

Projeto de investigação

# **Aspetos clínicos e imunológicos numa população pediátrica com deleção 22q11**

**Sara Raquel Pereira Martins**

Mestrado Integrado em Medicina (MIM) do ICBAS/UP

Orientadora: Dra. Júlia Vasconcelos, HGSA/CHP

Coorientadora: Dra. Laura Marques, HGSA/CHP

Ano letivo: 2013/2014

O presente trabalho, executado com a finalidade de obtenção do grau de Mestre em Medicina, foi desenvolvido ao longo de dois anos letivos, no âmbito da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica (DIIC) do Mestrado Integrado em Medicina (MIM) do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto (ICBAS/UP).

Trata-se de um trabalho bipartido, composto por uma proposta de projeto de investigação, elaborada durante o ano letivo 2012/2013, e pelo respetivo relatório de execução, a qual decorreu durante o ano letivo 2013/2014.

A execução do projeto teve lugar no Centro Hospitalar do Porto (CHP), nos serviços de Imunologia e Pediatria, sob a orientação da Dra. Júlia Vasconcelos e coorientação da Dra. Laura Marques e com a supervisão da Prof. Doutora Margarida Lima, docente responsável pela DIIC.

## RESUMO

A deleção da região q11.2 do cromossoma 22 (del22q11) é a base genética comum de um grupo heterogéneo de patologias (maioria dos casos de síndrome de DiGeorge e Síndrome velo-cardio-facial, com associação ocasional a outras doenças), dando origem a uma síndrome que, com uma incidência estimada de 1:4000, se revela como a síndrome mais frequente associada a uma deleção cromossómica. O facto da síndrome del22q11.2 (SD22q11) ter uma grande variabilidade clínica tem dificultado o estabelecimento de correlações genótipo-fenótipo assim como o seu correto diagnóstico.

Para além da variabilidade clínica, tem sido também relatado um largo espectro de alterações imunológicas associadas a esta deleção. A maioria dos doentes apresenta um défice leve a moderado na contagem de células T, que se julga ser secundário a uma migração aberrante do timo com consequente hipoplasia ou aplasia tímica, e que tende a ser mais grave na infância que na idade adulta. Não existem portanto dúvidas de que ocorre uma desregulação imune de base, a qual se traduz num aumento da suscetibilidade a patologia infecciosa e autoimune. Contudo, a caracterização deste desequilíbrio e as suas causas permanecem ainda largamente desconhecidas, com estudos prévios obtendo resultados até contraditórios. Atualmente tem sido colocada a hipótese de que estas alterações decorram de um aumento da produção periférica de linfócitos, por proliferação de células T *näive* e aceleração da sua conversão em células T de memória, numa tentativa de alcançar a homeostasia. Esta proliferação periférica contribuiria para a normalização das contagens celulares com a idade verificada nestes doentes; porém poderia também induzir um desvio das subpopulações de células T no sentido T *helper* 2 (Th2), o que por sua vez possivelmente causaria uma desregulação das células B. Assim sendo colocou-se a hipótese de que, tal como parece acontecer noutras patologias, a desregulação das células B neste síndrome resultaria no aumento de suscetibilidade a infeções e a autoimunidade. Efetivamente, alguns estudos revelaram uma diminuição nas contagens das células B de memória e um atraso da maturação no compartimento celular B, com diminuição das células B *unswitched* na infância e das células B *switched* na idade adulta, nos doentes com SD22q11. Contudo um outro estudo reportou uma correlação direta entre os linfócitos T recentemente emigrados do timo e a população de células T *näive*, indicando que seria o *output* tímico, por contraposição à proliferação periférica, o responsável pela manutenção do *pool* destas células. A verificar-se esta última hipótese deixaria de haver um substrato que implicasse desvio celular B e, conseqüentemente, poderia invalidar este como causador da maior suscetibilidade.

Como este projeto pretendeu-se responder a algumas das questões em aberto, tentando compreender melhor as características clínicas e imunológicas associadas à SD22q11. Para isso

foram estudadas as 12 crianças com SD22q11 acompanhadas no CHP, com registo das manifestações clínicas e dos resultados dos estudos imunológicos desta população, o que permitiu determinar a prevalência das diferentes alterações clínicas e imunológicas. Para além disto procedeu-se à análise das contagens dos linfócitos T recentemente emigrados do timo e das células B de memória, *switched* e *unswitched*, destas crianças, e sua comparação com controlos. Com estas análises pretendeu-se avaliar duas principais hipóteses atuais: a de que a melhoria das contagens celulares com a idade nos doentes se deve à proliferação periférica, com conseqüente desvio secundário das células B, que poderá estar na origem de patologia autoimune e infecciosa; ou a de que a correção das contagens é mantida pelo *output* tímico, o que poderia invalidar a dedução anterior.

Os resultados deste estudo confirmam a heterogeneidade clínica e imunológica da SD22q11. As manifestações clínicas mais frequentes foram a dismorfia e as dificuldades de aprendizagem, enquanto que a nível imunológico se confirmou linfopenia de células T, com atingimento predominante dos linfócitos CD4. Os linfócitos B e as células NK mostraram também algumas alterações de contagem, nem sempre melhorando com o crescimento dos doentes. Por outro lado, as contagens linfocitárias T tenderam no sentido da normalização com a idade, em paralelo com a melhoria da clínica infecciosa. As células B *switched* e *unswitched* mostraram-se semelhantes entre doentes e controlos, não sendo notadas alterações destas como possível causa de suscetibilidade para doença infecciosa e autoimune na SD22q11. Ao mesmo tempo foi demonstrado que nos doentes, à semelhança dos controlos, existe correlação do *output* tímico com a *pool* de linfócitos T *naïve* em circulação, indicando que será provavelmente este o responsável pela normalização dos desvios imunes com a idade. Por fim, os achados levantam, mas não confirmam, a possibilidade de uma relação das baixas contagens de células T recentemente emigradas do timo com a maior suscetibilidade a doença infecciosa e autoimune, a qual, a confirmar-se, poderia estabelecer um importantíssimo marcador preditivo de necessidade de profilaxia antibiótica e acompanhamento mais regular em determinado grupo de doentes.

**Palavras-chave:** deleção 22q11; infeções; autoimunidade; imunologia; pediatria; linfócitos B de memória; linfócitos T recentemente emigrados do timo.

## ABSTRACT

Deletion of the region q11.2 of chromosome 22 (del22q11) is a common genetic basis of a heterogeneous group of diseases (most cases of DiGeorge and velo-cardio-facial syndromes with occasional association with other diseases), yielding a syndrome with an estimated incidence of 1:4000, which appears as the most common syndrome associated with a chromosomal deletion. The fact that del22q11 syndrome (22q11DS) have a great clinical variability has hampered the establishment of genotype-phenotype correlations as well as the correct diagnosis.

In addition to the clinical variability, a broad spectrum of immunological changes has been also reported associated with this deletion. Most patients present a mild to moderate deficit in T-cell counts, which is thought to be secondary to an aberrant migration of the thymus with consequent thymic aplasia or hypoplasia, and that tends to be more severe in childhood than in adulthood. Therefore there is no doubt that there is an immune deregulation, which translates into an increased susceptibility to infectious and autoimmune disease. However, the characterization of this gap and its causes remain largely unknown, with previous studies contradictory to the results obtained. Currently it has been hypothesized that these changes result from an increase in peripheral lymphocyte production by *näive* T-cell proliferation and accelerated conversion into memory T cells in an attempt to achieve homeostasis. This peripheral proliferation contribute to the normalization of cell counts with age observed in these patients; but could also induce a shift of T cell subpopulations towards T helper 2 (Th2), which in turn possibly causes a disruption in the B cell compartment. Therefore the hypothesis is that deregulation of B cells in this syndrome results in increased susceptibility to infections and autoimmunity. Indeed, some studies showed a decrease in memory B cells and a delay in the maturation of B cell compartment with a reduction of *unswitched* B cells in childhood and *switched* B cells in adulthood, in patients with 22q11DS. Yet another study reported a direct correlation between recent thymic emigrants and the population of *näive* T cells, indicating that thymic output, as opposed to peripheral T cell proliferation, would be responsible for maintaining the pool of these cells.

With this project we intended to answer some of the open questions, trying to better understand the clinical and immunological features associated with 22q11DS. For this study, 12 children with 22q11DS accompanied at the CHP were evaluated, with registration of clinical manifestations and results of the immunological studies, which allowed determination of the prevalence of different clinical and immunological changes. Furthermore, we proceeded to the analysis of the recently thymic emigrants and memory B cells, *switched* and *unswitched*, in these children, and their comparison with controls. With this, we sought to assess the current two main hypotheses: that the improvement of cell counts in patients with age is due to peripheral

proliferation, with consequent secondary deviation of B cells, which could be the cause of autoimmune and infectious diseases; or that the correction of the counts is maintained by thymic output, which could invalidate the previous deduction.

The results of this study confirm the clinical and immunological heterogeneity of SD22q11. The most common clinical features were dysmorphic facies and learning difficulties. Immunologically, predominantly CD4+ T lymphopenia was found. B lymphocytes and NK cells also showed counts anomalies, not always improving with age. On the other hand, T-lymphocytes count evolved toward normalization during growth, accompanied by an improvement in infectious manifestations. *Switched* and *unswitched* B cell counts were similar in patients and controls, without any noticeable differences that could explain an increased susceptibility to infection and autoimmunity. A correlation between thymic output and *naïve* T cells was found in patients, such as in controls, indicating thymic output as a probable source of the normalization of lymphocyte counts with age. Furthermore, the result have raised, but not proved, the possibility of a relation between low recent thymic emigrants and the susceptibility to infection and autoimmune disease. If that relationship comes to be proven, recent thymic emigrants could represent a very important predictive marker of a group of patients in need of antibiotic prophylaxis and more careful follow-up.

**Keywords:** 22q11 deletion; infections; autoimmunity; immunology; pediatrics; memory B lymphocytes; recent thymic emigrants.

## ÍNDICE

<b>RESUMO .....</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>iii</b>
<b>A. PROPOSTA DE PROJETO DE INVESTIGAÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>Plano científico .....</b>	<b>2</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>3</b>
<b>Enquadramento teórico / Estado da arte .....</b>	<b>5</b>
Manifestações clínicas .....	5
Imunodeficiência .....	6
Autoimunidade .....	8
<b>Problemas.....</b>	<b>10</b>
<b>Questões.....</b>	<b>10</b>
<b>Hipóteses de trabalho.....</b>	<b>10</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>10</b>
<b>Intervenientes.....</b>	<b>11</b>
Instituições, Departamentos e Serviços .....	11
Equipa de investigação .....	11
<i>Constituição .....</i>	<i>11</i>
<i>Funções e responsabilidades .....</i>	<i>12</i>
<i>Tempo dedicado ao projeto .....</i>	<i>12</i>
<i>Condições e motivações para a realização do estudo .....</i>	<i>12</i>
<b>Metodologia.....</b>	<b>14</b>
Revisão da literatura .....	14
Desenho do estudo .....	14
<i>Tipo de estudo .....</i>	<i>14</i>
<i>Universo, população e amostra .....</i>	<i>14</i>
<i>Seleção dos participantes.....</i>	<i>14</i>
<i>Critérios de elegibilidade.....</i>	<i>15</i>
Plano de trabalho .....	15
<i>Tarefas associadas ao projeto .....</i>	<i>15</i>
Material e métodos .....	17
<i>Instrumentos de recolha de dados.....</i>	<i>17</i>
<i>Procedimentos técnicos.....</i>	<i>17</i>
<i>Equipamento .....</i>	<i>18</i>
<i>Reagentes .....</i>	<i>18</i>
Análise de dados .....	18
<b>Calendarização .....</b>	<b>19</b>
Duração.....	19

Datas de início e conclusão.....	19
Cronograma .....	19
<i>Metas a atingir no âmbito do projeto (milestones)</i> .....	20
<i>Entregas a efetuar no âmbito do projeto (deliverables)</i> .....	20
<b>Indicadores de produção.....</b>	<b>20</b>
Comunicações orais e posters .....	20
Trabalhos escritos .....	20
<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>21</b>
<b>Questões éticas.....</b>	<b>24</b>
<b>Informação dos participantes e consentimento informado .....</b>	<b>25</b>
Informação dos participantes .....	25
Consentimento informado .....	25
<b>Outras questões com implicações éticas .....</b>	<b>25</b>
Riscos e benefícios .....	25
Confidencialidade e anonimização .....	25
<b>Plano financeiro.....</b>	<b>26</b>
<b>Orçamento.....</b>	<b>27</b>
<b>Financiamento .....</b>	<b>27</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>28</b>
<b>Termos de consentimento informado.....</b>	<b>29</b>
Termo de consentimento informado (para doentes) .....	29
Termo de consentimento informado (para controlos).....	30
<b>Folheto informativo sobre o estudo .....</b>	<b>31</b>
Informação sobre o estudo (para doentes) .....	31
Informação sobre o estudo (para controlos) .....	32
<b>Formulário de recolha de informação clínica e laboratorial.....</b>	<b>33</b>
<b>Adenda .....</b>	<b>35</b>
<b>Folha de rosto do estudo de investigação .....</b>	<b>37</b>
<b>Pedidos de autorização institucional.....</b>	<b>39</b>
Presidente do Conselho de Administração do CHP.....	39
Presidente da Comissão de Ética para a Saúde do CHP .....	39
Diretora do Departamento de Ensino, Formação e Investigação do CHP.....	39
<b>Termos de responsabilidade .....</b>	<b>40</b>
Aluno .....	40

Orientador do projeto.....	40
Supervisor do projeto / Responsável pela DIIC .....	40
<b>Termos de autorização local .....</b>	<b>41</b>
Diretores de Serviço .....	41
Diretores / Conselhos de Gestão de Departamento .....	41
<b>B. RELATÓRIO DE EXECUÇÃO DO PROJETO DE INVESTIGAÇÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>43</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>45</b>
Caraterização clínica.....	45
Caraterização imunológica .....	49
<i>Populações linfocitárias T, B e NK.....</i>	<i>49</i>
<i>Linfócitos T naïve e linfócitos T de memória .....</i>	<i>53</i>
<i>Linfócitos T recentemente emigrados do timo e linfócitos B de memória .....</i>	<i>57</i>
<i>Níveis séricos de imunoglobulinas.....</i>	<i>62</i>
Relação entre as alterações imunológicas e as manifestações clínicas.....	63
<b>Discussão .....</b>	<b>65</b>
<b>Conclusões.....</b>	<b>69</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>70</b>
<b>GLOSSÁRIO DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>71</b>
<b>Siglas e acrónimos .....</b>	<b>71</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>72</b>

## **A. PROPOSTA DE PROJETO DE INVESTIGAÇÃO**

### **Aspetos clínicos e imunológicos numa população pediátrica com deleção 22q11**

Área de Investigação: Imunologia e Pediatria

**Aluna:** Sara Raquel Pereira Martins

**Orientadora:** Dra. Júlia Vasconcelos, HSA/CHP

**Coorientadora:** Dra. Laura Marques, HSA/CHP e ICBAS/UP

Mestrado Integrado em Medicina (MIM) do ICBAS/UP e HSA/CHP

Disciplina de Iniciação a Investigação Clínica (DIIC)

Responsável: Prof. Doutora Margarida Lima, HSA/CHP e ICBAS/UP

Ano letivo: 2012/1013

## **Plano científico**

## Introdução

A deleção da região q11.2 do cromossoma 22 é a base genética comum de um grupo heterogéneo de patologias, dando origem a uma síndrome que, com uma incidência estimada de 1:4000, se revela como a mais frequente síndrome associada a uma deleção cromossómica [1]. A deleção monossómica 22q11.2 está associada à maioria dos casos de síndrome de DiGeorge (anomalias cardíacas, hipoparatiroidismo, imunodeficiência congénita) e síndrome velo-cardio-facial (disfunção faríngea, anomalias cardíacas e dismorfia facial), sendo ocasionalmente relacionada também com outras doenças, como síndrome CHARGE ou síndrome da anomalia facial conotruncal [2,3].

A região comumente atingida (90% dos casos) apresenta predisposição para a ocorrência de rearranjos, provavelmente devido a eventos de recombinação homóloga entre as duas regiões essencialmente idênticas de repetições de baixo número de cópias (*low copy-repeats*, LCR). Durante a recombinação dá-se a deleção de 3 milhões de pares de bases, que englobam mais de 30 genes [4]. Entre esses genes encontra-se o *Tbx1*, expresso nas células derivadas da crista neural e considerado como o principal responsável pelo fenótipo da síndrome velo-cardio-facial [2, 5]. Um outro gene implicado é o gene *Crkl*, também ele contido na zona da deleção, e cuja deleção homozigota nos ratos resulta em morte gestacional por múltiplos defeitos nos tecidos derivados da crista neural, incluindo arco aórtico, timo, glândulas paratiroides e estruturas craniofaciais [6]. No entanto a síndrome de deleção do cromossoma 22q11 (SD22q11) apresenta um largo espectro fenotípico, envolvendo também alterações otorrinolaringológicas, renais, gastrointestinais, neuropsiquiátricas, entre outras [7]. A grande variabilidade clínica associada a esta síndrome tem feito com que as correlações genótipo-fenótipo sejam difíceis. Para além disso, e de modo diferente do verificado noutras síndromes de microdeleção cromossómica, não há correlação entre o tamanho da deleção e a gravidade da doença [8]. A grande complexidade e heterogeneidade genéticas têm dificultado a determinação definitiva dos genes críticos para a SD22q11 [9].

Apesar da marcada variabilidade de manifestações, considerando todos os doentes que apresentam deleção 22q11.2, as mais frequentemente presentes são as malformações cardíacas, atraso de linguagem e imunodeficiência [3].

As alterações do sistema imune, tal como a restante expressão clínica da SD22q11, é muito variável entre pacientes, com um espectro que varia de ausência de disfunção imune até à linfopenia T grave [10]. Contudo o mais frequente é existir uma linfopenia T leve a moderada, que se pensa ser causada por uma deficiente migração tímica [11-13]. Mais recentemente tem-se vindo também a reportar alterações dos linfócitos B, com estudos indicativos de uma incidência aumentada de hipogamaglobulinemia e diminuição do número de linfócitos B de memória. O significado destes

achados, bem como a sua extensão e frequência, permanecem ainda em grande parte desconhecidos, colocando-se a hipótese de, a par com as alterações dos linfócitos T, constituírem uma causa do aumento de patologia infecciosa nestes pacientes [13-17].

Para além da imunodeficiência estas crianças mostram também uma maior tendência para o desenvolvimento de autoimunidade (AI) [18,19], sobretudo citopenias, artrite e endocrinopatias [18,20-22]. Esta é uma área acerca de cuja etiologia permanecem largas dúvidas. Uma das hipóteses é que a autoimunidade possa ser despoletada pela maior tendência a doenças infecciosas, no entanto o seu desenvolvimento não parece estar relacionado com o número de infeções [19,23]. Outra possibilidade estudada prendeu-se com as alterações das células Th17, cujo desequilíbrio foi já associado a algumas doenças autoimunes, porém estas não mostraram alterações [24]. As células T reguladoras (Treg), de grande relevância na tolerância ao próprio e cuja disfunção tem sido implicada no desenvolvimento de AI, estão em menor número nos doentes com SD22q11 comparativamente aos controlos, mas não se mostrou diferenças nas suas contagens entre pacientes com e sem patologia autoimune [13,25]. Por fim teoriza-se que, devido a uma proliferação periférica de linfócitos T que ocorrerá como uma tentativa de atingimento de normalização das suas contagens, se dê um desvio no sentido das células Th2, o que por seu lado terá como consequência a desregulação das células B, induzindo não só a hipogamaglobulinemia, mas possivelmente também a AI [24].

Deste modo, apesar de se tratar de uma doença relativamente frequente, a SD22q11 permanece ainda, em larga medida, desconhecida para a comunidade científica. A grande heterogeneidade clínica torna desde logo difícil a sua identificação e diagnóstico, pelo que são necessários estudos que reúnam mais informação acerca das suas manifestações. Por outro lado, embora esteja claramente estabelecido que uma desregulação imune é frequente nestes doentes, não se conhece ao certo quais as características e ainda menos as causas desta. Desta forma, é relevante que se procure elucidar estes aspetos. Esse é o objetivo deste projeto, no qual se pretende registar as alterações clínicas encontradas, determinar a sua prevalência na população alvo e procurar esclarecer se haverá relação entre manifestações clínicas e imunológicas. No que respeita a estas últimas, pretende-se caracterizar o perfil fenotípico dos linfócitos T e dos linfócitos B do sangue periférico, nomeadamente através da quantificação das células T recentemente emigradas do timo, das células T *naïve* e das células T de memória e das células B de memória *switched* e *unswitched*.

## **Enquadramento teórico / Estado da arte**

### **Manifestações clínicas**

As anomalias cardíacas consistem não só na manifestação clínica mais frequentemente associada à SD22q11 (presente em cerca de 75% dos doentes) mas também na principal fonte de sintomatologia que conduz ao diagnóstico. Para além disto são a maior causa de mortalidade desta síndrome, com uma gravidade clínica inversamente proporcional à idade de surgimento dos sintomas [7,26]. Dentro destas, a mais comum é a tetralogia de Fallot (obstrução da via de saída do ventrículo direito por estenose pulmonar, comunicação interventricular, hipertrofia ventricular direita e dextroposição da aorta), seguida da interrupção do arco aórtico do tipo B (distal à origem da artéria carótida comum esquerda mas proximal à origem da artéria subclávia). Persistência do tronco arterial, comunicação interauricular ou coartação da aorta, entre outros exemplos, podem estar presentes [2,7].

Alterações da alimentação são as segundas manifestações mais frequentes [7]. São encontradas em cerca de 30% das crianças e não estão relacionadas com a doença cardíaca ou anomalias do palato [26]. As manifestações gastrointestinais mais comumente encontradas são o refluxo gastroesofágico, esofagite e obstipação crónica. Defeitos congénitos, como atresia esofágica, hérnia diafragmática, megacolon congénito e anomalias dentárias podem ser também detetados [7].

A patologia otorrinolaringológica é comum, sendo liderada pela insuficiência velofaríngea, com uma frequência que varia de 27 a 92% [2,26]. Fenda palatina, fissura palatina submucosa, laringomalácia, estenose ou atresia das coanas, fístulas ou apêndices pré-auriculares e hipoacusia são outros exemplos relatados. A maioria dos pacientes mostra anomalias do canal auditivo externo, o que pode resultar numa predisposição para infeções como a otite média [7].

Também foi descrita patologia neurológica e psiquiátrica. Pode ocorrer atraso do desenvolvimento motor e da linguagem, défice de atenção e hiperatividade, instabilidade emocional e ansiedade, patologia do espectro do autismo, depressão e, nos adultos, por vezes há tendência ao desenvolvimento de surtos psicóticos com características semelhantes à esquizofrenia. Dificuldades da aprendizagem são identificadas na maioria dos pacientes, podendo variar de leves a profundas [7,26,27].

Desregulações endócrinas fazem também parte do grupo de manifestações clínicas associadas à SD22q11. Hipocalcemia neonatal, secundária ao hipoparatiroidismo, é frequente e as convulsões secundárias a esta podem constituir a forma de apresentação da doença [28]. Tende a ser mais grave neste período, normalizando ao longo do tempo por hipertrofia compensatória das

paratiroides [7,26,28]. No entanto pode ser desenvolvida hipocalcemia transitória ou permanente numa fase mais tardia, perante situações de stress, como cirurgia ou infeção grave [7,26].

Uma outra manifestação clínica muito comum é a dismorfia facial. Características como hipertelorismo, redundância das pálpebras superiores, fenda palpebral estreita, aumento da altura do nariz, aumento da largura da base nasal, palato alto, boca pequena, retrognatismo, sobredobramento da hélice ou diminuição da distância nasolabial são características comuns, no entanto nem sempre estão presentes e nalguns pacientes não há qualquer indício de alterações faciais [7,26,28].

Além das citadas existem muitas outras manifestações possíveis na SD22q11, com atingimento renal, oftalmológico ou do sistema musculo-esquelético [7,26,28].

### **Imunodeficiência**

A imunodeficiência, que se acredita ser secundária à aplasia/hipoplasia do timo, pode, tal como as outras manifestações, apresentar vários graus de gravidade, no entanto não mostra correlação com qualquer característica fenotípica [10].

A aplasia tímica completa, com linfopenia T completa ou grave e com fenótipo de imunodeficiência severa combinada, corresponde à forma mais grave de imunodeficiência associada à SD22q11, porém é extremamente rara, sendo encontrada em menos de 1.5% dos pacientes [29].

A maioria dos doentes com alterações imunes apresenta défices leves a moderados na contagem de células T, havendo estudos contraditórios quanto ao fato da linhagem mais afetada ser a CD8+, CD4+ ou o atingimento ser semelhante entre estas [11-13]. Pensa-se que estes casos sejam secundários não a uma aplasia tímica mas antes a uma migração tímica aberrante, com existência de “ninhos” microscópicos de tecido tímico que permitam a produção de células T [12]. Ao contrário do que acontece nos casos de linfopenia T completa/grave, nos défices moderados a resposta proliferativa a PHA (fitohemaglutinina, lectina que estimula a ativação dos linfócitos T através do recetor de células T) mantém-se inalterada [11,19,30]. Linhagens que não dependam do timo para a maturação, como células B ou células *natural killer* (NK), não mostram alterações nas contagens [11,13]. Apesar de nestes pacientes a imunodeficiência ser clinicamente relevante, manifestando-se predominantemente como infeções do trato respiratório superior ou mais raramente do trato respiratório inferior, a maioria das crianças não apresenta infeções oportunistas e não requer isolamento ou outras medidas específicas necessárias nos casos de linfopenia grave [11,19,31].

Não obstante, tal como previamente referido, uma diminuição na contagem das células T no sangue periférico ser muito frequente na SD22q11, é também comum que esta seja muito mais marcada na infância que na idade adulta. Ao longo da infância ocorre nos doentes, assim como nas

crianças saudáveis, uma diminuição das contagens de células CD3+, CD4+ e CD8+, no entanto esta diminuição é menos marcada nas crianças com deleção 22q11 [13,18,30,32]. Acredita-se que esta compensação seja secundária à produção periférica de linfócitos devido a um aumento da replicação das células T *naïve* e de uma aceleração da sua conversão em células de memória, o que apesar de permitir uma melhoria nas contagens celulares conduz também a uma diminuição da diversidade de células T [32]. A análise do repertório das famílias de regiões variáveis da cadeia beta (V $\beta$ ) do recetor de células T (TCR) evidenciou expansões de algumas famílias, provavelmente de carácter oligoclonal, e diminuição de outras, congruente com um mecanismo de proliferação homeostática e indicativo de um desequilíbrio do repertório das células T na SD22q11 [24,32]. Por outro lado, outro estudo mostra que, apesar dos linfócitos recentemente emigrados do timo estarem diminuídos (tal como seria expectável, tendo em conta a fisiopatologia desta imunodeficiência), há uma correlação direta entre estes e a população de células T *naïve*, indicando que é o *output* tímico, e não a proliferação, o responsável pela manutenção do *pool* de células *naïve*, nos pacientes assim como nos controlos. Demonstrou-se ainda a existência de correlação entre o aumento de células T efectoras e diminuição de células T *naïve*, sugerindo que a melhoria nas contagens das células T se daria não por uma proliferação das células *naïve* mas antes a um aumento das populações T de memória/efectoras [13].

Para além das alterações nas contagens celulares T tem sido também relatado um amplo espectro de alterações humorais. Foram reportados casos congruentes com imunodeficiência variável comum, deficiência de subclasses de imunoglobulina (Ig) G, deficiência em IgA, deficiência em IgM, deficiência de anticorpos específicos e alterações da resposta à vacinação [13-17]. Surgem evidências de que esta alteração funcional dos linfócitos B e a hipogamaglobulinemia estão associados a infeções mais graves na SD22q11 [15,33], estabelecendo uma possível explicação para o facto de que a recorrência e gravidade das infeções nem sempre apresentam correlação com o número de linfócitos T [10,31]. Em oposição, um estudo com 195 crianças indicou que deficiências de anticorpos específicos e IgA eram raras, e que os níveis de IgG, embora inicialmente mais baixos nos pacientes que os encontrados na literatura, elevavam-se ao longo do tempo acabando por ultrapassar estes últimos [18].

Embora a imunodeficiência da SD22q11 esteja historicamente associada à linfopenia T, a hipogamaglobulinemia não é a única disfunção de células B que tem vindo a ser descoberta como associada a esta síndrome. Alguns estudos revelaram que apesar das contagens de linfócitos B não mostrarem alterações, há uma diminuição de células B de memória [13,24,33], estando a população *unswitched* mais afetada na infância enquanto a população de células B *switched* se mostra alterada na idade adulta, características sugestivas de um atraso da maturação do compartimento celular B [24]. As alterações humorais e a diminuição de células B *switched* poderão ser explicadas por uma

insuficiente ativação e diferenciação das células B devido à deficiência em linfócitos T, de que estes processos são dependentes [34,35]. A razão para o declínio de células *unswitched* permanece menos clara [13]. A diminuição do número de células B de memória *unswitched* pode estar relacionada com o aumento de infeções, uma vez que este subtipo de linfócitos parece funcionar como células da imunidade inata, produzindo isotipos de IgM de alta afinidade e representando uma linha de defesa imediata contra a maioria das infeções hematogéneas, através de uma resposta rápida, independente de células T, contra bactérias capsuladas [36]. Por outro lado uma menor contagem de células B de memória já se mostrou também presente noutras patologias que mostram maior risco de AI, como por exemplo imunodeficiência variável comum ou deficiência seletiva em IgA [37,38], tendo um estudo indicado que nos pacientes com imunodeficiência seletiva em IgA quer a prevalência de infeções quer de AI estariam aumentadas em doentes com diminuição do número de células B de memória *switched* [38].

### **Autoimunidade**

Tal como previamente referido ao longo do trabalho, doentes com deleção 22q11 apresentam um maior risco de desenvolvimento de autoimunidade (AI) [18,19], tendo sido descritas citopenias, artrite e endocrinopatias autoimunes [18,20-22].

O mecanismo pelo qual ocorre a AI não é ainda conhecido, sendo provável que tenha uma base multifatorial [19], e não se conhecem atualmente biomarcadores que permitam identificar ou prever quem a virá a desenvolver [18].

Pensa-se que as infeções, a que estes doentes são mais suscetíveis, poderão induzir AI por vários mecanismos como libertação de antigénios sequestrados durante o dano tecidual, ativação *bystander* de linfócitos T autorreativos ou mimetismo molecular entre os micro-organismos e os peptídeos endógenos [39]. Contudo nos casos de SD22q11 o desenvolvimento de AI não parece estar relacionado com o número de infeções [19,23].

Um outro mecanismo possível seria uma desregulação no desenvolvimento de células Treg secundária à anomalia tímica. Esta população celular é derivada do timo, sendo este essencial na sua regulação do sistema imune, e desempenha um importante papel na tolerância e desenvolvimento de AI [19,40]. Alguns estudos mostraram que as contagens e a proporção destas se apresentam reduzidas nos pacientes com SD22q11 comparativamente aos controlos, no entanto não se mostrou diferença entre os pacientes com e sem AI [13,25].

As células Th17 são um subtipo de células *helper* (Th) com funções protetoras perante certas infeções fúngicas e bacterianas, nomeadamente *C. Albicans* e *S. Aureus* [41]. Estes linfócitos têm sido relacionados com várias doenças autoimunes, como artrite reumatoide, psoríase ou esclerose

múltipla [41] pelo que a sua alteração na SD22q11 poderia indicar um outro fator facilitador de AI, porém um estudo indicou que estas não estarão alteradas [24].

Mais recentemente surgiu uma nova teoria para o fundamento da maior incidência da AI nestes pacientes. Esta defende que a diminuição inicial nas contagens de células T com a expansão periférica por via homeostática, já atrás discutida, terá como consequência um desvio dos subtipos de células T, com aumento da população Th2. Este desvio, em associação com a limitação do repertório de células T, poderá resultar numa anormal ativação e diferenciação das células B, culminando na diminuição das células B de memória reportada nestas crianças. Isto poderia explicar a diminuição de produção de imunoglobulinas e anomalias da produção de anticorpos específicos, assim como contribuir para o desenvolvimento de AI. Apesar de nas crianças não se verificar o esperado desvio Th2, tendo até sido reportado um desvio no sentido Th1, nos adultos com deleção 22q11 o aumento da razão Th2:Th1 é significativo em comparação com os controlos [24].

## Problemas

A SD22q11 é uma síndrome causada por uma deleção monossómica relativamente frequente, no entanto as suas características, etiopatogenia e evolução permanecem ainda em grande parte desconhecidas. A grande heterogeneidade clínica a que está associada é um dos principais fatores dificultantes da sua compreensão e diagnóstico. Sabe-se que está muitas vezes associada a alterações do sistema imune, com aumento de incidência de patologia infecciosa e autoimune, contudo a caracterização dessas alterações e a sua correlação com a clínica tem sido alvo de grande discussão, com achados contraditórios em diferentes estudos.

## Questões

Dentro da grande variabilidade clínica da SD22q11 quais são as manifestações mais comuns? Existe relação entre estas e a disfunção do sistema imune? Quais são as alterações imunes mais frequentes nesta síndrome? De que forma estas podem explicar o aumento de incidência de infeções e de AI nestes pacientes?

## Hipóteses de trabalho

As contagens de células T CD8 e CD4 são diferentes entre o grupo de doentes e o grupo de controlo; a contagem de células T de memória é diferente entre o grupo de doentes e o grupo de controlo e diferente entre doentes com e sem infeções recorrentes; as contagens de células T *náive* e de células T recentemente emigradas do timo são diferentes entre o grupo de doentes e o grupo de controlo; há correlação entre as contagens de células T *náive* e de células T recentemente emigradas do timo; a contagem de células B de memória e seus subtipos é diferente entre o grupo de doentes e o grupo de controlo, entre doentes com e sem AI e entre doentes com e sem infeções recorrentes.

## Objetivos

O principal objetivo do estudo é a caracterização dos aspetos clínicos e imunológicos da SD22q11. Para isso, a nível clínico, pretende-se determinar a prevalência das diferentes alterações e procurar esclarecer se há relação entre manifestações clínicas e imunológicas. Os dados para tal serão obtidos por consulta dos processos clínicos. No que respeita ao sistema imune pretende-se caracterizar as alterações associadas à deleção 22q11 e tentar compreender de que modo estas podem conduzir ao aumento de suscetibilidade para patologias infecciosas ou autoimunes. Para tal serão consultados os dados registados no processo clínico e ainda efetuada nova colheita de sangue para realização de análises de rotina no momento presente e análises de investigação. Estas últimas consistirão na quantificação de células T recentemente emigradas do timo e a quantificação de células B de memória, *switched* e *unswitched*.

## **Intervenientes**

### **Instituições, Departamentos e Serviços**

Centro Hospitalar do Porto (CHP)

Centro de responsabilidade de meios de apoio ao diagnóstico (CRMAD)

Serviço de Imunologia

Centro de responsabilidade materno infantil do Norte (CRMIN)

Departamento da criança e adolescente (DCA)

Serviço de Pediatria - Unidade de Infeciologia e Imunodeficiências

### **Equipa de investigação**

#### **Constituição**

##### *Aluna*

Sara Raquel Pereira Martins: aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica (DIIC) do Curso de Mestrado Integrado em Medicina (MIM) do ICBAS/UP.

##### *Orientadores do projeto*

Dra. Júlia Vasconcelos: médica, especialista em Patologia Clínica, assistente graduada em Imunologia, Serviço de Imunologia do CHP (orientadora).

Dra. Laura Marques: médica, assistente graduada em Pediatria, Serviço de Pediatria do CHP (coorientadora).

##### *Supervisor da DIIC*

Prof. Doutora Margarida Lima: médica, especialista Imunohemoterapeuta, assistente hospitalar graduada, Serviço de Hematologia Clínica do CHP; professora auxiliar convidada do ICBAS/UP; regente da DIIC.

##### *Outros investigadores*

Dra. Carla Teixeira: médica, especialista em Pediatria, assistente hospitalar graduada em Pediatria, Serviço de Pediatria do CHP.

Dra. Margarida Guedes: médica, especialista em Pediatria, assistente hospitalar graduada em Pediatria, Serviço de Pediatria do CHP.

Funções e responsabilidades

- A conceção e elaboração da proposta e a execução do projeto são da responsabilidade da aluna;
- As orientadoras acompanharão a aluna na elaboração de proposta, na execução do projeto e na análise e interpretação dos resultados;
- A regente da DIIC supervisionará todas as fases do projeto, desde a sua conceção até à apresentação dos resultados, passando pela sua execução e análise/interpretação dos dados;
- Os restantes investigadores colaborarão em aspetos específicos do projeto, conforme especificado adiante.

Tempo dedicado ao projeto

Nome e apelido	Função	% Tempo de dedicado ao projeto	Nº de meses	Pessoas * mês
Sara Martins	Aluna	20,0	11	2,20
Júlia Vasconcelos	Orientadora	5,0	11	0,55
Laura Marques	Coorientadora	5,0	11	0,55
Margarida Lima	Supervisora	5,0	11	0,55
Carla Teixeira	Colaboradora	2,5	4	0,10
Margarida Guedes	Colaboradora	1,0	4	0,04
Total				3,99

Condições e motivações para a realização do estudo

*Capacidades instaladas e recursos disponíveis*

A recolha de informação dos processos clínicos e sua anonimização serão efetuadas por médicas pediatras (Dra. Laura Marques e Dra. Margarida Guedes), no Serviço de Pediatria do CHP.

As colheitas sanguíneas dos doentes e controlos para as análises de investigação serão feitas aquando da realização das análises de seguimento das crianças com a deleção e das análises de pré-operatório dos controlos e, portanto, pelos mesmos responsáveis e nas mesmas instalações em que sempre foram realizadas.

As análises de investigação serão feitas no Serviço de Imunologia do CHP, pelos mesmos profissionais e nas mesmas instalações em que são diariamente executadas as outras análises realizadas no Serviço de Imunologia.

*Mérito da equipa de investigação*

A orientadora (Dra. Júlia Vasconcelos), enquanto especialista em Patologia Clínica do Serviço de Imunologia do CHP, tem vasta experiência no que trata a análises imunológicas, nomeadamente as realizadas para estudo de doenças autoimunes e de imunodeficiências, incluindo as análises de rotina de crianças com SD22q11, encontrando-se portanto familiarizada com os procedimentos a realizar e a interpretação de resultados. Estando integrada num serviço com forte ligação à investigação, já colaborou anteriormente na realização de estudos clínicos.

A coorientadora (Dra. Laura Marques) coordena a Unidade de Infeciologia e Imunodeficiências do Serviço de Pediatria do CHP e é responsável pelo acompanhamento de crianças com SD22q11 seguidas no serviço de pediatria deste hospital, conhecendo assim não só a patologia em si como também as próprias crianças e a sua família. Como docente do ICBAS, participou e orientou estudos anteriores relacionados com a área de Pediatria.

A colaboradora Dra. Carla Teixeira participou num estudo clínico prévio do Serviço de Imunologia do CHP, no qual era também responsável pela colheita de análises sanguíneas de controlos, estando assim ambientada quer com a equipa quer com procedimentos a realizar.

A colaboradora Dra. Margarida Guedes, como médica pediatra, tem a seu cargo o seguimento de doentes com SD22q11 seguidos no Serviço de Pediatria do CHP, sendo como tal conhecedora quer da patologia, quer das crianças em estudo e da sua família.

*Motivações pessoais para a realização do estudo*

A integração num estudo de investigação sempre me interessou, por curiosidade e desejo de compreender como se planeiam, organizam e processam este tipo de trabalhos, uma vez que considero a investigação uma área particularmente importante e atraente da ciência. A Imunologia, por sua vez, foi também desde o primeiro contato uma área de fascínio para mim, pela sua associação entre complexidade e lógica. Desta forma, vi neste projeto uma oportunidade de adquirir várias competências (que vão desde o desenho de um estudo até à interpretação dos seus resultados, passando pela compreensão das questões de ética e financeiras e a articulação com toda uma equipa) que considero importantíssimas na minha formação quer como aluna, como futura trabalhadora na área da ciência e em particular como futura médica, tendo a oportunidade de o fazer numa área que gosto e num tema cuja investigação é de facto pertinente. Para além do referido tenho também interesse em trabalhar este projeto como tese de mestrado.

## **Metodologia**

### **Revisão da literatura**

A revisão foi feita através de artigos entregues pela orientadora e da pesquisa em bases de dados bibliográficas eletrónicas, nomeadamente PubMed, SciVerse, Springer, B-On e Scopus. Na pesquisa foram incluídos artigos de revisão, artigos originais e ensaios clínicos escritos em inglês. Foram utilizadas palavras-chave como: 22q11 deletion syndrome; DiGeorge syndrome; 22q11 deletion autoimmunity; 22q11 deletion immunodeficiency; 22q11 deletion clinical features; 22q11 deletion T cell; 22q11 deletion B cell; 22q11 deletion T naïve ou 22q11 Th17. Frequentemente, as referências dos próprios artigos funcionaram também como fonte de bibliografia.

### **Desenho do estudo**

#### Tipo de estudo

Estudo de investigação clínica, nacional e institucional de carácter analítico, observacional, transversal, de tipo caso-controlo e de âmbito clínico e laboratorial.

#### Universo, população e amostra

##### *Universo*

Crianças com deleção 22q11.

##### *População*

Crianças com deleção 22q11 seguidas na consulta de Pediatria do CHP.

##### *Amostra*

Método de amostragem: não aleatória, por conveniência (consecutiva).

Tamanho pretendido: cerca de 15 doentes e número semelhante de controlos.

#### Seleção dos participantes

Doentes: Serão seleccionadas as crianças com deleção 22q11 que frequentem a consulta de Pediatria do CHP entre março e junho de 2013.

Controlos: Serão seleccionadas crianças internadas no serviço de Pediatria do CHP para realização de procedimento cirúrgico programado, entre março e junho de 2013, e cuja idade e sexo sejam emparelhados em relação aos doentes.

### Critérios de elegibilidade

#### *Critérios de inclusão*

Doentes: seguimento na Consulta de Pediatria do CHP; frequência da consulta entre março e junho 2013; obtenção de forma livre e esclarecida do consentimento informado por parte dos responsáveis legais.

Controlos: internamento no Serviço de Pediatria do CHP para realização de procedimento cirúrgico entre março e junho de 2013; distribuição por idade e sexo semelhante à dos doentes; obtenção de forma livre e esclarecida do consentimento informado por parte dos responsáveis legais.

#### *Critérios de exclusão*

Doentes: sem critérios de exclusão.

Controlos: patologias que curse com alterações imunológicas.

### **Plano de trabalho**

#### Tarefas associadas ao projeto

#### *Lista de tarefas*

Durante a execução do projeto estão previstas as seguintes tarefas:

<b>Nº da tarefa</b>	<b>Designação da tarefa</b>	<b>Data de início</b>	<b>Data de conclusão</b>
1	Informar os representantes legais dos doentes e dos controlos	03/2013	06/2013
2	Colheita sanguínea aos doentes e aos controlos	03/2013	06/2013
3	Recolha de informação clínica	03/2013	06/2013
4	Execução das análises laboratoriais	03/2013	06/2013
5	Análise dos dados e interpretação dos resultados	03/2013	06/2013

*Descrição das tarefas*

Tarefa 1: Informar os representantes legais dos doentes e dos controlos	
Duração:	4 meses
Data prevista para o início e conclusão:	03/2013 - 06/2013
Departamentos e Serviços:	Departamento da Criança e do Adolescente, Serviço de Pediatria.
Objetivos:	Informar os representantes legais acerca do estudo e obter o consentimento informado.
Descrição:	Informar, em linguagem clara e compreensível, os representantes legais acerca dos objetivos do estudo, riscos e condições para a participação. Fornecer a folha de informação e o consentimento.
Investigadores envolvidos:	Laura Marques; Margarida Guedes – Doentes Carla Teixeira – Controlos

Tarefa 2: Colheita sanguínea aos doentes e aos controlos	
Duração:	4 meses
Data prevista para o início e conclusão	03/2013 – 06/2013
Instituições, Departamentos e Serviços:	Departamento da Criança e do Adolescente, Serviço de Pediatria.
Objetivos:	Obtenção de colheita de sangue para caracterização das alterações imunológicas.
Descrição:	Colheita de cerca de 5 ml de sangue periférico: 2 mL em tubo siliconado e 3ml em EDTA; envio para o Serviço de Imunologia.
Colaboradores envolvidos:	Equipa de enfermagem do Serviço de Pediatria.

Tarefa 3: Recolha de informação clínica	
Duração:	4 meses
Data prevista para o início e conclusão	03/2013 – 06/2013
Instituições, Departamentos e Serviços:	Departamento da Criança e do Adolescente, Serviço de Pediatria.
Objetivos:	Obtenção de informação clínica e laboratorial dos doentes.
Descrição:	Recolha de informação clínica e laboratorial dos processos das crianças utilizando o formulário em anexo.
Investigadores envolvidos:	Laura Marques; Margarida Guedes.

Tarefa 4: Execução das análises laboratoriais	
Duração:	4 meses
Data prevista para o início e conclusão:	03/2013 – 06/2013
Departamentos e Serviços:	Centro de responsabilidade de meios de apoio ao diagnóstico, Serviço de Imunologia.
Objetivos:	Conhecimento de valores laboratoriais atuais relativos ao sistema imune de crianças com deleção 22q11 e controlos.
Descrição:	Receber as amostras, proceder às análises laboratoriais, registar os seus resultados.
Investigadores envolvidos:	Júlia Vasconcelos; Sara Raquel Pereira Martins Colaboração dos técnicos do Serviço de Imunologia

Tarefa 5: Análise dos dados e interpretação dos resultados	
Duração:	4 meses
Data prevista para o início e conclusão:	03/2013 – 06/2013
Departamentos e Serviços:	-
Objetivos:	Registo informático dos dados clínicos e laboratoriais e posterior análise
Descrição:	Formação de uma base de dados em ficheiro Excel para reunião e organização da informação clínica e laboratorial, obtida através do preenchimento do formulário e das análises clínicas; tratamento estatístico dos dados; interpretação dos resultados.
Investigadores envolvidos:	Sara Raquel Pereira Martins Júlia Vasconcelos; Laura Marques

## **Material e métodos**

### **Instrumentos de recolha de dados**

A recolha de dados será feita através de formulário de recolha de dados clínicos e laboratoriais, apresentado em anexo.

### **Procedimentos técnicos**

**Será feito o seguinte estudo analítico:**

- Hemograma no contador hematológico automático;
- Doseamento de imunoglobulinas (IgG, IgA, IgM) por método imunoturbidimétrico;
- Quantificação das subpopulações linfocitárias, analisadas por citometria de fluxo: linfócitos T (CD3+), linfócitos T CD4 (CD3+CD4+), linfócitos T CD8 (CD3+CD8+), linfócitos B (CD19+) e células NK (CD3- / CD16 e/ou CD56+);

- Quantificação de células T CD4 ou CD8 *naïve* ou virgens (CD45RA+ nos linfócitos T CD4+ ou nos linfócitos T CD8+) e de memória/previamente ativadas (CD45RO+ nos linfócitos T CD4+ ou nos linfócitos T CD8+);
- Quantificação de células T CD4 recentemente emigradas do timo (CD31+/CD45RA+ nos linfócitos T CD4+);
- Quantificação de células B de memória, *unswitched* (CD27<sup>+</sup>/IgD<sup>+</sup> nos linfócitos B CD19+) e *switched* (CD27<sup>+</sup>/IgD<sup>-</sup> nos linfócitos B CD19+).

O estudo será feito no Serviço de Imunologia do CHP, de acordo com os procedimentos habitualmente utilizados, sendo o doseamento de imunoglobulinas efetuado por método imunoturbidimétrico e o estudo das populações linfocitárias por citometria de fluxo.

A quantificação de células T recentemente emigradas do timo e de células B de memória, *switched* e *unswitched* serão análises de investigação. As restantes análises integram o protocolo de estudo destes doentes, em vigor no CHP.

#### Equipamento

<b>Tipo de equipamento</b>	<b>Local</b>
Citómetro de fluxo (EPICS-XL-MCL, Coulter)	Serviço de Imunologia do CHP
Centrífugas e outro equipamento de laboratório	Serviço de Imunologia do CHP

#### Reagentes

<b>Finalidade do reagente</b>	<b>Linfócitos e populações linfocitárias T (CD4 e CD8), B e NK</b>	<b>Subpopulações linfocitárias</b>
Anticorpos monoclonais para imunofenotipagem por citometria de fluxo (anticorpos monoclonais)	anti-CD45	anti-CD45RA (*)
	anti-CD3	anti-CD45RO
	anti-CD8	anti-CD31 (*)
	anti-CD4	anti-CD27 (*)
	anti-CD19	anti-IgD (*)
	anti-CD16 + CD56	
(*) Necessários para as análises de investigação (quantificação das células T recentemente emigradas do timo, e células B de memória <i>switched</i> e <i>unswitched</i> )		

#### Análise de dados

Para além de análise estatística descritiva (medidas de distribuição central e medidas de dispersão; frequências absolutas e relativas), será avaliada a correlação entre os diversos parâmetros clínicos e imunológicos em estudo. Para a análise estatística dos dados será utilizado o *SPSS*® (Statistical Package for the Social Sciences).

## Calendarização

### Duração

Global: 12 meses

Planeamento: 6 meses.

Execução: 6 meses.

### Datas de início e conclusão

Global: setembro de 2012 a agosto de 2013

Planeamento: setembro de 2012 a março de 2013

Execução: março de 2013 a agosto de 2013

### Cronograma

Mês	ANO LETIVO 2012/2013												ANO LETIVO 2013/2014									
	09	10	11	12	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	01	02	03	04	05	06
Escolha da área	X	X																				
Integração equipa		X																				
Escolha tema e assunto		X	X																			
Identificação problemas				X	X	X																
Formulação questões				X	X	X																
Delineamento hipóteses				X	X	X																
Definição objetivos				X	X	X																
Revisão bibliográfica				X	X	X																
Conceção estudo				X	X	X	X															
Redação proposta	X	X	X	X	X	X	X															
Submissão proposta							X															
Apresentação proposta										X												
Execução projeto							X	X	X	X												
Análise resultados											X	X										
Apresentação resultados																						X
Prova dissertação MIM																						X

Metas a atingir no âmbito do projeto (*milestones*)

- Finalização da proposta do projeto – março 2013
- Finalização das colheitas sanguíneas de doentes e controlos – junho 2013
- Finalização da recolha de dados clínicos – junho 2013
- Finalização da base de dados – junho 2013
- Finalização da análise dos dados – agosto 2013

Entregas a efetuar no âmbito do projeto (*deliverables*)

- Entrega da proposta do projeto – março 2013
- Entrega dos resultados e sua análise – agosto 2013
- Entrega da dissertação de MIM – junho 2014

## **Indicadores de produção**

**Comunicações orais e posters**

- Apresentação oral da proposta nas JIIC – junho de 2013
- Apresentação oral dos resultados nas JIIC – junho 2014
- Defesa dissertação MIM – junho 2014

**Trabalhos escritos**

- Proposta de projeto de investigação (maio de 2013)
- Dissertação – MIM (junho de 2014)

## Referências bibliográficas

1. Devriendt K, Fryns JP, Mortier G, van Thienen MN, Keymolen K. The annual incidence of DiGeorge/velocardiofacial syndrome. *J Med Genet*, 1998;35(9):789-90. PMID: 9733045.
2. Kobrynski LJ, Sullivan KE. Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *Lancet*. 2007;370(9596):1443-52. PMID: 17950858.
3. Perez E, Sullivan KE. Chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge and velocardiofacial syndromes). *Curr Opin Pediatr*, 2002;14:678-83. PMID: 12436034.
4. Edelmann L, Pandita RK, Morrow BE. Low-Copy Repeats Mediate the Common 3-Mb Deletion in Patients with Velo-cardio-facial Syndrome. *Am J Hum Genet*. 1999;64(4):1076-86. PMID: 10090893.
5. Lindsay EA1, Botta A, Jurecic V, Carattini-Rivera S, Cheah YC, Rosenblatt HM, Bradley A, Baldini A. Congenital heart disease in mice deficient for the DiGeorge syndrome region. *Nature*, 1999;401(6751): 379-83. PMID: 10517636.
6. Guris DL1, Fantes J, Tara D, Druker BJ, Imamoto A. Mice lacking the homologue of the human 22q11.2 gene CRKL phenocopy neurocristopathies of DiGeorge syndrome. *Nat Genet*. 2001;27(3):293-8. PMID: 11242111.
7. Mastroiacovo P, Rossi P, Cancrini C, Azzari C, DiGilio MC, Marino B, et al. Chromosome 22q.11 deletion - Recommendations for Diagnosis and Treatment. Italian Primary Immunodeficiencies Strategic Scientific Committee, 2005.
8. Thomas JA, Graham JM Jr. Chromosomes 22q11 deletion syndrome: an update and review for the primary pediatrician. *Clin Pediatr (Phila)* 1997;36(5):253-66. PMID: 9152551.
9. Swillen A, Vogels A, Devriendt K, Fryns JP. Chromosome 22q11 deletion syndrome: update and review of the clinical features, cognitive-behavioral spectrum, and psychiatric complications. *Am J Med Genet* 2000; 97(2):128-35. PMID: 11180220.
10. Sullivan KE, Jawad AF, Randall P, Driscoll DA, Emanuel BS, McDonald-McGinn DM, Zackai EH. Lack of Correlation between Impaired T Cell Production, Immunodeficiency, and Other Phenotypic Features in Chromosome 22q11.2 Deletion Syndromes (DiGeorge Syndrome/Velocardiofacial Syndrome). *Clin Immunol Immunopathol* 1998;86(2):141-6. PMID: 9473376.
11. Sullivan KE, McDonald-McGinn D, Driscoll DA, Emanuel BS, Zackai EH, Jawad AF. Longitudinal analysis of lymphocyte function and numbers in the first year of life in chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *Clin Diagn Lab Immunol*, 1999;6(6): 906-11. PMID: 10548584.
12. Sedivá A, Bartůnková J, Zachová R, Poloucková A, Hrusák O, Janda A, Kocárek E, Novotná D, Novotná K, Klein T. Early development of immunity in diGeorge syndrome. *Med Sci Monit*. 2005;11(4):CR182-7. PMID: 15795698.
13. McLean-Tooke A, Barge D, Spickett GP, Gennery AR. Immunologic defects in 22q11.2 deletion syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122(2):362-7, 367 e1-4. PMID: 18485468.
14. Chien YH, Yang YH, Chu SY, Hwu WL, Kuo PL, Chiang BL. DiGeorge sequence with hypogammaglobulinemia: a case report. *J Microbiol Immunol Infect* 2002;35(3):187-90. PMID: 12380793.
15. Gennery AR, Barge D, O'Sullivan JJ, Flood TJ, Abinun M, Cant AJ. Antibody deficiency and autoimmunity in 22q11.2 deletion syndrome. *Arch Dis Child* 2002;86(6):422-5. PMID: 12023174.

16. Smith CA, Driscoll DA, Emanuel BS, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Sullivan KE. Increased prevalence of immunoglobulin A deficiency in patients with the chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *Clin Diagn Lab Immunol*, 1998;5(3):415-7. PMID: 9606003.
17. Patel K, Akhter J, Kobrynski L, Benjamin Gathmann MA, Davis O, Sullivan KE; International DiGeorge Syndrome Immunodeficiency Consortium. Immunoglobulin Deficiencies: The B-Lymphocyte Side of DiGeorge Syndrome. *J Pediatr* 2012;161(5):950-3. PMID: 22809661.
18. Jawad AF, McDonald-McGinn DM, Zackai E, Sullivan KE. Immunologic features of chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *J Pediatr* 2001;139(5): 715-23. PMID: 11713452.
19. Gennery AR. Immunological aspects of 22q11.2 deletion syndrome. *Cell Mol Life Sci* 2012;69(1):17-27. PMID: 21984609.
20. Davies JK, Telfer P, Cavenagh JD, Foot N, Neat M. Autoimmune cytopenias in the 22q11.2 deletion syndrome. *Clin Lab Haematol* 2003;25(3):195-7. PMID: 12755799.
21. Sullivan KE, McDonald-McGinn DM, Driscoll DA, Zmijewski CM, Ellabban AS, Reed L, Emanuel BS, Zackai EH, Athreya BH, Keenan G. Juvenile rheumatoid arthritis-like polyarthritis in chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge anomaly/velocardiofacial syndrome/conotruncal anomaly face syndrome). *Arthritis Rheum* 1997;40(3):430-6. PMID: 9082929.
22. Brown JJ, Datta V, Browning MJ, Swift PG. Graves' disease in DiGeorge syndrome: patient report with a review of endocrine autoimmunity associated with 22q11.2 deletion. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2004;17(11):1575-9. PMID: 15570997.
23. McLean-Tooke A, Spickett GP, Gennery AR. Immunodeficiency and autoimmunity in 22q11.2 deletion syndrome. *Scand J Immunol* 2007;66(1):1-7. PMID: 17587340.
24. Zemble R, Luning Prak E, McDonald K, McDonald-McGinn D, Zackai E, Sullivan K. Secondary immunologic consequences in chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *Clin Immunol* 2010;136(3):409-18. PMID: 20472505.
25. Sullivan KE, McDonald-McGinn D, Zackai EH. CD4(+) CD25(+) T-cell production in healthy humans and in patients with thymic hypoplasia. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9(5):1129-31. PMID: 12204972.
26. Emanuel BS, McDonald-McGinn D, Saitta SC, Zackai EH. The 22q11.2 deletion syndrome. *Adv Pediatr*, 2001. 48: p. 39-73. PMID: 11480765.
27. Bassett AS, Chow EW, Husted J, Weksberg R, Caluseriu O, Webb GD, Gatzoulis MA. Clinical features of 78 adults with 22q11 Deletion Syndrome. *Am J Med Genet A* 2005;138(4):307-13. PMID: 16208694.
28. Wilson DI, Burn J, Scambler P, Goodship J. DiGeorge syndrome: part of CATCH 22. *J Med Genet* 1993;30(10):852-6. PMID: 8230162
29. Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI, Philip N, Levy A, Seidel H, Schuffenhauer S, Oechsler H, Belohradsky B, Prieur M, Aurias A, Raymond FL, Clayton-Smith J, Hatchwell E, McKeown C, Beemer FA, Dallapiccola B, Novelli G, Hurst JA, Ignatius J, Green AJ, Winter RM, Brueton L, Brøndum-Nielsen K, Scambler PJ, et al. Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. *J Med Genet* 1997;34(10):798-804. PMID: 9350810.
30. Chinen J, Rosenblatt HM, Smith EO, Shearer WT, Noroski LM. Long-term assessment of T-cell populations in DiGeorge syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111(3):573-9. PMID: 12642839.

31. Oliveira Manuel et al. Caracterização das infecções em doentes com Síndrome de deleção 22q11.2. *Nascer e Crescer* 2013;22:8-11. ISSN 0872-0754.
32. Piliero LM, Sanford AN, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Sullivan KE. T-cell homeostasis in humans with thymic hypoplasia due to chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Blood*, 2004;103(3):1020-5. PMID: 14525774.
33. Finocchi A, Di Cesare S, Romiti ML, Capponi C, Rossi P, Carsetti R, Cancrini C. Humoral immune responses and CD27+ B cells in children with DiGeorge syndrome (22q11.2 deletion syndrome). *Pediatr Allergy Immunol*, 2006;17(5):382-8. PMID: 16846458.
34. Jacquot S, Maçon-Lemaître L, Paris E, Kobata T, Tanaka Y, Morimoto C, Schlossman SF, Tron F. B cell correceptors regulating T cell-dependent antibody production in common variable immunodeficiency: CD27 pathway defects identify subsets of severely immuno-compromised patients. *Int Immunol* 2001;13(7): 871-6. PMID: 11431417.
35. Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* 2002;298(5601):2199-202. PMID: 12481138.
36. Kruetzmann S, Rosado MM, Weber H, Germing U, Tournilhac O, Peter HH, Berner R, Peters A, Boehm T, Plebani A, Quinti I, Carsetti R. Human immunoglobulin M memory B cells controlling *Streptococcus pneumoniae* infections are generated in the spleen. *J Exp Med* 2003;197(7):939-45. PMID: 12682112.
37. Warnatz K, Denz A, Dräger R, Braun M, Groth C, Wolff-Vorbeck G, Eibel H, Schlesier M, Peter HH. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+)IgM(-)IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood* 2002;99(5):1544-51. PMID: 11861266
38. Aghamohammadi A, Abolhassani H, Biglari M, Abolmaali S, Moazzami K, Tabatabaeiyan M, Asgarian-Omran H, Parvaneh N, Mirahmadian M, Rezaei N. Analysis of switched memory B cells in patients with IgA deficiency. *Int Arch Allergy Immunol* 201;156(4):462-8. PMID: 21832837.
39. Kamradt T, Goggel R, Erb JR. Induction, exacerbation and inhibition of allergic and autoimmune diseases by infection. *Trends Immunol* 2005;26(5):260-7. PMID: 15866239
40. Dejaco C, Duftner C, Grubeck-Loebenstien B, Schirmer M. Imbalance of regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Immunology* 2006;117(3): 289-300. PMID: 16476048.
41. Marwaha AK, Leung NJ, McMurchy AN, Levings MK. TH17 Cells in Autoimmunity and Immunodeficiency: Protective or Pathogenic? *Front Immunol*, 2012;3:129. PMCID: PMC3366440.

## **Questões éticas**

## **Informação dos participantes e consentimento informado**

### **Informação dos participantes**

Os participantes e/ou seus representantes legais serão informados acerca dos objetivos do estudo e benefícios e riscos da sua participação pelo médico assistente. Será entregue aos representantes legais um folheto informativo que se encontra em anexo.

### **Consentimento informado**

A assinatura do termo de consentimento informado, anexado no final do projeto, será solicitada pelo médico assistente aos representantes legais dos pacientes.

## **Outras questões com implicações éticas**

### **Riscos e benefícios**

A criança será exposta apenas aos riscos associados a uma colheita de sangue comum.

Ao permitir um melhor conhecimento dos aspetos clínicos este estudo poderá trazer o benefício de facilitar o diagnóstico de casos futuros. Para além disso, ao caracterizar as alterações do sistema imune e a sua relação com a clínica, poderá abrir portas a um melhor acompanhamento e tratamento destes pacientes, melhorando a sua qualidade de vida.

### **Confidencialidade e anonimização**

A confidencialidade dos dados será garantida aos participantes e/ou representantes legais

O registo dos dados clínicos e laboratoriais será feito de forma anonimizada, ficando a chave de cruzamento na posse das orientadoras.

## **Plano financeiro**

## Orçamento

Não serão efetuadas consultas ou internamentos especificamente no âmbito do projeto. As colheitas de sangue serão realizadas nas consultas de seguimento dos doentes.

	Custo estimado (€)
Reagentes e material consumível de laboratório	2.000,00
Material administrativo (fotocópias, folhas, etc.)	0,00
Contratação de serviços	0,00
Pagamento de despesas aos participantes (deslocações)	0,00
Exames realizados no CHP (análises e outros meios complementares)	0,00
Taxas moderadoras de episódios (consultas, internamentos, etc.)	0,00
Taxas moderadoras de exames (análises, exames de imagem, etc.)	0,00
Impressão de poster para apresentação de resultados	50,00
Inscrição aluno em congresso médico	200,00
Organização das Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica	50,00
<b>TOTAL</b>	<b>2.300,00</b>

## Financiamento

O estudo será financiado pelo ICBAS/UP, através de uma bolsa atribuída à DIIC.

**LISTA DE ANEXOS**

- Termos de consentimento informado (representantes legais e dadores de sangue)
- Folhetos informativos (representantes legais e dadores de sangue)
- Formulários de recolha de dados clínicos e laboratoriais

## Termos de consentimento informado

### Termo de consentimento informado (para doentes)

#### Aspetos Clínicos e Imunológicos numa População Pediátrica com Deleção 22q11

Disciplina de Introdução a Investigação Clínica

Eu, abaixo-assinado \_\_\_\_\_ (NOME COMPLETO),  
e \_\_\_\_\_ (NOME COMPLETO)  
na qualidade de representante legal de \_\_\_\_\_ (NOME COMPLETO).

Fui informado de que o Estudo de Investigação acima mencionado se destina a melhorar a compreensão das alterações clínicas e imunitárias das crianças com deleção 22q11, assim como colocar hipóteses para a maior incidência de infeções e autoimunidade nesta população.

Sei que neste estudo está prevista a recolha de informação dos processos clínicos e colheita de uma amostra de sangue. Sei que uma parte do sangue vai ser utilizada de imediato para fazer algumas análises e que outra parte vai ser armazenada para realizar posteriormente outras análises que fazem parte deste estudo.

Foi-me garantido que todos os dados relativos à identificação dos Participantes são confidenciais.

Sei que posso recusar-me a autorizar a participação ou interromper a qualquer momento a participação no estudo, sem nenhum tipo de penalização por este facto.

Compreendi a informação que me foi dada, tive oportunidade de fazer perguntas e as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Autorizo de livre vontade a participação daquele que legalmente represento no estudo acima mencionado.

Concordo que seja feita a colheita de sangue para realizar as análises que fazem parte deste estudo.

Também autorizo a divulgação dos resultados obtidos no meio científico, garantindo o anonimato.

Nome do Representante Legal do Participante no estudo

Data	Assinatura
__/__/__	_____
Data	Assinatura
__/__/__	_____

Nome do Médico Responsável

Data	Assinatura
__/__/__	_____

**Termo de consentimento informado (para controlos)**

**Aspetos Clínicos e Imunológicos numa População Pediátrica com Deleção 22q11**

Disciplina de Introdução a Investigação Clínica

Eu, abaixo-assinado \_\_\_\_\_ (NOME COMPLETO),  
e \_\_\_\_\_ (NOME COMPLETO)  
na qualidade de representante legal de \_\_\_\_\_ (NOME COMPLETO).

Fui informado de que o Estudo de Investigação acima mencionado se destina a melhorar a compreensão das alterações clínicas e imunitárias das crianças com deleção 22q11, assim como colocar hipóteses para a maior incidência de infeções e autoimunidade nesta população.

Sei que neste estudo está prevista a colheita de uma amostra de sangue. Sei que uma parte do sangue vai ser utilizada de imediato para fazer algumas análises e que outra parte vai ser armazenada para ser utilizada posteriormente, para realizar as análises que fazem parte deste estudo.

Foi-me garantido que todos os dados relativos à identificação dos Participantes são confidenciais.

Sei que posso recusar-me a autorizar a participação ou interromper a qualquer momento a participação no estudo, sem nenhum tipo de penalização por este facto.

Compreendi a informação que me foi dada, tive oportunidade de fazer perguntas e as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Autorizo de livre vontade a participação daquele que legalmente represento no estudo acima mencionado.

Concordo que seja feita a colheita de sangue para realizar as análises que fazem parte deste estudo.

Também autorizo a divulgação dos resultados obtidos no meio científico, garantindo o anonimato.

Nome do Representante Legal do Participante no estudo

Data	Assinatura
__/__/__	_____

Data	Assinatura
__/__/__	_____

Nome do Médico Responsável

Data	Assinatura
__/__/__	_____

## **Folheto informativo sobre o estudo**

### **Informação sobre o estudo (para doentes)**

Existe um conjunto de doenças que têm em comum entre si uma alteração genética: a deleção da região q11 do cromossoma 22. Os pacientes com esta alteração apresentam uma grande variabilidade de manifestações clínicas, sendo um dos objetivos deste estudo compreender quais são as características clínicas mais frequentes. Para além disso é comum que nestes casos ocorram alterações do sistema imune (mecanismos pelos quais um organismo se defende de invasores externos), com maior incidência de autoimunidade (doenças em que há uma desregulação do sistema imune, levando a que este, em vez de atuar sobre o que é estranho no organismo, causa dano sobre si próprio) e infeções. No entanto, desconhece-se ao certo quais são as causas destas. Assim, outro objetivo desta investigação é caracterizar as alterações imunes associadas a esta patologia e tentar compreender de que forma podem levar à clínica dos pacientes.

Para isto será necessário proceder à análise dos processos clínicos, que permitirão a recolha de dados relativos à idade, sintomatologia e exames prévios da criança; bem como à execução de uma colheita de sangue, para realizar algumas análises. A colheita será uma amostra de sangue periférico (cerca de 5 ml: 2 mL em tubo siliconado, 3mL em EDTA), e não será utilizada para estudo genético. Os dados recolhidos do processo e os resultados dessas análises serão mantidos em confidencialidade, sendo a criança apenas exposta aos riscos associados a uma colheita de sangue comum.

Ao permitir um melhor conhecimento dos aspetos clínicos este estudo poderá trazer o benefício de facilitar o diagnóstico de casos futuros. Para além disso, ao caracterizar as alterações do sistema imune e hipotizar a sua relação com a clínica, poderá abrir portas a um melhor acompanhamento e tratamento destes doentes, melhorando a sua qualidade de vida.

Agradecemos a sua participação e estamos à disposição para esclarecer as suas dúvidas.

Sara Raquel Martins, aluna do Mestrado Integrado em Medicina.

Júlia Vasconcelos, médica patologista clínica, Orientadora.

Laura Marques, médica pediatra, Coorientadora.

### **Informação sobre o estudo (para controlos)**

Existe um conjunto de doenças que têm em comum entre si uma alteração genética: a deleção da região q11 do cromossoma 22. Os pacientes com esta alteração apresentam uma grande variabilidade de manifestações clínicas, sendo um dos objetivos deste estudo compreender quais são as características clínicas mais frequentes. Para além disso é comum que nestes casos ocorram alterações do sistema imune (mecanismos pelos quais um organismo se defende de invasores externos), com maior incidência de autoimunidade (doenças em que há uma desregulação do sistema imune, levando a que este, em vez de atuar sobre o que é estranho no organismo, causa dano sobre si próprio) e infeções. No entanto desconhece-se ao certo quais são as causas destas. Assim, outro objetivo desta investigação é caracterizar as alterações imunes associadas a esta patologia e tentar compreender de que forma podem levar à clínica dos pacientes.

Para realizar este estudo é necessário comparar os resultados das análises das crianças doentes com os resultados das mesmas análises feitas em crianças sem essa doença.

Por isso, pedimos que autorize a colheita de uma amostra de sangue do (a) seu (sua) filho (a). A colheita será uma amostra de sangue periférico (cerca de 5 ml: 2 mL em tubo siliconado e 3mL em EDTA), e não será utilizada para estudo genético. Os resultados dessas análises serão mantidos em confidencialidade, sendo a criança apenas exposta aos riscos associados a uma colheita de sangue comum.

Ao permitir um melhor conhecimento dos aspetos clínicos este estudo poderá trazer o benefício de facilitar o diagnóstico de casos futuros. Para além disso, ao caracterizar as alterações do sistema imune e hipotizar a sua relação com a clínica, poderá abrir portas a um melhor acompanhamento e tratamento destes doentes, melhorando a sua qualidade de vida.

Agradecemos a sua colaboração e estamos à disposição para esclarecer as suas dúvidas.

Sara Raquel Martins, aluna do Mestrado Integrado em Medicina.

Júlia Vasconcelos, médica patologista clínica, Orientadora.

Laura Marques, médica pediatra, Coorientadora.

## Formulário de recolha de informação clínica e laboratorial

Código: \_\_\_\_\_

Género:  Feminino  Masculino Data nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Data diagnóstico: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Hospital: \_\_\_\_\_

Presença de sintomas:  Sim  Não

### Dismorfias:

- Hipertelorismo
- Redundância pálpebras superiores
- Fenda palpebral estreita
- Aumento altura do nariz
- Aumento da largura da base nasal
- Diminuição distância nasolabial

- Palato alto
- Boca pequena
- Retrognatismo
- Sobredobramento da hélice
- Outro: \_\_\_\_\_

### Cardiopatias:

- Interrupção arco aórtico tipo B
- Tetralogia de Fallot
- Defeito do septo interventricular
- Persistência do tronco arterial

- Atresia pulmonar
- Anomalia do arco aórtico isolada
- Outro: \_\_\_\_\_

### Anomalias gastrointestinais:

- Refluxo gastroesofágico
- Atresia esofágica
- Esofagite
- Atresia anal

- Hérnia diafragmática
- Obstipação crónica
- Megacolon congénito
- Outro: \_\_\_\_\_

### Anomalias ORL:

- Fenda palatina
- Fissura palatina submucosa
- Insuficiência velofaríngea
- Hipoacusia
- Anomalias canal auditivo externo

- Laringomalácia
- Estenose ou atresia das coanas
- Fístulas ou apêndices pré-auriculares
- Outro: \_\_\_\_\_

### Anomalias neuropsiquiátricas:

- Atraso da linguagem
- Atraso desenvolvimento motor

- Dificuldades de aprendizagem
- Outro: \_\_\_\_\_

### Anomalias renais:

- Agenesia/displasia renal
- Obstrução

- Refluxo
- Outro: \_\_\_\_\_

### Principal patologia infecciosa:

- Otite
- Bronquiolite
- Sinusite
- Pneumonia
- Candidíase

- Gastroenterite
- Osteomielite
- Meningite
- Abscesso
- Outro: \_\_\_\_\_

### Patologia autoimune:

- Artrite reumatoide
- Trombocitopenia
- Tireopatia
- Anemia autoimune
- Hepatite
- Outro: \_\_\_\_\_

Código: \_\_\_\_\_

**Exames no diagnóstico:**

Hemograma:

Hemoglobina \_\_\_\_\_ (g/dl)

Plaquetas \_\_\_\_\_ (/mm<sup>3</sup>)

Leucócitos \_\_\_\_\_ (/mm<sup>3</sup>)

Neutrófilos \_\_\_\_\_ (%) \_\_\_\_\_ (/mm<sup>3</sup>)

Linfócitos \_\_\_\_\_ (%) \_\_\_\_\_ (/mm<sup>3</sup>)

Imunoglobulinas:

IgG \_\_\_\_\_ (mg/dl)

IgA \_\_\_\_\_ (mg/dl)

IgM \_\_\_\_\_ (mg/dl)

IgE \_\_\_\_\_ (mg/dl)

Populações linfocitárias:

Linfócitos T (CD3+) \_\_\_\_\_ (% Linfo)

Linfócitos T CD4 (CD3+/CD4+) \_\_\_\_\_ (% Linfo)

Linfócitos T CD8 (CD3+/CD8+) \_\_\_\_\_ (% Linfo)

Linfócitos B (CD19+) \_\_\_\_\_ (% Linfo)

Células NK (CD3-/CD16CD56+)

% Linfócitos T CD45RA+ \_\_\_\_\_ (% Linfo T)

% Linfócitos T CD45RO+ \_\_\_\_\_ (% Linfo T)

Ionograma:

Cálcio total \_\_\_\_\_ (mg/dl)

Fósforo \_\_\_\_\_ (mg/dl)

Ca<sup>++</sup>: \_\_\_\_\_ (mg/dl)

Endocrinologia

T3 \_\_\_\_\_ (ng/ml)

T4 \_\_\_\_\_ (ng/ml)

TSH \_\_\_\_\_ (mIU/l):

PTH \_\_\_\_\_ (pg/ml):

Autoanticorpos

ANA: \_\_\_\_\_

**Análise FISH 22q11**

---

## **Adenda**

- Folha de rosto de estudo de investigação
  
- Pedidos de autorização (Presidente do Conselho de Administração do CHP, Presidente da Comissão de Ética para a Saúde do CHP, Diretora do Departamento de Ensino, Formação e Investigação do CHP)
- Termos de responsabilidade (Aluno, Orientador, Regente da DIIC)
- Autorizações locais (Departamentos e Serviços do CHP envolvidos no projeto)

▪Lista de documentos para

**TRABALHOS ACADÉMICOS DE INVESTIGAÇÃO (que conferem grau)**

Documentos comprovativos	
Inscrição em Licenciatura, Mestrado ou Doutoramento	NA
Cartas do Aluno, a solicitar autorização institucional	
Presidente do Conselho de Administração	✓
Presidente da CES	✓
Diretor do DEFI	✓
Termos de responsabilidade de Alunos e Orientadores	
Aluno	✓
Orientador do Projeto	✓
Supervisor do Projeto, Docente responsável pela DIIC	✓
Termos de autorização local (no CHP)	
Responsáveis por Unidades / Gabinetes / Setores*	NA
Diretores de Serviço	✓
Diretores / Conselhos de Gestão de Departamentos	✓
Proposta	
Folha de Rosto do Estudo de Investigação (modelo próprio)	✓
Proposta de Trabalho Académico de Investigação	✓
Anexos	
Curriculum Vitae do Aluno	NA
Termo de Consentimento Informado e Informação ao doente	✓
Formulário de recolha de dados	✓

**SECRETARIADO:** Data de conclusão da entrega de documentação

Data  
 \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Assinatura  
 \_\_\_\_\_

## Folha de rosto do estudo de investigação

### TÍTULO

**ASPETOS CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS NUMA POPULAÇÃO PEDIÁTRICA COM DELEÇÃO 22Q11**

### CLASSIFICAÇÃO

Trabalho Académico de Investigação X (Mestrado Integrado em Medicina)

Projeto de Investigação X

Ensaio Clínico  Medicamentos  Dispositivos médicos

Outro  Qual?

### VERSÃO

Novo  Modificação / Adenda  Prolongamento

### CALENDARIZAÇÃO

Data início: março 2013

Data conclusão: junho 2013

Prazo a cumprir: março 2013

### ALUNOS E ORIENTADORES

#### Aluno

Sara Raquel Martins, aluna da Disciplina de Iniciação a Investigação Clínica, Mestrado Integrado em Medicina, ICBAS/UP; [sararaquelpm@gmail.com](mailto:sararaquelpm@gmail.com); 912379715

#### Orientador do projeto

Júlia Vasconcelos, médica, especialista em Patologia Clínica, assistente hospitalar graduada, Serviço de Imunologia do CHP; [juliamvasc@gmail.com](mailto:juliamvasc@gmail.com)

#### Coorientador do projeto

Laura Marques, médica, especialista em Pediatria, assistente hospitalar graduada, Serviço de Pediatria do CHP;

#### Supervisor do projeto / Responsável pela DIIC

Margarida Lima, médica, especialista em Imunohemoterapia, assistente hospitalar graduada, Serviço de Hematologia Clínica do CHP; [director.defi@hgsa.min-saude.pt](mailto:director.defi@hgsa.min-saude.pt); [mmc.lima@clix.pt](mailto:mmc.lima@clix.pt)  
TM 966 327 115

### OUTROS INVESTIGADORES E COLABORADORES

#### Consultora

Carla Teixeira: médica, especialista em Pediatria, assistente hospitalar graduada, Serviço de Pediatria do CHP

Margarida Guedes: médica, especialista em Pediatria, assistente hospitalar, Serviço de Pediatria do CHP

#### Colaboradores

Técnicos do Serviço de Imunologia do CHP.

**PROMOTOR** O próprio

### INSTITUIÇÕES E SERVIÇOS

#### Unidades, Departamentos e Serviço do CHP

Centro de Responsabilidade dos Meios de Apoio ao Diagnóstico (CRMAD); Serviço de Imunologia

Departamento da mulher e da criança (DMC); Serviço de Pediatria.

## CARACTERÍSTICAS do estudo

### Alvo do estudo:

Animais  Humanos

### Países / instituições envolvidos:

Multinacional  Nacional

Multicêntrico  Institucional

### Natureza do estudo:

Clínico  Terapêutico

Epidemiológico  Laboratorial

### Características do estudo (desenho):

Descritivo  Analítico

Observacional  Experimental

Transversal  Longitudinal

(Retrospectivo  Prospetivo )

Estudo de síntese  (Revisão narrativa  Revisão sistemática  Revisão sistemática com meta-análise )

### Participantes:

Existência de grupo controlo: Não  Sim

Seleção dos participantes: Aleatória  Não aleatória

### Estudos observacionais:

Tipo: Caso  Série de casos  Casos-controlos  Coortes  Outro

### Estudos experimentais (não aplicável)

Conhecimento: Aberto  Cego  (duplamente cego )

Ensaio Clínico: Fase I  Fase II  Fase III  Fase IV

### Outros aspetos relevantes para a apreciação do estudo:

Participação de grupos vulneráveis Não  Sim  (menores)

Convocação de doentes / participantes Não  Sim

Consentimento informado Não  Sim

Inquéritos / questionários Não  Sim

Contacto Investigadores Participantes: Não  Sim

Entrevistas Não  Sim

Colheita de produtos biológicos Não  Sim

Armazenamento de produtos biológicos Não  Sim

Criação de bancos de produtos biológicos Não  Sim

Realização de exames / análises Não  Sim

Realização de estudos genéticos Não  Sim

Recolha de dados Não  Sim

Clínicos  laboratoriais: analíticos  imagem

Criação de bases de dados Não  Sim  Ficheiro Excel anonimizado

Saída para outras instituições Não  Sim

## ORÇAMENTO E FINANCIAMENTO

Orçamento total: 2.300,00 euros Contrato financeiro em anexo: Não  Sim

Financiamento: Interno (CHP): 0,00 euros Externo (outros) 2.300,00 euros

Entidades financiadoras: ICBAS – Bolsa DIIC

## INDICADORES

Relatórios: de progresso  (periodicidade:) final

Outros  Quais? Dissertação de MIM.

Data:

Assinatura do proponente (aluno):

## **Pedidos de autorização institucional**

Trabalho académico de investigação: **Aspetos clínicos e imunológicos numa população pediátrica com deleção 22q11**

Aluna da DIIC do curso de MIM do ICBAS/UP e do CHP: **Sara Raquel Pereira Martins**

### **Presidente do Conselho de Administração do CHP**

Exmo. Senhor Presidente do Conselho de Administração do CHP

Sara Raquel Pereira Martins, na qualidade de aluna, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa. autorização para realizar no Centro Hospitalar do Porto o estudo de investigação acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data

Assinatura

\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

\_\_\_\_\_

### **Presidente da Comissão de Ética para a Saúde do CHP**

Exma. Senhora Presidente da Comissão de Ética para a Saúde do CHP

Sara Raquel Pereira Martins, na qualidade de aluna, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa. autorização para realizar no Centro Hospitalar do Porto o estudo de investigação acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data

Assinatura

\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

\_\_\_\_\_

### **Diretora do Departamento de Ensino, Formação e Investigação do CHP**

Exma. Senhora Diretora do Departamento de Ensino, Formação e Investigação do CHP

Sara Raquel Pereira Martins, na qualidade de aluna, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa. autorização para realizar no Centro Hospitalar do Porto o estudo de investigação acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data

Assinatura

\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

\_\_\_\_\_

## **Termos de responsabilidade**

Trabalho académico de investigação: **Aspetos clínicos e imunológicos numa população pediátrica com deleção 22q11**

Aluna da DIIC do curso de MIM do ICBAS/UP e do CHP: **Sara Raquel Pereira Martins**

### **Aluno**

Na qualidade de aluna, comprometo-me a executar o estudo acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados, respeitando os princípios éticos e deontológicos e as normas internas da instituição.

Aluno

Data

Assinatura

Sara Raquel Martins

\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ \_\_\_\_\_

### **Orientador do projeto**

Na qualidade de orientadora, solicito autorização do Conselho de Administração para que a Estudante acima referida possa desenvolver no CHP o seu estudo de investigação. Informo que me comprometo a prestar a orientação necessária para uma boa execução do mesmo e a acompanhar a Estudante nas diferentes fases da sua realização, de acordo com o programa de trabalhos e meios apresentados, bem como por zelar pelo respeito dos princípios éticos e deontológicos e pelo cumprimento das normas internas da instituição.

Nome

Data

Assinatura

Júlia Vasconcelos

\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ \_\_\_\_\_

Instituição

Centro de Responsabilidade

Serviço

Centro Hospitalar do Porto CRMAD

Imunologia

### **Supervisor do projeto / Responsável pela DIIC**

Na qualidade de docente responsável pela DIIC / supervisora da aluna no CHP, comprometo-me a prestar a orientação necessária para uma boa execução do estudo de investigação, de acordo com o programa de trabalhos e meios apresentados. Mais declaro que acompanharei a Estudante, responsabilizando-me por supervisionar a execução do trabalho no CHP, bem como por zelar pelo respeito dos princípios éticos e deontológicos e pelo cumprimento das normas internas da instituição.

Nome

Data

Assinatura

Margarida Lima

\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ \_\_\_\_\_

Departamento: DEFI

## **Termos de autorização local**

Trabalho académico de investigação: **Aspetos clínicos e imunológicos numa população pediátrica com deleção 22q11**

Aluna da DIIC do curso de MIM do ICBAS/UP e do CHP: **Sara Raquel Pereira Martins**

### **Diretores de Serviço**

Na qualidade de Diretor de Serviço, declaro que autorizo a execução do Estudo de Investigação acima mencionado e comprometo-me a prestar as condições necessárias para a boa execução do mesmo, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Serviço	Nome do Diretor (substituição)	Data	Assinatura
Imunologia	Esmeralda Neves	___/___/___	_____

### **Diretores / Conselhos de Gestão de Departamento**

Na qualidade de Diretor do Departamento, declaro que autorizo a execução do estudo de investigação acima mencionado e comprometo-me a prestar as condições necessárias para a boa execução do mesmo, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Centro de Responsabilidade	Nome do Diretor	Data	Assinatura
CRMAD	Helena Ramos	___/___/___	_____
Departamento	Nome do Diretor	Data	Assinatura
DCA	Cidade Rodrigues	___/___/___	_____

## **B. RELATÓRIO DE EXECUÇÃO DO PROJETO DE INVESTIGAÇÃO**

**Aspetos clínicos e imunológicos numa população pediátrica com deleção  
22q11**

Área de Investigação: Imunologia e Pediatria

**Aluna:** Sara Raquel Pereira Martins

**Orientadora:** Dra. Júlia Vasconcelos, HSA/CHP

**Coorientadora:** Dra. Laura Marques, HSA/CHP e ICBAS/UP

Mestrado Integrado em Medicina (MIM) do ICBAS/UP e HSA/CHP

Disciplina de Iniciação a Investigação Clínica (DIIC)

Responsável: Prof. Doutora Margarida Lima, HSA/CHP e ICBAS/UP

Ano letivo: 2013/1014

## Introdução

Este projeto teve como principais objetivos caracterizar do ponto de vista clínico e imunológico um grupo de doentes com a síndrome da deleção 22q11.2 (SD22q11), determinando a prevalência das diferentes alterações clínicas e procurando investigar se há ou não relações entre estas alterações e os distúrbios imunológicos.

No que respeita ao sistema imune, além do registo das alterações encontradas, tentou-se compreender de que forma estas poderiam resultar num aumento de doenças infecciosas e autoimunes, nomeadamente testando duas principais hipóteses: a de que a *pool* de células T fosse mantido por mecanismos de proliferação homeostática, com desequilíbrio secundário do compartimento celular B, ou a de que o *output* tímico seria o responsável pela manutenção dessa *pool*, o que poderia invalidar a primeira possibilidade.

Para tal foram estudadas 12 crianças com SD22q11 seguidas no CHP, com análise dos dados dos seus processos clínicos e colheita de sangue no momento atual.

A recolha de dados dos processos clínicos permitiu compreender quais as manifestações clínicas desta patologia, observar a sua evolução ao longo do tempo, e registar os resultados do hemograma, dos níveis séricos das imunoglobulinas (IgA, IgG e IgM), das populações linfocitárias do sangue periférico e de outros dados analíticos no momento do diagnóstico. No que respeita às populações linfocitárias foram registados os valores percentuais e absolutos de linfócitos T (CD3+), linfócitos B (CD19+) e células NK (CD3- / CD16 e/ou CD56+), assim como das subpopulações linfocitárias T CD4 e CD8, das células T CD4 e CD8 *naïve* (CD45RA+) e das células T CD4 e CD8 de memória/previamente ativadas (CD45RO+).

Uma nova colheita de sangue, feita na altura da consulta de seguimento da criança, permitiu repetir o hemograma, o doseamento de imunoglobulinas (IgA, IgG e IgM) e a análise de populações linfocitárias atrás referidas, e, para além disso, quantificar as células T recentemente emigradas do timo (CD31+, CD45RA+) e as células B de memória *unswitched* (CD27+IgD+) e *switched* (CD27+IgD-) no momento presente.

Uma vez que a quantificação das células B de memória e das células T recentemente emigradas do timo não faz parte do protocolo de estudo de rotina, não estavam definidos os valores normais de referência; por este motivo, foi estudado um grupo controlo de 20 crianças, com

distribuição por idade e sexo semelhante à dos doentes, para estabelecimento de comparação e valorização destes parâmetros.

Ao contrário do que foi inicialmente planeado a execução do projeto, em particular a realização da colheita de dados clínicos e analíticos dos doentes, prolongou-se até janeiro de 2014. O atraso foi devido à necessidade de revisão dos processos clínicos, numa tentativa de melhor caracterizar a patologia infecciosa e devido a uma atualização da lista de doentes em agosto de 2013 que levou à identificação de crianças ainda não contactadas.

A análise estatística dos dados foi realizada com o *software SPSS*<sup>®</sup>, versão 21, para análise descritiva (medidas de distribuição central e medidas de dispersão; frequências absolutas e relativas) e inferencial (teste de Mann-Whitney, teste de Qui-quadrado, teste de Fisher e correlação de Spearman).

## Resultados

### Caraterização clínica

O estudo incluiu 12 crianças com SD22q11, sete do sexo masculino (58%) e cinco do sexo feminino (42%), seguidas na consulta de Pediatria do CHP. O estudo molecular mostrou que se tratava de uma deleção *de novo* em todos os casos. A mediana das idades ao diagnóstico foi de 30 meses, com mínimo de 1 mês e máximo de 12 anos e o tempo de seguimento em consulta variou de 2 a 16 anos, com mediana de 8.5 anos. As manifestações clínicas eram muito diversas. Para uma visão mais global, a sua frequência está disponível na tabela 1.

**Tabela 1:** Distribuição das manifestações clínicas da SD22q11, por frequência.

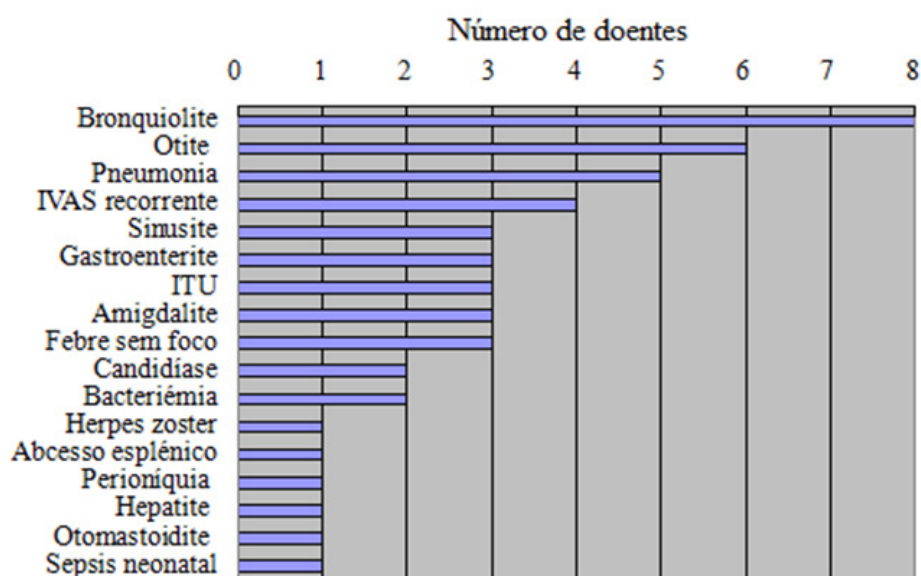
Manifestações clínicas	Frequência (%)
<b>Dismorfia</b>	[75-100]
<b>Neuropsiquiátricas:</b> dificuldades na aprendizagem.	[75-100]
<b>Neuropsiquiátricas:</b> atraso na linguagem; baixo QI; atraso DM; <b>Infeciosas:</b> Bronquiolite; otite.	[50-75[
<b>Neuropsiquiátricas:</b> alterações do comportamento. <b>Infeciosas:</b> pneumonia, infeções das vias aéreas superiores, sinusite, gastroenterite, infeções do trato urinário, amigdalite, febre sem foco. <b>Cardiovasculares:</b> comunicação interventricular, foramen ovale patente. <b>Otorrinolaringológicas:</b> hipoacusia. <b>Osteoarticulares:</b> escoliose. <b>Hematológicas:</b> anemia.	[25-50[
<b>Neuropsiquiátricas:</b> défice de atenção, depressão. <b>Infeciosas:</b> candidíase, bacteriémia, infeção por herpes zóster, abscesso esplénico, perioníquia, hepatite, otomastoidite, sepsis neonatal. <b>Cardiovasculares:</b> persistência do canal arterial, tetralogia de Fallot. <b>Otorrinolaringológicas:</b> hipertrofia das adenoides, fenda palatina, úvula bífida, insuficiência velofaríngea, malformação velo-palatina, atresia congénita da laringe, sinéquia das cordas vocais. <b>Hematológicas:</b> trombocitopenia. <b>Gastroenterológicas:</b> perturbações da deglutição, obstipação crónica, malformação anorretal, refluxo gastroesofágico. <b>Urológicas:</b> criptorquidia, agenesia renal, síndrome de junção, dissinergia vesicoesfínctérica. <b>Outras:</b> síndrome de Evans, estrabismo, tetania, rotação externa da anca, rotação interna das tíbias; crises convulsivas; trombose venosa profunda.	[0-25[

A dismorfia facial e as dificuldades na aprendizagem foram as duas manifestações observadas com maior frequência (9 dos 12 doentes, 75%).

A dismorfia apresentava diferentes expressões, consistindo as características mais comumente descritas o estreitamento da fenda palpebral (42%), palato alto (25%) e implantação baixa do pavilhão auricular (25%). No entanto, frequentemente era apenas registada a ocorrência de dismorfia, sem que existisse a sua descrição detalhada no processo clínico.

As dificuldades de aprendizagem constituíram uma das manifestações mais frequentes (75%), sendo expressas por diminuição do QI em 50% das crianças. Outras do mesmo espectro, algumas das quais também comuns, consistiram em atraso da linguagem (67%), sendo este frequentemente acompanhada de rinolália, atraso do desenvolvimento motor (DM) (58%), alterações do comportamento (25%), défice de atenção (2 crianças, 17%) e síndrome depressivo (1 criança, 8%).

As patologias infecciosas apresentaram-se também como manifestações muito comuns, destacando-se a bronquiolite como a mais frequente (67%), seguida de otite (50%), pneumonia (42%), infeções das vias aéreas superiores (IVAS) recorrentes (33%), sinusite, gastroenterite, infeções do trato urinário e amigdalite (25%) (figura 1). Três (25%) dos doentes tiveram também, em algum momento, febre sem foco determinado com necessidade de utilização de antibioterapia. Outras infeções menos frequentemente registadas foram: candidíase, e bacteriemia (17%), abscesso esplénico, infeção por herpes zoster, perioníquia, hepatite, otomastoidite e sepsis neonatal (8%).



**Figura 1.** Frequências absolutas dos diferentes tipos de infeções nos doentes com SD22q11 (n=12)

Infelizmente os dados dos processos não eram suficientemente detalhados para que fosse possível calcular o número de infeções/ano, o que seria importante para a caracterização da frequência de patologia infecciosa, bem como da sua evolução ao longo do crescimento da criança. Ainda assim foi possível perceber que em 50% das crianças os registos clínicos referiam infeções “de repetição” ou “recorrentes”, tal como em 50% dos doentes havia descrição de doença grave (invasiva ou profunda); contudo, nem sempre os doentes que sofriam de patologia recorrente eram os mesmos com história de gravidade. De notar que das 12 crianças, apenas 3 tiveram necessidade de profilaxia antibiótica (com trimetoprim-sulfametoxazol), e apenas duas delas mantêm essa terapêutica no momento atual. Embora devido à incapacidade de calcular o número de infeções/ano não seja numericamente demonstrável, a leitura dos processos clínicos aponta para uma clara tendência no sentido da melhoria da patologia infecciosa com a idade. O mesmo ocorreu com a única criança com tetania, que melhorou progressivamente ao longo dos anos, culminando em resolução espontânea.

A patologia cardíaca seguiu-se em frequência, sendo a sua forma mais comum a comunicação interventricular (presente em quatro doentes, 42%). Esta coexistia com foramen ovale patente em duas crianças, sendo que uma destas demonstrava também persistência do canal arterial e hipertensão pulmonar. Para além destes, descreveu-se ainda uma associação de foramen ovale patente com persistência do canal arterial e um caso de tetralogia de Fallot (8%).

No que respeita a doença do foro otorrinolaringológico, a hipoacusia verificou-se com uma frequência de 25% e a hipertrofia das adenoides de 17%, enquanto que fenda palatina, úvula bífida, insuficiência velofaríngea, malformação velo-palatina, atresia congénita da laringe e sinéquia das cordas vocais decorreram com frequência de 8% (as duas últimas em associação na mesma criança).

As manifestações gastroenterológicas foram relativamente raras, com perturbações da deglutição em 17% (duas crianças, sendo que uma delas sofria de insuficiência velofaríngea), obstipação crónica em 17% e malformação anorretal e refluxo gastro-esofágico em 8%.

Também a patologia urológica se demonstrou infrequente, com apenas dois casos de criptorquidia (17%), um caso de agenesia renal, um caso de síndrome de junção e um caso de dissinergia vesico-esfintérica (8%).

Relativamente a doenças autoimunes, uma única criança demonstrava trombocitopenia e anemia hemolítica autoimunes (Síndrome de Evans). Um outro doente sofria de trombocitopenia crónica, contudo os estudos para anticorpos antiplaquetários e antinucleares foram negativos.

No que respeita a endocrinopatia, contrariamente ao esperado, apenas se encontra registado um caso de tetania sintomática durante os primeiros três anos de vida, com correção espontânea posterior. No entanto é de notar que os níveis de cálcio e fósforo ao diagnóstico só foram analisados em 50% das crianças, e o estudo da paratormona e da função tiroideia foi executado em apenas dois casos (ambos sem alterações).

Outras manifestações incluíam escoliose (25%), estrabismo (17%), crises convulsivas (8%), rotação externa da anca (8%) e rotação interna das tíbias (8%). Um doente teve ainda um episódio de trombose venosa profunda, que decorreu em contexto de internamento.

Relativamente aos valores hematológicos, das 11 crianças cuja hemoglobina e número de plaquetas foram estudados à altura do diagnóstico, quatro (36%) tinham concentrações de hemoglobina abaixo do normal (<12 g/dl), o mesmo ocorrendo com 2 crianças (18%) no que toca à contagem plaquetária (<150/mm<sup>3</sup>) (tabela 2).

**Tabela 2:** Valores hematológicos observados nos doentes com SD22q11, ao diagnóstico.

ID	Hemoglobina (g/dl)	Plaquetas (/mm <sup>3</sup> )	Leucócitos (/mm <sup>3</sup> )	Neutrófilos (/mm <sup>3</sup> )
1	12.2	226	4880 (↓)	1850
2	12.6	17 (↓)	6200	2077
3	9.0 (↓)	249	9250	3980
4	13.2	135 (↓)	5130	2620
5	12.5	188	6700 (↓)	3400
6	12.2	218	7560	2650
7	10.3 (↓)	241	9350	2800
8	10.6 (↓)	325	9200	2620
9	9.3 (↓)	210	4980 (↓)	1800
10	12.2	156	7200	2340
11	ND	ND	6200	3360
12	12.2	197	6610	2590
Mediana	12.2	210	6655	2620
(mínimo-máximo)	(9.0-13.2)	(17-325)	(4880-9350)	(1800-2980)

Abreviaturas: ND, não disponível.

Valores abaixo (↓) ou acima (↑) dos valores normais de referência para a faixa etária correspondente.

Apenas 3 doentes (25%) tinham diminuição da contagem dos leucócitos, sendo que todos se encontravam sem anomalias da contagem de neutrófilos, 50% com contagem linfocitária normal, 42% (cinco crianças) com linfopenia, e um caso de linfocitose. De realçar que três dos cinco casos de linfopenia correspondem às idades mais jovens no diagnóstico (1 mês, 2 meses e 3 meses de idade) e que os restantes dois ocorreram em doentes com quadro clínico de maior gravidade (num deles por infeções profundas e graves; no outro por infeções menos graves mas de muito elevada frequência). É interessante comparar estes resultados com os obtidos no momento atual: 2 doentes mostraram diminuição da contagem dos leucócitos, nenhum dos quais correspondendo às crianças que tinha o mesmo achado ao diagnóstico. Cinquenta e oito por cento apresentavam linfopenia (*versus* 42% ao diagnóstico), 33% tinham valores de linfócitos normais e um caso apresentava linfocitose. Portanto, contrariamente ao que seria de esperar, a tendência para a linfopenia mostrou-se mais frequente com o passar da idade.

### **Caraterização imunológica**

A todos os doentes foram efetuados, na altura do diagnóstico, estudos de populações linfocitárias e doseamento de imunoglobulinas séricas.

#### **Populações linfocitárias T, B e NK**

A análise das populações linfocitárias demonstrou que, ao diagnóstico, duas crianças (17%) tinham diminuição da contagem das células B e outras duas (17%) tinham um aumento, o que deixa a maioria (67%) sem alterações da contagem destas células (tabelas 3 e 4). Por outro lado, 58% das crianças tinham um aumento das contagens de células NK, 25% sem alteração e apenas duas (17%) com diminuição destas. Relativamente aos linfócitos T, tal como esperado, a grande maioria (92%) apresentava linfopenia, tendo apenas uma criança as contagens normais. No que toca às células T, os linfócitos CD4 foram mais afetados do que os linfócitos T CD8. Efetivamente, 92% dos doentes tinha linfopenia CD4 (apenas um caso tinha contagem normal), enquanto que a linfopenia T CD8 ocorreu em 75% (tendo duas crianças contagens normais e uma chegando a ter valores acima do normal para a idade).

**Tabela 3:** Contagens de linfócitos e populações linfocitárias do sangue periférico nos doentes com SD22q11, ao diagnóstico.

<b>ID</b>	<b>Linfócitos (mm<sup>3</sup>)</b>	<b>LT (/mm3)</b>	<b>LT CD4 (/mm3)</b>	<b>LT CD8 (/mm3)</b>	<b>LB (/mm3)</b>	<b>CNK (/mm3)</b>
1	2200 (↓)	860 (↓)	352 (↓)	374 (↓)	814	506 (↑)
2	2716 (↓)	1630 (↓)	652 (↓)	733	543	543 (↑)
3	4260 (↓)	1214 (↓)	839 (↓)	340 (↓)	2786 (↑)	205 (↓)
4	1690	558 (↓)	848	367 (↓)	292	135 (↓)
5	2600	1230 (↓)	715 (↓)	446 (↓)	517	731
6	3860	2430	753 (↓)	1247 (↑)	934 (↓)	486 (↑)
7	5236 (↑)	1623 (↓)	1204 (↓)	367 (↓)	2409	1256 (↑)
8	4793 (↓)	2013 (↓)	1294 (↓)	671 (↓)	1486	1198 (↑)
9	2395 (↓)	1360 (↓)	934 (↓)	345 (↓)	523 (↓)	536
10	3989	1915 (↓)	1117 (↓)	678 (↓)	1755 (↑)	319
11	2306	1153 (↓)	600 (↓)	415 (↓)	323	738 (↑)
12	3220	1962 (↓)	1094 (↓)	740	740	483 (↑)
<b>Mediana (mín-máx)</b>	2968 (1690-5236)	1492 (558-2430)	844 (352-1294)	431 (340-1247)	777 (292-2786)	521 (135-1256)

Abreviaturas: L, linfócitos; LB, linfócitos B; LT, linfócitos T; CNK, células NK

Valores abaixo (↓) ou acima (↑) dos valores normais de referência para a faixa etária correspondente.

**Tabela 4:** Contagens de linfócitos e populações linfocitárias do sangue periférico nos doentes com SD22q11 (n=12), ao diagnóstico, por grupo etário.

Parâmetro avaliado	Idade ao diagnóstico		
	1 dia - 11 meses (n=3)	1 - 6 anos (n=7)	7 - 17 anos (n=2)
Linfócitos (%)	48 (46-52)	48.7 (38.8-56)	35 (33-37)
Linfócitos (/mm <sup>3</sup> )	4260 (2395-4793)	3220 (2200-5236)	1998 (1690-2306)
LB (%)	31 (21-65)	24 (20-46)	16 (14-17)
LB (/mm <sup>3</sup> )	1486 (523-2786)	814 (517-2409)	308 (292-323)
CNK (%)	22 (5-25)	20 (8-28)	20 (8-32)
CNK (/mm <sup>3</sup> )	536 (205-1198)	506 (319-1256)	437 (135-738)
LT (%)	42 (29-57)	48 (31-63)	42 (33-50)
LT (/mm <sup>3</sup> )	1360 (1214-2013)	1630 (860-2430)	856 (558-1153)
LT CD4 (%)	27 (20-39)	24 (16-34)	38 (26-50)
LT CD4 (/mm <sup>3</sup> )	934 (839-1224)	753 (352-1204)	724 (600-848)
LT CD8 (%)	14 (8-14.4)	17 (7-32)	20 (18-22)
LT CD8 (/mm <sup>3</sup> )	345 (340-671)	678 (367-1247)	391 (367-415)

Abreviaturas: LB, linfócitos B; LT, linfócitos T; CNK, células NK  
Resultados apresentados na forma de mediana (mínimo – máximo).

### *Evolução com a idade*

Na contagem de linfócitos T, e em concordância com o indicado por outros estudos, houve uma diminuição da tendência para linfopenia (75% na atualidade, 92% ao diagnóstico) (tabela 5).

Relativamente aos linfócitos T CD4, a frequência de linfopenia passou de 92% ao diagnóstico para 83%. Também para as células CD8 a frequência da linfopenia diminuiu de 75% para 67%, tendo duas crianças contagens normais e outras duas valores acima do normal para a idade (tabela 5).

Na análise de células B os resultados não foram os esperados: houve um aumento no número de crianças com linfopenia B (inicialmente 17%, atualmente 33%, nenhuma delas as mesmas do momento do diagnóstico), com 42% tendo valores dentro da normalidade e 25% aumentados. Por outro lado, já menos doentes demonstraram valores alterados de células NK, com 50% com valores aumentados, 33% normais e 17% diminuídos (tabela 5).

**Tabela 5:** Valores atuais dos linfócitos e das populações de linfócitos B, T (CD4 e CD8) e NK, no sangue periférico dos doentes com SD22q11 e dos controlos.

Grupo	ID	Linfócitos (/mm <sup>3</sup> )	LT (/mm <sup>3</sup> )	LT CD4 (/mm <sup>3</sup> )	LT CD8 (mm <sup>3</sup> )	LB (/mm <sup>3</sup> )	CNK (/mm <sup>3</sup> )
Doentes (n=12) *	1	920 (↓)	447 (↓)	225 (↓)	182 (↓)	277	187 (↓)
	2	650 (↓)	564 (↓)	292 (↓)	252 (↓)	33 (↓)	54 (↓)
	3	5400	2603 (↓)	1701 (↓)	805	2090 (↑)	670
	4	1500 (↓)	1073 (↓)	698 (↓)	333 (↓)	222 (↓)	192
	5	1700 (↓)	859 (↓)	505 (↓)	294 (↓)	262 (↓)	559(↑)
	6	3917	2699	713 (↓)	1665 (↑)	615	564(↑)
	7	2300	1235 (↓)	607 (↓)	522 (↓)	308	713(↑)
	8	3200 (↑)	1904	902	877 (↑)	611 (↑)	675(↑)
	9	3987	2109	1212	742	793	989(↑)
	10	1849 (↓)	1115 (↓)	610 (↓)	411(↓)	503 (↑)	255
	11	1798 (↓)	899 (↓)	485 (↓)	354 (↓)	216 (↓)	640(↑)
	12	1671 (↓)	1001 (↓)	610 (↓)	338 (↓)	321	343
	Med (mín-máx) ***	1824 (650-5400)	1094 (447-2699)	610 (225-1701)	383 (182-1665)	315 (33-2090)	562 (54-989)
Controlos (n=20) **	Med (mín-máx) ***	2994 (2018-6976)	2210 (1234-4841)	1180 (552-2930)	688 (604-1681)	540 (314-1807)	280 (107-653)

Abreviaturas: LB, linfócitos B; LT, linfócitos T; CNK, células NK

Valores abaixo (↓) ou acima (↑) dos valores normais de referência para a faixa etária correspondente.

\* Género: 7 masculino / 5 feminino; mediana de idades à data do estudo: 12 anos (8 meses a 16 anos).

\*\* Género: 11 masculino / 9 feminino; mediana de idades à data do estudo: 7 anos (7 meses a 16 anos).

\*\*\* Resultados apresentados na forma de mediana (mínimo – máximo).

Linfócitos T *naïve* e linfócitos T de memória

No momento do diagnóstico, nem sempre foi realizado o estudo das células T *naïve* e de memória, com ausência da caracterização destas subpopulações de linfócitos T CD4 em duas crianças e de linfócitos T CD8 em quatro. Os valores obtidos individualmente são apresentados nas tabelas 6 e 7, e, segundo os grupos etários, na tabela 8.

Dos dados disponíveis inferiu-se, uma vez mais, que os linfócitos T CD4 *naïve* parecem ser os mais afetados. Todas as crianças estudadas tinham uma diminuição da contagem de células CD4 *naïve* em relação ao esperado para a idade e 83% das crianças tinham um aumento dos linfócitos T CD4 de memória, com apenas duas crianças demonstrando valores destas na normalidade. Os linfócitos T CD8 apresentaram, de novo, maior heterogeneidade de resultados, com quatro crianças demonstrando uma diminuição de linfócitos T CD8 *naïve*, três com contagens normais e uma com contagens aumentadas destas células. Relativamente aos linfócitos T CD8 de memória, três crianças tinham contagens diminuídas e cinco tinham contagens aumentadas.

**Tabela 6:** Expressão de CD45RA (células *naïve*) e CD45RO (células de memória) nos linfócitos T CD4 do sangue periférico dos doentes com SD22q11, ao diagnóstico.

ID	LT CD4			
	CD45RA+		CD45RO+	
	(%)	(/mm <sup>3</sup> )	(%)	(/mm <sup>3</sup> )
1	41	144 (↓)	69	242 (↑)
2	29	189 (↓)	74	482 (↑)
3	66	554 (↓)	32	269 (↑)
4	ND	ND	ND	ND
5	ND	ND	ND	ND
6	64	481 (↓)	41	308 (↑)
7	70	842 (↓)	35	421 (↑)
8	78	1009 (↓)	14	181
9	77	719 (↓)	13	121
10	61	681 (↓)	36	402 (↑)
11	40	240 (↓)	71	426 (↑)
12	62	678 (↓)	45	498 (↑)
<b>Med (mín-máx) *</b>	63 (29-78)	616 (144-1009)	39 (13-74)	355 (121-498)

Abreviaturas: LT, linfócitos T.; ND, não disponível.

Valores abaixo (↓) ou acima (↑) dos valores normais de referência para a faixa etária correspondente.

\* Resultados expressos na forma de mediana (mínimo – máximo).

**Tabela 7:** Expressão de CD45RA (células *naïve*) e CD45RO (células de memória) nos linfócitos T CD8 do sangue periférico dos doentes com SD22q11, ao diagnóstico.

ID	LT CD8			
	CD45RA+		CD45RO+	
	(%)	(/mm <sup>3</sup> )	(%)	(/mm <sup>3</sup> )
1	64	239 (↓)	63	235(↑)
2	68	498 (↓)	45	330(↑)
3	99	337 (↑)	3	10 (↓)
4	ND	ND	ND	ND
5	ND	ND	ND	ND
6	70	872 (↓)	40	498(↑)
7	83	305	33	121(↑)
8	93	624	4	27 (↓)
9	90	311 (↓)	6	21 (↓)
10	ND	ND	ND	ND
11	78	324	44	183(↑)
12	ND	ND	ND	ND
<b>Med (mín-máx) *</b>	81 (64-99)	331 (239-872)	37 (3-63)	152 (10-498)

Abreviaturas: LT, linfócitos T.; ND, não disponível.

Valores abaixo (↓) ou acima (↑) dos valores normais de referência para a faixa etária correspondente.

\* Resultados expressos na forma de mediana (mínimo – máximo).

**Tabela 8:** Expressão de CD45RA (células *naïve*) e CD45RO (células de memória) nos linfócitos T CD4 e nos linfócitos T CD8 do sangue periférico dos doentes com SD22q11, ao diagnóstico, por grupo etário.

População linfocitárias	Idade ao diagnóstico		
	1 dia -11 meses (n=3)	1 – 6 anos (n=7)	7 - 17 anos (n=2)
LT CD4+CD45RA+ (% LT CD4)	77 (66-78)	62 (29-70)	40
CD4+CD45RA+ (/mm <sup>3</sup> )	719 (554-1009)	580 (144 – 842)	240
LT CD4+CD45RO+ (% LT CD4)	14 (13-32)	43 (35-74)	71
CD4+CD45RO+ (/mm <sup>3</sup> )	181 (121-269)	412 (242-498)	426
LT CD8+CD45RA+ (% LT CD8)	93 (90-99)	69 (64-83)	78
CD8+CD45RA+ (/mm <sup>3</sup> )	337 (311-624)	402 (239-872)	324
LT CD8+CD45RO+ (% LT CD8)	4 (3-6)	3 (33-63)	44
CD8+CD45RO+ (/mm <sup>3</sup> )	21 (10-27)	283 (121-498)	183

Abreviaturas: LT, linfócitos T.

Resultados apresentados na forma de mediana (mínimo – máximo).

### *Evolução com a idade*

Com a idade, as células T CD4 *naïve* tiveram uma evolução no sentido da melhoria, com 75% das crianças mantendo linfopenia (versus 100% das estudadas ao diagnóstico), 17% valores normais e num caso valores aumentados em relação ao esperado para a idade (tabela 9). A linfopenia era também prevalente no compartimento *naïve* CD8, estando presente em 67% dos doentes (25% valores normais e um caso de valores aumentados, tratando-se da mesma criança com valores aumentados de células T CD4 *naïve*) (tabela 10).

Em oposição ao que se verificou com a subpopulação *naïve*, as células T de memória tenderam a estar aumentadas nestes doentes, quer no momento do diagnóstico quer no momento deste estudo. Atualmente, 75% das crianças têm aumento das células T CD4 de memória, 17% com valores dentro da normalidade e uma criança com valores diminuídos (tabela 9). Relativamente às células T CD8 memória, 50% tem aumento destas, 42% valores dentro da normalidade e 8% valores reduzidos (tabela 10).

**Tabela 9:** Valores atuais de linfócitos T CD4, *naïve* (CD45RA+) e de memória (CD45RO+), no sangue periférico dos doentes com SD22q11 e nos controlos.

Grupo	ID	LT CD4			
		CD45RA+		CD45RO+	
		(%)	(/mm <sup>3</sup> )	(%)	(/mm <sup>3</sup> )
Doentes (n=12)*	1	27	61 (↓)	70	158 (↑)
	2	15	44 (↓)	95	277 (↑)
	3	75	340 (↓)	20	340 (↑)
	4	69	482	34	237
	5	39	197 (↓)	64	323 (↑)
	6	54	385 (↓)	45	321 (↑)
	7	31	188 (↓)	70	425 (↑)
	8	43	388 (↓)	58	523 (↑)
	9	83	1006 (↑)	19	230 (↓)
	10	42	256 (↓)	58	354 (↑)
	11	70	340	32	155
	12	50	305 (↓)	55	336 (↑)
	Med (mín-máx)***	47 (15-83)	323 (44-1006)	57 (19-95)	322 (155-523)
Controlos (n=20)**	Med (mín-máx)***	70 (45-81)	786 (299-2344)	30 (9-59)	352 (182-712)

**Tabela 10:** Valores atuais de linfócitos T CD8, *naïve* (CD45RA+) de memória (CD45RO+), no sangue periférico dos doentes com SD22q11 e nos controlos.

Grupo	ID	LT CD8			
		CD45RA+		CD45RO+	
		(%)	(/mm <sup>3</sup> )	(%)	(/mm <sup>3</sup> )
Doentes (n=12) *	1	51	93 (↓)	37	67 (↑)
	2	71	179 (↓)	28	71
	3	96	773	2	16 (↓)
	4	83	276	18	60
	5	59	173 (↓)	39	115(↑)
	6	85	1415	15	250
	7	61	318 (↓)	34	177(↑)
	8	75	658 (↓)	25	219
	9	93	690 (↑)	7	52
	10	67	283 (↓)	33	139(↑)
	11	70	248 (↓)	31	110(↑)
	12	52	176 (↓)	48	162(↑)
	Med (mín-máx)***	71 (51-96)	280 (93-1415)	30 (2-48)	113 (16-250)
Controlos (n=20) *	Med (mín-máx)***	83 (67-98)	593 (283-1647)	16 (2-35)	107 (34-273)

Abreviaturas: LT, linfócitos T.

Valores abaixo (↓) ou acima (↑) dos valores normais de referência para a faixa etária correspondente.

\* Género: 7 masculino / 5 feminino; mediana de idades à data do estudo: 12 anos (8 meses a 16 anos).

\*\* Género: 11 masculino / 9 feminino; mediana de idades à data do estudo: 7 anos (7 meses a 16 anos).

\*\*\* Resultados apresentados na forma de mediana (mínimo – máximo).

### Linfócitos T recentemente emigrados do timo e linfócitos B de memória

Tal como previamente descrito, um dos objetivos principais deste estudo foi tentar esclarecer de que forma as alterações imunológicas poderiam resultar num aumento de doenças infecciosas e autoimunes, em particular testando duas principais hipóteses: a de que nestes doentes a *pool* de células T fosse mantida por mecanismos de proliferação homeostática, com desequilíbrio secundário do compartimento celular B, ou a de que o *output* tímico seria o responsável pela manutenção dessa *pool*, o que poderia invalidar a primeira.

Para testar essas possibilidades compararam-se os valores de linfócitos B de memória *unswitched* e *switched* e de linfócitos T recentemente emigrados do timo, entre doentes e controlos.

#### *Linfócitos T recentemente emigrados do timo*

Os valores individuais obtidos para os linfócitos T recentemente emigrados do timo são apresentados individualmente na tabela 11; na tabela 12 apresentam-se esses mesmos valores por grupo etário.

Os doentes tinham valores significativamente menores de linfócitos T recentemente emigrados do timo, quer no que respeita à percentagem ( $p=0.001$ ) quer à contagem ( $p=0.000$ ) destes linfócitos (tabelas 11 e 12).

**Tabela 11:** Valores atuais de linfócitos T recentemente emigrados do timo, no sangue periférico dos doentes com SD22q11 e nos controlos.

Grupo	ID	LT CD4 recentemente emigrados do timo (CD31+/CD45RA+)	
		(%)	(/mm <sup>3</sup> )
Doentes (n=12)*	1	29	54 (↓)
	2	2	7(↓)
	3	61	1041(↑)
	4	48	335(↓)
	5	29	147(↓)
	6	41	292(↓)
	7	23	142(↓)
	8	36	320(↓)
	9	65	782
	10	29	179(↓)
	11	20	96(↓)
	12	37	224(↓)
		Med (mín-máx)***	32 (2-65)
Controlos (n=20) **	Med (mín-máx)***	58 (37-72)	630 (295-1890)

Abreviaturas: LT, linfócitos T..

Valores abaixo (↓) ou acima (↑) relativamente aos valores de percentil 25 e 75 dos controlos.

\* Género: 7 masculino / 5 feminino; mediana de idades à data do estudo: 12 anos (8 meses a 16 anos).

\*\* Género: 11 masculino / 9 feminino; mediana de idades à data do estudo: 7 anos (7 meses a 16 anos).

\*\*\* Resultados apresentados na forma de mediana (mínimo – máximo).

**Tabela 12:** Valores atuais de linfócitos T recentemente emigrados do timo, no sangue periférico dos doentes com SD22q11 e nos controlos, por grupo etário.

Grupo	População linfocitárias	Idade atual		
		1 dia - 11 meses ***	1 - 6 anos ****	7 - 17 anos *****
Doentes (n=12) *	LT CD4 ret (%)	61	53 (41-65)	29 (2-48)
	LT ret (/mm <sup>3</sup> )	1041	537 (292-782)	147 (7-335)
Controlos (n=20) **	LT CD4 ret (%)	65	58 (42-72)	49 (37-70)
	LT ret (/mm <sup>3</sup> )	1890	880 (298-1576)	511 (295-985)

Abreviaturas: LT, linfócitos T.; LT ret, linfócitos T recentemente emigrados do timo (CD31+CD45RA+)  
Resultados apresentados na forma de mediana (mínimo – máximo).

\* Género: 7 masculino / 5 feminino; mediana de idades à data do estudo: 12 anos (8 meses a 16 anos).

\*\* Género: 11 masculino / 9 feminino; mediana de idades à data do estudo: 7 anos (7 meses a 16 anos).

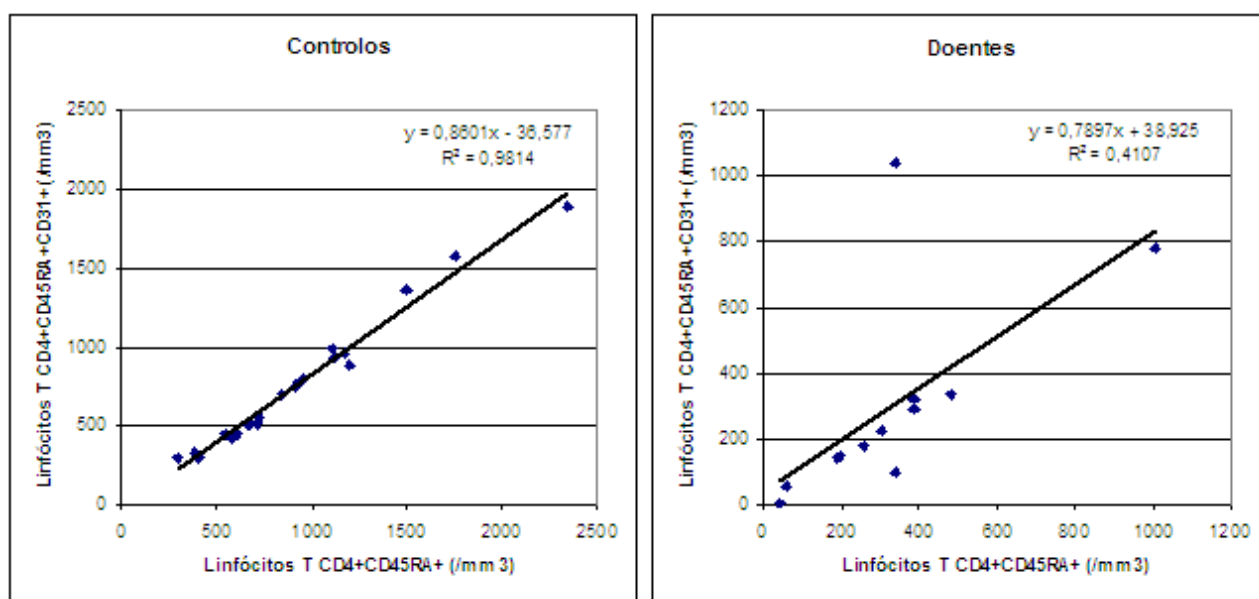
\*\*\* n=1 nos doentes e n=1 nos controlos

\*\*\*\*n=2 nos doentes e n=9 nos controlos

\*\*\*\*\*n=9 dos doentes e n=10 nos controlos

Simultaneamente foi possível demonstrar que nos doentes (de forma semelhante aos controlos), os linfócitos T recentemente emigrados do timo se correlacionavam fortemente com os linfócitos T CD4 *naïve* ( $r$  de Spearman ( $r_s$ ) = 0.83,  $p=0.001$ ), com correlação também para os linfócitos T CD8 *naïve* ( $r_s=0.685$ ,  $p=0.01$ ) (figura 2).

Estas correlações sugerem que nos doentes, tal como nos controlos, o *output* tímico parece ser o responsável pela manutenção da *pool* de linfócitos T periféricos.



**Figura 2.** Relação entre as contagens de linfócitos T recentemente emigrados do timo (CD45RA+CD31+) e de linfócitos T CD4 *naïve* (CD45RA+) nos doentes com SD22q11 (n=12) e nos controlos (n=20).

*Linfócitos B de memória*

Os valores individuais obtidos para os linfócitos B de memória, *unswitched* e *switched*, na tabelas 13; na tabela14 apresentam-se esses mesmos valores por grupo etário.

A comparação entre doentes e controlos não evidenciou diferenças para os linfócitos B de memória *unswitched* (p=0.617) e *switched* (p=0.346).

Deste modo, contrariamente ao verificado com os linfócitos T recentemente emigrados do timo, os doentes não parecem ter alterações do compartimento celular B quando comparados aos controlos.

**Tabela 13:** Valores atuais de linfócitos B memória, *unswitched* e *switched*, no sangue periférico dos doentes com SD22q11 e nos controlos.

Grupo	ID	LB de memória			
		<i>Unswitched</i> (CD27+/ IgD+)		<i>Switched</i> (CD27+/ IgD-)	
		(%)	(/mm <sup>3</sup> )	(%)	(/mm <sup>3</sup> )
Doentes (n=12) *	1	6	17 (↓)	9	25 (↓)
	2	11	4 (↓)	10	3 (↓)
	3	3	63	3	63
	4	5	11 (↓)	9	20 (↓)
	5	10	26 (↓)	9	24 (↓)
	6	6	37	6	37 (↓)
	7	6	18 (↓)	9	28 (↓)
	8	13	79 (↑)	26	159(↑)
	9	7	56	10	81
	10	7	34 (↓)	4	18 (↓)
	11	9	19 (↓)	14	31 (↓)
	12	12	37	8	27 (↓)
	Med (mín-máx)***	7 (3-13)	30 (4-79)	9 (3-26)	27 (3-159)
Controlos (n=20) **	Med (mín-máx)***	8 (4-18)	55 (17-90)	12 (3-20)	59 (22-130)

Abreviaturas: LB, linfócitos B.

Valores abaixo (↓) ou acima (↑) relativamente aos valores de percentil 25 e 75 dos controlos.

\* Género: 7 masculino / 5 feminino; mediana de idades à data do estudo: 12 anos (8 meses a 16 anos).

\*\* Género: 11 masculino / 9 feminino; mediana de idades à data do estudo: 7 anos (7 meses a 16 anos).

\*\*\* Resultados apresentados na forma de mediana (mínimo – máximo).

**Tabela 14:** Valores atuais de linfócitos B memória, *unswitched* e *switched*, no sangue periférico dos doentes com SD22q11 e nos controlos, por grupo etário.

Grupo	População linfocitárias	Idade atual		
		1 dia - 11 meses ***	1 - 6 anos ****	7 - 17 anos ****
Doentes (n=12) *	LB de memória <i>unswitched</i> (%)	3	7 (6-7)	9 (5-13)
	LB de memória <i>unswitched</i> (/mm3)	63	47 (37-56)	19 (4-79)
	LB de memória <i>switched</i> (%)	3	8 (6-10)	9 (4-26)
	LB de memória <i>switched</i> (/mm3)	63	59 (37-81)	25 (3-159)
Controlos (n=20) **	LB de memória <i>unswitched</i> (%)	5	8 (7-18)	8 (4-11)
	LB de memória <i>unswitched</i> (/mm3)	85	61 (41-90)	36 (17-85)
	LB de memória <i>switched</i> (%)	3	12 (7-16)	10 (5-20)
	LB de memória <i>switched</i> (/mm3)	58	82 (48-130)	41 (22-120)

Abreviaturas: LB, linfócitos B.

Resultados apresentados na forma de mediana (mínimo – máximo).

•Linfócitos B de memória, *unswitched* (CD27+/IgD+) e *switched* (CD27+/IgD-).

\* Género: 7 masculino / 5 feminino; mediana de idades à data do estudo: 12 anos (8 meses a 16 anos).

\*\* Género: 11 masculino / 9 feminino; mediana de idades à data do estudo: 7 anos (7 meses a 16 anos).

\*\*\* n=1 nos doentes e n=1 nos controlos

\*\*\*\*n=2 nos doentes e n=9 nos controlos

\*\*\*\*\*n=9 dos doentes e n=10 nos controlos.

Níveis séricos de imunoglobulinas

No estudo das imunoglobulinas os níveis de IgG, IgM e IgA foram investigados na data do diagnóstico em todas as crianças com exceção de uma (tabela 15), enquanto IgE foi estudada em cinco doentes. Quer a IgG quer a IgA demonstraram valores normais em todas as crianças estudadas, no entanto três doentes tinham défice de IgM e um doente défice de IgE.

**Tabela 15:** Níveis séricos de imunoglobulinas dos doentes com dos doentes com SD22q11, ao diagnóstico.

<b>Doente (ID)</b>	<b>IgG (mg/dl)</b>	<b>IgA (mg/dl)</b>	<b>IgM (mg/dl)</b>	<b>IgE (UI/dl)</b>
1	1220	103	120	3
2	884	102	107	11
3	575	30	39	3
4	1171	119	46 (↓)	ND
5	942	155	54	ND
6	832	66	57	ND
7	795	56	171	ND
8	599	13	31	ND
9	469	26	13 (↓)	ND
10	684	70	66	2
11	ND	ND	ND	ND
12	803	95	39 (↓)	2 (↓)
<b>Med (mín-máx)*</b>	<b>803 (469-1220)</b>	<b>70 (13-155)</b>	<b>54 (13-171)</b>	<b>3 (2-11)</b>

Abreviaturas: Ig, imunoglobulina.

Valores inferiores (↓) ou superiores (↑) aos valores normais de referência para a faixa etária correspondente.

\* Resultados apresentados na forma de mediana (mínimo – máximo).

### **Relação entre as alterações imunológicas e as manifestações clínicas**

Para tentar esclarecer em particular a origem da patologia infecciosa compararam-se os doentes com história de infeções graves e profundas (por exemplo: pneumonias, abscessos esplênicos) (6 doentes, 50%) com aqueles que apenas tinham patologia de menor importância clínica (por exemplo: otites ou amigdalites) (50%). No entanto, não foram encontradas diferenças significativas quer a nível dos linfócitos T CD4 *naïve*, quer ao nível dos linfócitos T CD4 de memória (valor de p não calculável para as primeiras dado que todos os doentes, com ou sem infeção grave, tinham linfopenia ao diagnóstico; p = 1.00 nas segundas), o mesmo acontecendo com os linfócitos T CD8 *naïve*, com os linfócitos T CD8 de memória (p= 0.31 para as primeiras e p=1.00 nas segundas), com os linfócitos B de memória *switched* (p=1.00) e *unswitched* (p=0.39) e com os linfócitos T recentemente emigrados do timo (p=0.699).

De acordo com o anteriormente descrito, não foi possível calcular o número de infeções/ ano e como tal não houve um *cut-off* definido que permitisse comparar doentes com e sem infeções de repetição. No entanto foram comparados os doentes cujos processos referiam infeções “de repetição” ou “recorrentes” (50%) com aqueles que não tinha menção de tal (50%). Mais uma vez não foram encontradas quaisquer diferenças significativas a nível de células de CD4 *naïve* ou de memória (valor de p não calculável para as primeiras dado que todos os doentes, com ou sem infeção de repetição, tinham linfopenia ao diagnóstico; p=1.00 para as segundas), ao nível dos linfócitos T CD8 *naïve* ou de memória (p=0.31 para as primeiras e p=1.00 para as segundas), ao nível dos linfócitos B de memória *unswitched* (p=0.39) e *switched* (p=1.00) e ao nível dos linfócitos T recentemente emigrados do timo (p=0.310).

Relativamente a doenças de carácter autoimune não foi possível estabelecer comparações uma vez que uma só criança no grupo de doentes tinha este tipo de patologia. Não deixa no entanto de ser interessante constatar que este doente, em quem foram também reportadas as infeções mais graves do grupo, se trata da criança com contagens mais baixas de linfócitos T recentemente emigrados do timo, com uma elevadíssima discrepância destas em relação aos valores dos restantes doentes e controlos (7/mm<sup>3</sup>, sendo a mediana dos valores encontrados para os doentes da mesma idade de 147/mm<sup>3</sup> e no caso dos controlos de 511/mm<sup>3</sup>), o mesmo não se verificando para os linfócitos B de memória *unswitched* (11% de CD19, sendo a mediana dos valores encontrados para os doentes da mesma idade de 9% de CD19 e no caso dos controlos de 8% de CD19) e *switched*

(10% de CD19, sendo a mediana dos valores encontrados para os doentes da mesma idade de 9% de CD19 e no caso dos controlos de 10% de CD19).

O mesmo tipo de alterações foi encontrado noutra doente com história de infeções particularmente grave (otites muito frequentes nos primeiros anos de vida): as contagens de linfócitos T recentemente emigrados do timo eram baixas em comparação os controlos da mesma idade ( $54/\text{mm}^3$ , com mediana dos valores encontrados para os doentes da mesma idade de  $147/\text{mm}^3$  e nos controlos de  $511/\text{mm}^3$ ), enquanto nos linfócitos B de memória *unswitched* (6% de CD19, mediana dos doentes de 9% de CD19) e dos controlos de 8% de CD19) e *switched* (9% de CD19, mediana nos doentes de 9% de CD19 e controlos de 10% de CD19) não se notaram diferenças evidentes.

## Discussão

As características clínicas desta população de doentes com SD22q11 diferem em alguns aspetos do descrito na literatura. De facto, enquanto geralmente a doença cardíaca, perturbações da alimentação e patologia otorrinolaringológica são reportadas como as manifestações mais comuns [1-3], no nosso estudo a dismorfia, doenças do foro neuropsiquiátrico e patologia infecciosa foram as mais frequentes. De notar contudo que estas crianças são seguidas numa consulta de imunodeficiências primárias, o que explica a frequência elevada de patologia infecciosa. Algumas características não comumente definidas como associadas ao SD22q11, como a anemia, foram encontradas com frequência relativamente elevada; por outro lado manifestações clássicas como doenças do espectro otorrinolaringológico e gastroenterológico foram relativamente raras, e apenas se registou um único caso de doença endocrinológica e de autoimunidade. Mesmo as anomalias cardíacas, descritas como a manifestação mais frequente (cerca de 75% dos doentes) e que mais vezes conduz ao diagnóstico [1,2], só foram verificadas em 42% dos nossos doentes; sendo que até os seus subtipos não foram os esperados (são indicados como mais comuns a Tetralogia de Fallot e interrupção do arco aórtico, na população estudada as mais frequentes foram a comunicação interventricular e patência de foramen ovale).

Para além desta discrepância em relação às patologias mais frequentemente descritas nos doentes com SD22q11, é também de realçar a grande variedade de manifestações clínicas registadas neste estudo, não obstante o facto de a população em causa ser constituída por um grupo relativamente pequeno. Efetivamente, não só houve um grande número de manifestações registadas, como na maioria cada uma destas era bastante infrequente: não se demonstrou uma única característica que estivesse presente em 100% das crianças, ocorrendo as apresentações mais comuns em apenas 75% dos doentes (e mesmo estas consistindo em unicamente duas manifestações), e a maior parte das manifestações ocorre com frequência de 0-25%. Estes achados vêm realçar a grande heterogeneidade clínica que está associada à SD22q11, demonstrando o quão complexo pode ser o estabelecimento do diagnóstico clínico. A dificuldade deste é acrescida se tivermos em conta que, de acordo com os dados obtidos, as manifestações mais frequentes desta patologia (dificuldades na aprendizagem, atraso na linguagem, bronquiolite, otite, etc.) são transversais a um grande número de doenças ou até mesmo presentes em crianças saudáveis. A dismorfia, por constituir uma característica mais restrita, pode representar um importante sinal de alarme para os profissionais de saúde, mas mesmo esta não se encontra em todos os doentes com SD22q11.

A patologia infecciosa, pela sua marcada importância na SD22q11, merece análise em particular [4-6]. Tal como esperado o atingimento foi predominantemente do foro sinopulmonar, sendo algo mais comum a nível respiratório superior que inferior. A evolução das intercorrências tende a ser benigna e doença de gravidade menor é a mais frequente, com a exceção da pneumonia e com a ressalva de que metade dos doentes teve pelo menos um episódio de infeção invasiva ou profunda. Ainda assim apenas três doentes fizeram uso de profilaxia antibiótica, só dois deles mantendo-a na atualidade. Infeções oportunistas foram bastantes raras (duas candidíases e um episódio de herpes zoster), no entanto metade dos doentes tem história da patologia infecciosa de repetição. Embora não existam medições objetivas, os processos indicam uma melhoria da tendência para este tipo de doenças com o crescimento.

A nível de doença imunológica e suas manifestações, os achados vão mais ao encontro aos de estudos prévios [6-12], embora mesmo aí não deixem de haver dados algo surpreendentes.

Tal como esperado, a generalidade dos doentes com SD22q11 não apresentava alterações dos leucócitos e a linfopenia em geral não ocorria na maioria dos casos, sendo porém a linfopenia muito prevalente no compartimento celular T, e em particular nas células T *naïve*. Relativamente às populações linfocitárias T, CD4 e CD8, cujo atingimento preferencial tinha sido previamente alvo de resultados contraditórios [6-8], o nosso grupo de doentes mostrou achados mais consistentes no subgrupo CD4. Esta maior tendência para o atingimento das células T CD4 verificou-se quer a nível de células *naïve* (no sentido de uma diminuição das contagens em relação ao esperado para a idade), quer de memória (neste caso, no sentido de um aumento das contagens em relação ao normal). Embora no compartimento celular T CD8 se verificassem alterações semelhantes (linfopenia T CD8 na maioria dos doentes, tendência para diminuição das contagens de linfócitos T CD8 *naïve* e para aumento das contagens de linfócitos T CD8 de memória) os dados eram mais heterogêneos, com um maior número de doentes com dados discrepantes em relação à tendência geral. Esta linfopenia T, com atingimento preferencial das células T *naïve*, é expectável de acordo com a fisiopatologia da deleção 22q11.2 (migração tímica aberrante) [6-8]. Por outro lado, o aumento nas contagens de células T de memória verificado, possivelmente será secundário ao maior número de doenças infecciosas nestas crianças, podendo contudo também consistir numa desregulação causada pela própria doença.

Relativamente às linhagens de maturação extratímica, como as células B ou NK, a literatura indica que as suas contagens não estão usualmente afetadas [6,8]. Embora no nosso grupo a maioria

das crianças demonstrasse contagens de células B normais ao diagnóstico, a prevalência de linfopenia ou linfocitose B não era ignorável e, ainda mais inesperado, a linfopenia B aumentou com o passar dos anos. Quanto às células NK, em oposição, verificou-se inicialmente linfocitose, que tendeu a corrigir com a idade. A natureza destas alterações permanece por explicar, embora seja possível que o aumento de linfócitos NK ao diagnóstico seja secundário ao maior número de doenças infecciosas nestes doentes, com tendência para a normalização ao longo dos anos, tal como as infeções se foram tornando menos frequentes.

A realização de análises no momento atual permitiu-nos acompanhar a evolução das alterações imunológicas com o crescimento dos doentes com SD22q11. A diminuição dos valores na contagem leucocitária tornou-se menos frequente, tal como a linfopenia T, de células T CD4, CD8 ou de células T *naïve*. Estes dados vão de encontro à normalização das contagens com a idade que tem vindo a ser descrita na SD22q11, assim como à evolução clínica dos nossos doentes, com diminuição das intercorrências infecciosas ao longo da infância. Também de acordo temos a observação de que três das cinco crianças com linfopenia ao diagnóstico eram as mais jovens do grupo, e essa alteração encontrou-se corrigida na nova análise (representando mesmo uma delas o caso de linfocitose). A tendência para a correção dos desvios com o tempo refletiu-se ainda nas contagens de células de memória, quer a nível CD4 quer CD8. Em contraposição, o défice na contagem linfocitária total mostrou-se mais frequente no momento do estudo que anteriormente. Embora dois dos casos correspondam a doentes com história passada de linfopenia e com doença de maior gravidade, constituindo também os dois casos em que se prossegue com a profilaxia antibiótica, os restantes cinco são casos “de novo”. Curiosamente, de entre estes, apenas dois têm história de infeção grave, um de infeções recorrentes e em nenhum dos casos ocorreu infeção recente, estando estes 5 doentes livres de infeções há vários anos (a mais recente em 2008). O motivo de linfopenia nestes doentes fica, como tal, por compreender.

Embora a melhoria da linfopenia T com a idade, também verificada no nosso estudo, tenha sido já descrita na SD22q11 [8-11], os seus mecanismos permanecem por esclarecer. Alguns ensaios apontavam que esta decorreria de proliferação homeostática (que secundariamente poderia afetar o compartimento de linfócitos B) [12] enquanto outros estudos indicavam que seria mantida pelo *output* tímico [8]. No nosso caso, os doentes com SD22q11 não mostraram alterações significativas do compartimento celular B (seja nas células B de memória *unswitched*, seja nas células B de memória *switched*) quando comparados aos controlos, contrariamente ao verificado para as células T recentemente emigradas do timo, cujos valores eram significativamente mais baixos no grupo dos

doentes. A adicionar a este achado, nos doentes (de forma semelhante aos controlos) as células T recentemente emigradas do timo mostraram-se altamente correlacionadas com as células T CD4 *naïve*, com relação menos forte mas também presente para as células T CD8 *naïve*. São portanto dados indicativos de que nos doentes, tal como nos controlos, o *output* tímico parece ser o responsável pela manutenção do *pool* de linfócitos T e de que, ocorrendo ou não proliferação dos linfócitos T à periferia, esta não tem implicações aparentes no compartimento B. Da mesma forma a comparação entre doentes com e sem infeções graves ou indicação processual de patologia infecciosa recorrente não demonstrou diferenças significativas nas contagens de células B de memória, *unswitched* e *switched*, pelo que esta desregulação não parece estar na base da maior suscetibilidade a infeções. Por outro lado não foram também encontradas nestes grupos diferenças significativas nas células CD4 *naïve* ou de memória, CD8 *naïve* ou de memória ou T recentemente emigradas do timo, pelo que a etiologia desse aumento de suscetibilidade fica por esclarecer. De notar, contudo, que os dois doentes com história infecciosa mais marcada (um dos casos por otites mantidas durante anos, outro por história de várias infeções graves) têm valores de células T recentemente emigradas tímicas particularmente baixos (notavelmente mais baixos que os dos restantes doentes), sem no entanto terem alterações óbvias a nível das células B. Contudo são também os dois únicos doentes com contagens de linfócitos T CD4 abaixo de  $500/\text{mm}^3$ , o que também poderá indicar uma maior suscetibilidade a infeções.

Tal como já referido, no que respeita a fenómenos de autoimunidade, não foi possível estabelecer comparações, uma vez que uma só criança no grupo de doentes com SD22q11 tinha este tipo de patologia. Constatou-se no entanto que a criança com patologia deste tipo (correspondendo a um dos já referidos casos de infeções de repetição e de gravidade), as contagens de linfócitos T recentemente emigrados do timo eram muito baixas quando comparadas com os controlos. O mesmo não ocorreu para as células B *unswitched* ou *switched*, cujos valores eram muito semelhantes. Deste modo, mais uma vez os dados não indicam a desregulação B como estando na génese da tendência para autoimunidade, ao contrário do que alguns autores preconizaram [12]. Por outro lado, fica em aberto a possibilidade, não avaliada neste estudo, desta estar relacionada com a incapacidade do timo para manter a *pool* de células T periféricas, com possível diminuição da *pool* de células T reguladoras.

## Conclusões

Com este projeto foi possível constatar a marcada heterogeneidade clínica da SD22q11 e a relativa dificuldade do seu diagnóstico. Não obstante esta heterogeneidade ser também de certa forma patente nos achados imunes, não se deixou de verificar a esperada elevada prevalência de linfopenia T nestes doentes, bem como a melhoria de doença imunológica e da sua expressão em intercorrências infecciosas com o tempo. A confirmação da existência de correlação do *output* tímico com a *pool* de linfócitos T *naïve* em circulação indica que será provavelmente este o responsável pela normalização dos desvios imunes com a idade.

Para além disto, o projeto permitiu definir que na nossa população o atingimento é mais consistente nos linfócitos T CD4 e também parece afastar a possibilidade das alterações das células B como possível causa de suscetibilidade para doença infecciosa e autoimune na SD22q11. Os achados levantam, mas não confirmam, a possibilidade de uma relação das baixas contagens T recentemente emigradas do timo com a maior suscetibilidade a doença infecciosa e autoimune, a qual, a confirmar-se, poderia estabelecer um importantíssimo marcador preditivo de necessidade de profilaxia antibiótica e acompanhamento mais regular em determinado grupo de doentes.

Um dos principais fatores limitantes deste projeto foi o número reduzido de doentes e a impossibilidade de obter registos clínicos completos em alguns casos. É, como tal, pertinente dar continuidade ao estudo, com inclusão de maior número de doentes e com um acompanhamento mais prolongado, preferencialmente longitudinal, que permita identificar melhor as alterações imunes e clarificar sua relação com as manifestações clínicas.

## Bibliografia

1. Mastroiacovo P, Rossi P, Cancrini C, Azzari C, DiGilio MC, Marino B, et al. Chromosome 22q.11 deletion - Recommendations for Diagnosis and Treatment. Italian Primary Immunodeficiencies Strategic Scientific Committee, 2005.
2. Emanuel BS, McDonald-McGinn D, Saitta SC, Zackai EH. The 22q11.2 deletion syndrome. *Adv Pediatr*, 2001. 48: p. 39-73. PMID: 11480765.
3. Kobrynski LJ, Sullivan KE. Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *Lancet*. 2007;370(9596):1443-52. PMID: 17950858.
4. Gennery AR. Immunological aspects of 22q11.2 deletion syndrome. *Cell Mol Life Sci* 2012;69(1):17-27. PMID: 21984609.
5. Oliveira, Manuel et al. Caracterização das infecções em doentes com Síndrome de deleção 22q11.2. *Nascer e Crescer* 2013;22:8-11. ISSN 0872-0754.
6. Sullivan KE, McDonald-McGinn D, Driscoll DA, Emanuel BS, Zackai EH, Jawad AF. Longitudinal analysis of lymphocyte function and numbers in the first year of life in chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *Clin Diagn Lab Immunol*, 1999;6(6): 906-11. PMID: 10548584.
7. Sedivá A, Bartůnková J, Zachová R, Poloucková A, Hrusák O, Janda A, Kocárek E, Novotná D, Novotná K, Klein T. Early development of immunity in diGeorge syndrome. *Med Sci Monit*. 2005;11(4):CR182-7. PMID: 15795698.
8. McLean-Tooke A, Barge D, Spickett GP, Gennery AR. Immunologic defects in 22q11.2 deletion syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122(2):362-7, 367 e1-4. PMID: 18485468.
9. Jawad AF, McDonald-McGinn DM, Zackai E, Sullivan KE. Immunologic features of chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *J Pediatr* 2001;139(5): 715-23. PMID: 11713452.
10. Chinen J, Rosenblatt HM, Smith EO, Shearer WT, Noroski LM. Long-term assessment of T-cell populations in DiGeorge syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111(3):573-9. PMID: 12642839.
11. Piliero LM, Sanford AN, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Sullivan KE. T-cell homeostasis in humans with thymic hypoplasia due to chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Blood*, 2004;103(3):1020-5. PMID: 14525774.
12. Zemble R, Luning Prak E, McDonald K, McDonald-McGinn D, Zackai E, Sullivan K. Secondary immunologic consequences in chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *Clin Immunol* 2010;136(3):409-18. PMID: 20472505.

## GLOSSÁRIO DE ABREVIATURAS

### Siglas e acrónimos

AI, autoimunidade

CC, Central de Colheitas.

CHP, Centro Hospitalar do Porto

CMIN, Centro Materno-Infantil do Norte.

CRMAD, Centro de Responsabilidade dos Meios de Apoio ao Diagnóstico

DIIC, Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica.

DM, desenvolvimento motor

HSA, Hospital de Santo António.

ICBAS, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar.

Ig, imunoglobulina

JIIC, Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica.

LB, linfócitos B

LT, linfócitos T

MIM, Mestrado Integrado em Medicina.

NK, *Natural killer*

QI, quociente de inteligência

SD22q11, Síndrome de deleção do cromossoma 22q11

SI, Serviço de Imunologia

TCR, *T cell receptor*

Th, células T *helper*

Treg, células T reguladoras

Tret, células T recentemente emigradas do timo

## **AGRADECIMENTOS**

À Dra. Júlia Vasconcelos, Dra. Laura Marques e Prof. Doutora Margarida Lima pela orientação, disponibilidade, apoio, paciência e tempo dedicados.

À Dra. Margarida Guedes, Dra. Carla Teixeira, equipa de enfermagem de pediatria e técnicos do Serviço de Imunologia, em particular a Técnica Superior de Saúde, Dra. Cecília Nunes, e às Técnicas de Diagnóstico de Terapêutica, Sónia Dias e Nancy Azevedo, pela disponibilidade e ajuda na execução técnica do projeto.

À Dra. Eduarda Matos, do departamento de Saúde Pública do ICBAS, pela colaboração na análise estatística dos dados.

Ao ICBAS/UP pela bolsa de financiamento que tornou possível a execução do projeto.