalance. *Am J Med Genet.* 1990 Suppl; 7: 31-37.
9. Lima FA, Moreira-Filho CA, Ramos PL, Brentani H, Lima L de A, Arrais M, Bento de Sousa LC, Bento de Sousa L, Duarte MI, Coutinho A, Carneiro-Sampaio M. Decreased AIRE expression and global thymic hypofunction in Down syndrome. *J Immunol.* 2011, 187(6): 3422-30.
10. Koremberg, JR; Kwashima, H; Pulst, SM e cols. Down syndrome: toward a molecular definition of the phenotype. *Am J Med Gen.* 1990 Suppl 7:91-97.
11. Hattori, M; Fujiyama,A; Taylor, TD; Watanabe, H; Yada, T e cols. The DNA sequance of human chromosome 21. The Chomosome 21 mapping and sequencing consortium. *Nature.* 2000; 405:311-319.
12. Glasson EJ, Sullivan, SG, Hussain R e cols. The changing survival profile of people with Down's syndrome: implications for genetic counseling. *Clin Genet.* 2002; 62: 390-3.
13. Pueschel, SM. Clinical aspects of Down's syndrome from infancy to adulthood. *Am J Med Genet.* Suppl. 1990; 7: 52-6.
14. Cossarizza A, Monti D, Montagnani G, Ortolani C, Masi M, Zannotti M, Franceschi C. Precocious aging of the immune system in Down's syndrome: alterations of B-lymphocytes, T-lymphocyte subsets and of cells with NK markers. *Am J Med Genet.* 1990, 7: 213-8 Suppl
15. Raizen NJ, Patterson D. Down's syndrome. *Lancet.* 2003; 361: 1281-9.
16. Zigman W, Lott I. Alzheimer's disease in Down syndrome: Neurobiology and risk. *Ment Retard Dev Disab Res Rev.* 2007; 13: 237-46.

17. Cork LC. Neuropathology of Down Syndrome and Alzheimer disease. *Am J Med Genet.* 1990; 7: 282-6.
18. Baxter RG, Martin FIR, Myles K, Larkis RG, Heymer P, Rejan L. Down syndrome and thyroid function in adults. *Lancet* 1975; 2: 794-6.
19. Sare Z, Ruvalcaba RH, Kelly VC. Prevalence of thyroid disorder in Down syndrome. *Clin Genet.* 1978; 14(3): 154-8.
20. Fort P, Lifshitz F, Bellisario R et al Abnormalities of thyroid function in infants with Down Syndrome. *J Pediatr.* 1981; 545-9.
21. Kennedy RL, Jones TH, Cuckle HS. Down's syndrome and the thyroid. *Clin Endocrinol.* 1992; 37: 471-6.
22. Posner EB, Colver AF. Thyroid dysfunction in Down's syndrome: relation to age and thyroid autoimmunity. *Arch Dis Child.* 1999; 81(3): 283.
23. Van Trotsenburg ASP, Vulsma T, van Rozenburg-Marres SLR e cols. The effect of thyroxine treatment started in the neonatal period on development and growth of two-year old Down syndrome children: a randomized clinical trial. *Clin Endocrinol Metab.* 2003; 90: 2204-11.
24. Tuysuz B, Beker DB. Thyroid dysfunction in children with Down's syndrome. *Acta Paediatr.* 2001; 90(12): 1389-93.
25. Goldacre MJ, Wotton CJ, Seagroalt V e col. Cancers and immune related diseases associated with Down's syndrome: a record linkage study. *Arch Dis Child.* 2004; 89: 1014-7.
26. Zori RT, Schatz DA, Ostret H, Williams CA, Spillar R, Riley WJ. Relationship of autoimmunity to thyroid dysfunction in children and adults with Down syndrome. *Am J Med Genet. Suppl.* 7:238-41.
27. Rubello D, Pozzan GB, Casara D. No subclinical hypothyroidism in Down's syndrome: prospective study results and therapeutics considerations. *J Endocrinol Invest.* 1995; 18(1): 35-40.
28. Castro M, Crinò A, Papadatou B. Down's syndrome and celiac disease: the prevalence of high IgA-antigliadin antibodies and HLA-DR and DQ antigens in trisomy 21. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1993; 16: 265-8.
29. Book L, Hart A, Black J. Prevalence and clinical characteristics of celiac disease in Down's syndrome in a US study. *Am J Med. Genet.* 2001; 98: 70-4.
30. Bonamico M, Mariani P, Danesi HM e cols. Prevalence and clinical picture of celiac disease in Italian Down syndrome patients: a multicenter study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2001; 33(2): 139-43.
31. Cohen WI. Current Dilemmas in Down Syndrome Clinical Care: Celiac Disease, Thyroid Disorders, and Atlanto-Axial Instability. *Am J Med Genet.* 2006; 142C:141-8.
32. Ruch W, Schürmann K, Gordon P e cols. Coexistent celiac disease, Grave's disease and diabetes mellitus type 1 in a patient with Down syndrome. *Eur J Pediatr.* 1985, 144: 89-90.
33. Van Goor JC, Massa GG, Hirasing R. Increased incidence and prevalence of diabetes mellitus in Down's syndrome. *Arch Dis Child.* 1997; 77(2): 186.

34. Griffin ME, Fulcher T, Nikookam K e cols. Down's syndrome, IDDM, and hypothyroidism. *Diabetes care* 1997; 20: 1202-3.
35. Kinik ST, Özçay F e Varan B. Type 1 diabetes mellitus, Hashimoto's thyroiditis and celiac disease in an adolescent with Down syndrome. *Pediatr Int.* 2006; 48: 433-5.
36. Burgio GR, Lanzavecchia A, Macario E, Vitiello A, Plebani A, Ugazio AG . Immunodeficiency in Down's syndrome: T lymphocyte subset imbalance in trisomic children. *Clin Exp Immunol.* 1978; 33: 298-301.
37. Burgio GR, Ugazio AG. Immunity in Down's Syndrome. *Eur J Pediatr.* 1978; 127: 293-4.
38. Seger R, Buchinger G, Ströder J. On the Influence of age on immunity in Down's syndrome. *Europ J Pediatr.* 1977; 124: 77-87.
39. Nespoli L, Burgio GR, Ugazio AG, Macario R. Immunological features of Down's syndrome: a review. *J Intellect Disabil Res.* 1993; 37:543-51.
40. Murphy M, Insoft RM, Pike-Nobile L, Epstein LB. A hypothesis to explain the immune defects in Down syndrome. In: Murphy M. *Etiology and pathogenesis of Down syndrome.* San Francisco, Willey-Liss Inc 1995, p 147-67.
41. Cuadrado E, Barrena MJ. Immune disfunction in Down syndrome: primary immunodeficiency or early senescence of the immune system. *Clin Immunol Immunopathol.* 1996; 78: 209-14.
42. Lockitch G, Singh VK, Puterman ML, Godolphin WJ, Sheps S, Tingle AJ, Wong F, Quigley G. Age-related changes in humoral and cell-mediated immunity in Down Syndrome Children living at home. *Ped Res.* 1987; 22(5): 536-40.
43. Franceschi C, Monti D, Cossarizza A, Fagnoni F, Passeri G, Sansoni P. Aging, longevity and câncer: studies in Down's syndrome and centenarians. *Annals NY Acad Sci.* xxx; xxx: 428-40.
44. Hingh YCM, van der Vossen, PW, Gemen, EFA e cols. Intrinsic abnormalities of lymphocyte counts in children with Down syndrome. *J Pediatr.* 2005; 147: 744-7.
45. Kusters MAA, Verstegen RHJ, Gemen EFA, de Vries E. Intrinsic defect of the immune system in children with Down syndrome: a review. *Clin Exp Immunol.* 2009; 156: 189-93.
46. Kusters MAA, Gemen EFA, Verstegen RHJ, Wevwe PC, de Vries E. Both normal memory counts and decreased naïve cells favor intrinsic defect over early senescence of Down syndrome T lymphocytes. *Pediatr Res.* 2010; 67:557-62.
47. Cetiner S, Demirhan O, Inal TC, Tastemir D, Sertdemir Y. Analysis of peripheral blood T-cell subsets, natural killer cells and serum levels of cytokines in children with Down Syndrome. *Int J Immunogenet.* 2010, 37: 233-7.
48. 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. *J Immunol.* [Internet] 2011 [cited 2011 Feb 23, doi :104049/jimmunol 1001700].

49. Verstegen RHJ, Kusters MAA, Gemen EFA, de Vries E. Down syndrome B lymphocytes subpopulations, intrinsic defect or decreased T-lymphocyte help. *Pediatr Res.* 2010; 67: 563-569.
50. Scollay R. T lymphocytes. In: Roit PJ Delves. *Encyclopedia of Immunology* London. Ed Academic Press. p 1473-5.
51. Abbas , Abul K. Cellular and molecular immunology. Philadelphia 6ed. 2010. Elsevier.
52. Murray JM, Kaufmann GR, Hodgkin PD, LEwin SR, Kelleher AD, Davenport MP, Zaunders JJ. Naïve T cells are maintained by thymic output in early ages but by proliferation without phenotypic change after age twenty. *Immunol Cell Biomol.* 2003; 81:487-95.
53. Vallejo AN, Brabdes JC, Weyand CM, Goronzy JJ. Modulation of CD28 expression: distinct regulatory pathways during activation and replicative senescence. *J Immunol.* 1999, 162:6572-9.
54. Bour-Jordan H, Bluestone JA. Regulating the regulators: coestimulatory signals control the homeostasis and function of regulatory cells. *Immunol Rev.* 2009, 229:41-66.
55. Thewissen M, Somers V, Hellings N, Fraussen J, Damoiseaux J, Stinissen P. CD4+CD28null T cells in autoimmune diseases: pathogenic features and decreased susceptibility to immunoregulation. *J Immunol.* 2007; 179: 6514-23.
56. Thewissen M, Somers V, Venken K, Linsen L, Van Paassen P, Geusens P, Damoiseaux J, Stinissen P. Analyses of immunosenescent markers in patients with autoimmune disease. *Clin Immunol.* 2007;123: 209-18.
57. Alvarado-Sanchez B, Hernandez castro B, Portales-Perez D e cols. Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun.* 2006; 27: 110-8.
58. Danese S, Rutella, S. The Janus face of CD4+CD25+ regulatory T cells in cancer and autoimmunity. *Curr Med Chem.* 2007; 14(6):649-66.
59. Cossarizza A, Ortolani C, Forti E, Montagnani G, Paganelli R, Zannotti M, Marini M, Monti D, Franceschi C. Age-related expansion of functionally inefficient cells with markers of natural killer activity in Down's Syndrome. *Blood.* 1991; 77(6): 1263-70.
60. Nurmi T, Huttunen K, Lassila O, Henttonen M, Säkkinen A, Linna SL, Tiilikainen A. Natural killer function in trisomy-21 (Down Syndrome). *Clin Exp Immunol.* 1992; 47: 735-41.
61. Montagna D, Maccario R, Ugazio AG, Nespoli L, Pedroni E, Faggiano P, Burgio GR. Cell-mediated cytotoxicity in Down Syndrome: impairment of allogeneic mixed lymphocyte reaction, NK and NK-like activities. *Eur J Pediatr.* 1988; 148: 53-7.
62. Sansoni P, Vescovini R, Fagnoni F. The immune system in extreme longevity. *Exp Gerontol.* 2008, 43:61-5.
63. Levin S, Schlesinger M, Handzel Z, Hahn T, Altman Y, Czernobilsky B, Boss J. Thymic deficiency in Down Syndrome. *Pediatrics.* 1979; 63(1): 80-7.

64. Franceschi C, Licastro F, Chricolo M, Bonetti F, Zannotti M, Fabris N, Mocchegiani E, Fantini MP, Paolucci P, Masi M. Deficiency of autologous mixed lymphocyte reactions and serum thymic factor level in Down's syndrome. *J Immunol* 1981; 126(6): 2161-4.
65. Larocca LM, Lauriola L, Raneletti F. Morphological and immunohistochemical study of Down syndrome thymus. *Am J Med Genet.* 1990; 7:225-30.
66. Larocca LM, Piantelli M, Valitutti S, Castellino F, Maggiano N, Musiani P. Alterations in thymocyte subpopulations in Down's syndrome (trisomy 21). *Clin Immunol Immunopathol.* 1988, 49:175-86
67. Murphy M, Lempert MJ, Epstein LB. Decreased level of T cell receptor expression by Down Syndrome (trisomy 21) Thymocytes. *Am J Med Genet* 1990; 7: 234-7.
68. Murphy M, Epstein LB. Tumor necrosis factor alfa and gama interferon expression in human thymus – localization and overexpression in Down syndrome (trysomy 21). *J Immunol.* 1992; 149: 2506-12.
69. Murphy M, Insoft RM, Pike-Nobile L, Derbin KS, Epstein LB. Overexpression of LFA-1 and ICAM-1 in Down Syndrome Thymus. Implications for abnormal thymocyte maturation. *J Immunol* 1993; 150(12): 5696-703.
70. Murphy M, Friend D, Pike-Nobile L, Epstein LB. Tumor necrosis factor- α and INF- γ expression in human thymus. Localization and Overexpression in Down Syndrome. *J Immunol.* 1992; 149(7): 2506-12.
71. Murphy M, Epstein LB. Down Syndrome (Trisomy 21) Thymuses have a decreased proportion of cells expressing high levels of TCR α,β and CD3. *Clin Immunol Immunopathol* 1990; 55: 453-467.
72. Thilaganathan B, Tsakonas D, Nicolaides K. Abnormal fetal immunological development in Down's syndrome. *Br. J Obstet Gynaecol.* 1993; 100(1): 60-2.
73. Heddon B, Mason D . The third function of the thymus. *Immunol Today.* 2000;21:95-9.
74. Hazenberg MD, Verschuren MCM, Hamann D, Miedema F, van Dongen JJM. T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *J Mol Med.* 2001; 79: 631-40.
75. Huang J, Durum SK, Muegge K. Cutting edge: histone acetylation and recombination at the TCR gamma locus follows IL7 induction. *J Immunol.* 2001; 167:6073-7.
76. Lorenzi AR, Patterson AM, Pratt A, Jefferson M, Chapman CE, Ponchel F, Isaacs JD. Determination of thymic function directly from peripheral blood: a validated modification to an established method. *J Immunol Methods* 2008, 31: 339 (2): 185-94.
77. Ribeiro RM, Perelson AS. Determining thymic output quantitatively: using models to interpret experimental T-cell receptor excision (TREC) data. *Immunol Rev.* 2007, 216:21-34.

78. Roat E, Prada N, Lugli E, Masi 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. *Rejuven Res.* 2008; 11(3): 573-83.
79. Prada N, Nasi M, Troiano L, Roat E, Pinti M, Nemes E, Lugli E, Ferraresi R, Ciacci L, Bertoni D, Biagioni O, Gibertoni M, Cornia C, Meschiari L, Gramazio E, Mariotti M, Consolo U, Balli F, Cossarizza A. Direct analysis of thymic function in children with Down's syndrome. *Immun Ageing.* 2005; 2(1):1-8.
80. Piccirillo CA. Regulatory T cells in health and disease. *Cytokine.* 2008; 43: 395-401.
81. Genre J, Errante PR, Kokron CM, Toledo-Barros M, Câmara NOS, Rizzo LV. Reduced frequency of CD4+CD25highFOXP3+ cells and diminished FOXP3 expression in patients with common variable immunodeficiency: a link to autoimmunity? *Clin Immunol.* 2009; 132: 215-21.
82. Kornete M, Piccirillo CA. Critical co-stimulatory pathways in the stability of Foxp3+Treg cell homeostasis in Type I Diabetes. *Autoimmunity Rev.[Internet]* (2011), doi:10.1016/j.autrev.2011.08.007. Available
83. Bonferroni CE. "Il calcolo delle assicurazioni su gruppi di teste." In *Studi in Onore del Professore Salvatore Ortu Carboni.* Rome: Italy, pp. 13-60, 1935.
84. Bonferroni CE. "Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilità." *Pubblicazioni del R Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze* 8, 3-62, 1936.
85. Ribeiro LMA, Jacob CMA, Pastorino ACP, Kim CAE, Fomin ABF, Castro APBM. Avaliação dos fatores associados a infecções recorrentes e/ou graves em pacientes com síndrome de Down. *J Pediatr.* 2003; 79(2): 141-8.
86. Hofer J, Hofer S, Zlamy M, Jeller V, Koppelstaetter C, Brandstätter A, Kern H, Köhle J, Zimmerhackl B, Prelog M. Elevated proportions of recent thymic emigrants in children and adolescents with type 1 diabetes. *Rejuvenation Res.* 2009; 12(5): 311-20.
87. Zaldivar-Chiapa RM, Arce-Mendonza AY, De La Rosa-Ramirez M, Caffesse RG, Solis-Soto JM. Evaluation of surgical and non-surgical periodontal therapies, and immunological status of Down's syndrome patients. *J Periodontol.* 2005; 76(7): 1061-5.
88. Petterson A, Wilson D, Daniels T, Tobin S, Jacob HJ, Lander ES, Lernmark A. Thyroiditis in the B rat is associated with lymphopenia but occurs independently of diabetes. *J Autoimmun* 1995; 8(4): 493-505.

89. Nagayama Y, Horie I, Saitoh O, Nanahara M, Abiru N. CD4+CD25+ and naturally occurring regulatory T cells and not lymphopenia play a role in the pathogenesis of iodide-induced autoimmune thyroiditis in NOD-H2h4 mice. *J Autoimmun.* 2007; 29(2-3): 195-202.
90. Le Champion A, Gagnerault MC, Auffray C, Bécourt C, Poitrasson-Rivière M, Lallemand E, Bienvenu B, Martin B, Lepault F, Lucas B. Lymphopenia-induced spontaneous T-cell proliferation as a cofactor for autoimmune disease development.
91. Prelog M, Keller M, Geiger R, Brandstätter A, Wuzner R, Schweigmann U, Zlomy M. Thymectomy in early childhood: significant alterations of the CD4+CD45+CD62L+ T cell compartment in later life. *Clin Immunol* 2009; 130(2): 123-32.
92. Kohler S, Thiel A. Life after the thymus: CD31+ and CD31- human naïve CD4+T-cell subsets. *Blood* 2009; 113(4): 769-74.
93. Armengol MP, Sabater L, Fernandez M, Ruiz M, Alonso N, Otero MJ, Martinez-Cáceres E, Jaraquemada D, Pujol-Borrel R. Influx of recent thymic emigrants into autoimmune thyroid disease glands in humans. *Clin Exp Immunol* 2008; 153(3): 338-50.
94. Sempowski GD, Cross SJ, Heinly CS, Searce RM, Haynes BF. CD27 and Cd28 are required for murine CD24+CD25+ regulatory T cell homeostasis and prevention of thyroiditis. *J Immunol* 2004; 172(2): 787-94.
95. Giubilato S, Liuzzo G, Brugaletta S, Pitocco D, Graziani F, Smaldone C, Montone RA, Pazzano V, Pedicino D, Biasucci LM, Ghirlanda G, Crea F. Expansion of CD4+CD28null T-lymphocytes in diabetic patients: exploring new pathogenetic mechanisms of increased cardiovascular risk in diabetes mellitus. *Eur Heart J* . 2011; 32(10): 1214-26.