ANGELA BUENO FERRAZ FOMIN

**Avaliação da função tímica em pacientes com
Síndrome de DiGeorge**

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

Área de concentração: Pediatria

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristina Miuki Abe Jacob

**SÃO PAULO
2009**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Fomin, Angela Bueno Ferraz

Avaliação da função tímica em pacientes com Síndrome de DiGeorge / Angela
Bueno Ferraz Fomin. -- São Paulo, 2009.

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

Departamento de Pediatria.

Área de concentração: Pediatria.

Orientadora: Cristina Miuki Abe Jacob.

Descritores: 1.Síndrome de DiGeorge 2.Síndromes de imunodeficiência
3.Timo/fisiologia 4.Receptores de células T

USP/FM/SBD-493/09

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando Pessoa

DEDICATÓRIA

Ao meu querido Denilson, pela cumplicidade, compreensão,
incentivo e, sobretudo pelo amor.

Aos queridos Nicholas e Thomas herança de Deus e alegria
constante na minha vida.

Aos meus pais, Angelo e Josmarina, pelo amor e por me
ensinarem desde cedo a importância do conhecimento.

Aos amáveis Paulo e Maria José, pela acolhida como filha.

E a toda minha família, pela alegria de se ter uma Grande Família.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e por tudo o que ela significa.

*“Sei que meu trabalho é uma gota no oceano,
mas sem ele, o oceano seria menor.”*

Madre Teresa de Calcutá

Aos Professores titulares do Departamento de Pediatria: Prof^a. Magda Maria Sales Carneiro-Sampaio, Prof^a. Sandra Josefina Ferraz Ellero Grisi, Prof. Uenes Tannuri, Prof. Vicente Odone Filho e Prof. Werther Brunow Carvalho, pelo incentivo à carreira acadêmica.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Cristina Miuki Abe Jacob, que compartilhou seus conhecimentos, sabedoria e experiência, além da amizade durante toda nossa convivência e no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Antonio Carlos Pastorino, “professor” e amigo, que sempre me incentivou e esteve presente com sugestões, apoio, e claro, pela ajuda com seu conhecimento em informática.

Às Dr^a. Ana Paula B. M. Castro e Dr^a. Luciana M. A. Ribeiro, amigas e companheiras durante a jornada de realização de um trabalho científico.

Às Dr^a. Mayra de Barros Dorna e Dr^a. Letícia A. Watanabe, pelo carinho, apoio e pela prontidão com que sempre me auxiliaram.

Aos médicos em estágio na Unidade de Alergia e Imunologia, meu agradecimento pela cooperação e incentivo à realização desta tese, em

especial à Marcela, Nathania e Renata, pela contribuição do estudo da Síndrome de DiGeorge, muito obrigada.

Aos médicos da Unidade de Genética, em especial à Prof. Dr^a. Chong Ae Kim e Dr^a. Débora Bertola, pelos esclarecimentos e pelo encaminhamento dos pacientes.

À equipe do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração HC-FMUSP, em especial ao Dr. Alexandre C. Pereira, pelo encaminhamento dos pacientes e pela pesquisa da deleção em alguns deles.

À equipe do Laboratório de Reumatologia da Escola Paulista de Medicina, em especial à Dr^a. Cristiane Kayser e Maria Izabel Arismendi, pela realização da quantificação dos TRECs.

À equipe do Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia do HC-FMUSP (LIM 60), em especial ao Dr. Esper G. Kallas, Karina I. Carvalho e Bianca N. A. dos Santos, pela gentileza de realizar as citometrias.

Ao “Prof. Ulysses Doria”, pelas sugestões e, principalmente, pela análise estatística, imprescindível para este trabalho.

À Mariza K. U. Yoshikawa, bibliotecária do Instituto da Criança, pelo auxílio nas questões referentes à bibliografia.

À Maria Helena Vargas, pela atenção, carinho e competência com que me auxiliou na formatação da tese.

Ao Nivaldo e à Milene Rocha, pela prontidão e boa vontade no atendimento às nossas solicitações.

Às secretárias do Departamento de Pediatria e do Instituto da Criança, em especial, à Solange R. B. Seródio, Adriana T. Bezerra e Denize Costa, pela amizade e incentivo na realização desta tese.

Aos familiares e as crianças e adolescentes, que colaboraram como controles.

Aos familiares e pacientes com Síndrome de DiGeorge, meus respeitos e agradecimentos pela cooperação na compreensão da doença.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de gráficos

Lista de quadros

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Epidemiologia	4
1.2	Alteração do Cromossomo 22	6
1.3	Crítérios Diagnósticos.....	11
1.4	Manifestações Clínicas.....	14
1.5	Alterações Imunológicas na SDG.....	18
1.6	Avaliação da Função Tímica	20
2	OBJETIVOS	24
2.1	Objetivo principal.....	25
2.2	Objetivos específicos.....	25
3	MÉTODOS	26
3.1	Casuística	27
3.2	Métodos.....	29
3.2.1	Quantificações do número de cópias de TREC (em células mononucleares do sangue periférico)	32
3.2.2.1	Isolamento de células mononucleares do sangue periférico	32
3.2.2.2	Extração do DNA genômico.....	33
3.2.2.3	Avaliação qualitativa e quantitativa de DNA.....	34
3.2.2.4	Deteção e quantificação de TREC por PCR quantitativo em tempo real	34
3.3.2	Subpopulação de linfócitos T (em células mononucleares do sangue periférico)	36
3.3.2.1	Congelamento de células mononucleares provenientes do sangue periférico (CMSP).....	36
3.3.2.2	Descongelamento de células mononucleares provenientes do sangue periférico.....	37
3.3.2.3	Imunofenotipagem de Superfície Celular	39
3.2.3	Análise Estatística	41
3.3	Aspectos Éticos	41

4	RESULTADOS.....	42
4.1	Achados Clínicos.....	45
4.2	Achados Laboratoriais.....	49
4.3	Alterações Imunológicas	51
4.4	Avaliação da Função Tímica	52
4.5	Avaliação da Subpopulação e Ativação de Células T	53
4.6	Avaliação da Resposta Proliferativa à Mitógenos	57
5	DISCUSSÃO	58
6	CONCLUSÕES	80
7	ANEXOS	82
8	REFERÊNCIAS.....	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anti-HBs	- Anticorpos do antígeno de superfície para vírus da hepatite B
CAPPesq	- Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CATCH 22	- Cardiac defects, Abnormal fascies, Thymic hypoplasia, Cleft palate and Hypocalcemia
CGH	- hibridização genômica comparativa (Comparative genomic hybridization)
CIA	- Comunicação intra atrial)
CIV	- Comunicação inter ventricular
CMSP	- células mononucleares provenientes do sangue periférico
COMT	- Catechol-O-methyltransferase
DNA	- Ácido desoxiribonucléico
EDTA	- Ácido etilênico tetra acético
ELISA	- Enzyme-linked immunosorbent assay
EPM-UNIFESP	- Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de Medicina
FAPESP	- Fundação de amparo ao ensino e a pesquisa
FGF 8	- Fator de crescimento de fibroblasto 8
FISH	- Hibridização com fluorescência in situ (Fluorescence in situ hybridization)
ICr-HC-FMUSP	- Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IgA	- Imunoglobulina A
IgG	- Imunoglobulina G
IgM	- Imunoglobulina M
INCOR	- Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

LCR	- Low copy repeats
LIM	- Laboratório de investigação médica
Mb	- Milhões de pares de bases
MHC	- Complexo de histocompatibilidade
MYF 5	- Myogenic Factor 5
MYOD1	- fator miogênico de diferenciação
NaCl	- Cloreto de sódio
NCHS/CDC	- National Center for Health Statistics/Centers for Disease Control and Prevention
PCR	- reação em cadeia de polimerase
PRODH	- Proline dehydrogenase
RALDH2	- Retinaldehyde dehydrogenase 2
RTE	- Células recém emigradas do timo (Recent thymic emigrant)
SDG	- Síndrome de DiGeorge
T3	- Triiodotironina
T4	- Tiroxina
TA	- Temperatura ambiente
TBX1	- Gene que codifica a proteína TBox -1
TCRs	- Receptor de célula T
TRECs	-
Treg	- Células T regulatórias
U. V.	- ultravioleta
VEGF	- fator de crescimento vascular endotelial (Vascular endothelial growth factor)

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição por faixa etária dos pacientes com SDG (n = 14)	43
Gráfico 2 - Preseça de cardiopatias nos pacientes com SDG (n = 14)	45
Gráfico 3 - Presença de dismorfismos nos pacientes com SDG (n = 14)	46
Gráfico 4 - Distribuição do número de cópias de TREC em 12 pacientes com SDG e seus controles.....	53
Gráfico 5 - Distribuição de percentual de células CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD28 ⁺ em 12 pacientes com SDG e seus controles.....	55
Gráfico 6 - Distribuição de percentual de células CD3 ⁺ CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ em 12 pacientes com SDG e seus controles	55
Gráfico 7 - Distribuição de percentual de células CD3 ⁺ CD8 ⁺ HLA-DR ⁺ em 12 pacientes com SDG e seus controles	56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Critérios diagnósticos presentes nos pacientes com SDG (n = 14)	44
Quadro 2 - Características clínicas dos pacientes com SDG (n = 14)	48
Quadro 3 - Avaliação laboratorial dos pacientes com SDG (n = 14)	50
Quadro 4 - Dados laboratoriais referentes à imunidade humoral dos pacientes com SDG (n = 14)	51
Quadro 5 - Quantidade de cópias de TREC/ μ g DNA em 12 pacientes com SDG e seus controles emparelhados por idade e sexo	52
Quadro 6 - Números de leucócitos, linfócitos e subpopulação de linfócitos nos pacientes com SDG (n = 14).....	54
Quadro 7 - Resposta proliferativa à mitógenos em três pacientes com SDG	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de cópias de TREC em 12 pacientes com SDG	53
Tabela 2 - Valores do painel de ativação de células T de sangue periférico em 12 pacientes com SDG e seus controles	56

RESUMO

Fomin ABF. *Avaliação da função tímica em pacientes com Síndrome de DiGeorge* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

Entre as síndromes de deleção do cromossomo 22q.11, a Síndrome de DiGeorge foi descrita em 1967 como uma imunodeficiência primária caracterizada por: malformações cardíacas, hipoparatiroidismo e ausência de timo. A incidência estimada é de 1: 3000 nascidos vivos e apesar disto seu reconhecimento ainda apresenta dificuldades devido à grande variabilidade fenotípica e diferentes nomenclaturas. Para o diagnóstico é necessário a presença do número de células T circulantes diminuído ou normal, número de células B circulantes normais e níveis séricos de imunoglobulinas diminuídos ou normais associado com os seguintes achados: hipoparatiroidismo, malformações cardíacas conotruncais, dismorfismo facial e detecção da deleção do cromossomo 22q.11. Os pacientes com Síndrome de DiGeorge apresentam graus variados de comprometimento tímico e há a necessidade de avaliação da função tímica objetiva e eficaz para este grupo de pacientes. Recentemente, a mensuração do TREC tem sido considerada adequada para avaliar a função tímica. O objetivo deste estudo foi avaliar a função tímica em pacientes com esta síndrome através de dados clínicos e laboratoriais associados à mensuração do TREC em células mononucleares periféricas. Os objetivos secundários foram descrever as características fenotípicas, as alterações imunológicas incluindo a quantificação de subpopulações de linfócitos T e sua ativação. A quantificação do TREC foi feita através de PCR quantitativo em tempo real e as subpopulações de linfócitos T e dos marcadores de ativação CD28⁺ e HLA-DR⁺, através de citometria de fluxo. Nesta casuística foram incluídos 14 pacientes, oito masculinos, com idade entre 8m a 18a11m. Todos os pacientes preencheram os critérios diagnósticos e em dois não foi detectada a deleção do 22q11.2. O achado mais freqüente foi o acometimento cardíaco em 12 pacientes, prevalecendo a tetralogia de Fallot. O dismorfismo facial foi observado em 11 pacientes, sendo as alterações orofaciais as mais comuns. Hipocalcemia esteve presente em cinco pacientes e em um deles havia associação com hipotireoidismo neonatal. Depressão foi observada em dois pacientes e atualmente nenhum paciente apresenta quadro de infecção de repetição. À avaliação da imunidade humoral, detectou-se cinco pacientes com concentrações séricas de IgM abaixo dos valores normais para a idade e na avaliação da anticorpopótese somente três pacientes responderam com títulos protetores para a o esquema vacinal completo para hepatite B e quatro para sarampo. A quantificação do número de TREC realizada em 12 pacientes mostrou-se reduzida em relação

aos controles com uma significância estatística ($p = 0,002$). O número de linfócitos totais estava dentro dos valores normais, mas, os valores de $CD3^+$ estavam diminuídos em nove, $CD4^+$ em um e $CD8^+$ em cinco pacientes. Observou-se maior expressão de marcadores de ativação linfocitária no grupo de pacientes que nos controles ($p = 0,002$). Conclusão: Este estudo revelou que os pacientes avaliados apresentaram alteração tanto da imunidade celular como humoral em especial em relação à anticorpopogênese pós vacinal e redução da subpopulação de linfócitos T. A reduzida quantidade de TREC em relação aos controles pode indicar uma disfunção tímica embora tenha sido observado normalidade linfocitária nestes pacientes.

Descritores: Síndrome de DiGeorge. Síndromes de imunodeficiência. Timo. Receptores de células T.

SUMMARY

Fomin ABF. *Assessment of thymic function in patients with DiGeorge Syndrome* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2009.

Among the syndromes of 22q.11 deletion, the DiGeorge Syndrome was first described in 1967 as a primary immunodeficiency characterized by: heart defects, hypoparathyroidism and absence of thymus. The estimated incidence is 1: 3000 live births and despite this, its recognition still presents difficulties due to large variability and different nomenclatures. For the diagnosis it is necessary the presence of the decreased or normal number of circulating T cells, normal number of circulating B cells and decreased or normal levels serum of immunoglobulins associated with the following findings: hypoparathyroidism, conotruncal heart defects, facial dimorphism and detection of 22q.11 deletion. Patients with DiGeorge syndrome have varying degrees of thymic commitment and there is a necessity for an objectively and effectively evaluation of thymic function to this group of patients. Recently, the measurement of TREC has been considered adequate to evaluate the thymic function. The aim of this study was to evaluate the thymic function in patients with this syndrome through clinical and laboratory data associated with the measurement of TREC in peripheral blood mononuclear cells. The secondary objectives were to describe the phenotypic characteristics, immune disorders including quantification of subpopulations of T lymphocytes and their activation. Quantification of TREC was performed by quantitative PCR in real time and the subpopulations of T lymphocytes and activation markers CD28⁺ and HLA-DR⁺, by flow cytometry. In this case series included 14 patients, eight male, aged 8m to 18y11m. All patients met the diagnostic criteria and two did not detect the 22q11.2 deletion. The most common finding was cardiac involvement in 12 patients, with prevalence of tetralogy of Fallot. The facial dimorphism was observed in 11 patients with orofacial changes being the most common. Hypocalcaemia was present in five patients and one of them was associated with neonatal hypothyroidism. Depression was observed in two patients and now, no patient presents recurrent infections. In the humoral immunity, we have found five patients with serum IgM below normal for age and only three patients responded with protective levels of antibodies to the complete vaccine schedule for hepatitis B and four for measles. The measurement of the number of TREC was performed in 12 patients and it was reduced compared to controls with a statistical significance ($p = 0,002$). The total number of lymphocytes were within the normal range, but the values of CD3⁺ were decreased in nine, CD4⁺ in one and CD8⁺ in five patients. It was found a

higher expression of markers of lymphocyte activation in the group of patients than in controls ($p = 0,002$). Conclusion: This study revealed that in the patients studied both humoral and cellular immunity was compromised, in particular in relation to vaccinal response and reduction the subpopulation of T lymphocytes. The reduced amount of TREC when compared to controls may indicate a thymic dysfunction despite the normal lymphocytes in these patients.

Keywords: DiGeorge syndrome. Immunologic deficiency syndromes. Thymus. T cells receptors.

1 INTRODUÇÃO

A síndrome de DiGeorge (SDG) foi descrita em 1967 como uma imunodeficiência primária decorrente do desenvolvimento anormal da terceira e quarta bolsas faríngeas durante o período embrionário, sendo caracterizada pela presença de hipocalcemia decorrente do hipoparatiroidismo, malformações cardíacas e hipoplasia ou aplasia do timo (DiGeorge *et al.*, 1967). Além dessas manifestações clínicas clássicas, alterações dentárias, renais, oftalmológicas, distúrbios de comportamento e principalmente atraso no desenvolvimento da fala podem estar presentes nos pacientes com SDG. A etiologia é variada podendo ocorrer em associação com diabetes materno, uso de álcool durante a gestação ou anormalidades cromossômicas (Greenberg *et al.*, 1988; Driscoll *et al.*, 1992). Em mais de 90% dos casos de SDG detectou-se deleção do cromossomo 22q11.2, sendo que os principais genes envolvidos são os da família UFD1L, TBX1, RALDH2, COMT que participam no desenvolvimento dos órgãos afetados (Merscher *et al.*, 2001).

Sua incidência estimada é de 1:3000 nascidos vivos e apesar desta alta frequência, pouco se sabe de sua história natural e evolução, provavelmente, devido às dificuldades de diagnóstico (Goodship *et al.*, 1998). A grande variabilidade de denominações que inclui Síndrome Velo-Cardio-Facial, Síndrome de Shprintzen, Síndrome de DiGeorge, CATCH 22

e Síndrome da Anomalia Facial Conotruncal, entre outras, está entre as causas de erros ou confusão diagnóstica, já que apesar da impressão equivocada de que são doenças distintas, podem representar a mesma condição gênica, com expressões clínicas variadas.

Antes do advento das técnicas de diagnóstico genético, como a hibridização com fluorescência *in situ* (FISH), os pacientes eram diagnosticados com base nas suas características morfo-funcionais e categorizados como Síndrome de DiGeorge (ou Seqüência de DiGeorge) quando apresentavam hipocalcemia, hipoplasia ou aplasia tímica, malformações cardíacas e comprometimento do sistema imunológico. A categorização como Síndrome Velo-Cardio-Facial ocorria na presença de fâscies dismórfica. Provavelmente, muitos pacientes não eram diagnosticados nem definidos como uma síndrome conhecida, por não preencherem os critérios existentes até então. A diversidade fenotípica, aparentemente, não é determinada por nenhuma deleção em especial, pois, mais de 90% dos pacientes apresentam a mesma alteração cromossômica e em algumas famílias, há expressões clínicas diversas do mesmo defeito (Carlson *et al.*, 1997). Vários pesquisadores têm sugerido a denominação CATCH 22 (Cardiac defects, Abnormal fascies, Thymic hypoplasia, Cleft palate and Hypocalcemia) devido à deleções no cromossomo 22, para este grupo de pacientes (Wilson *et al.*, 1992 e 1993; Wulfsberg *et al.*, 1996).

Para aumentar as dificuldades já apresentadas, há o fato de que alguns pacientes com síndrome de DiGeorge ou síndrome Velo-Cardio-

Facial não apresentam as deleções características. Alguns apresentam translocação do cromossomo 20 para o 22 ou deleções de outros cromossomos, tais como do 10p13 e 18q21 (Merscher *et al.*, 2001).

1.1 Epidemiologia

Há muitos relatos na literatura da incidência da SDG que variam entre 1:2000 até aproximadamente 1:7000 habitantes. Estes dados dependem diretamente do método de diagnóstico e da caracterização fenotípica e/ou genotípica dos pacientes. Um dos trabalhos mais citados e aceito, realizado por Wilson *et al.* (1993), calculou uma prevalência mínima de 1:4.000 nascidos vivos baseados na presença da deleção em 5% dos pacientes com malformações cardíacas congênitas. Goodship *et al.* (1998) examinaram 207 crianças com anomalias cardíacas congênitas, além dos defeitos septais ventriculares, entre os anos de 1994 e 1995 em Newcastle, Inglaterra. Das 170 crianças examinadas posteriormente, cinco apresentavam deleção e duas outras crianças foram diagnosticadas quatro anos mais tarde, resultando em uma estimativa total da incidência de um para 3900 nascidos-vivos. Devido ao fato de que muitos pacientes não apresentam anormalidades cardíacas, isto representa uma estimativa mínima.

Na Suécia, dois centros estimaram a incidência da deleção em pacientes referidos por outras especialidades, hospitais ou registros de nascimentos: na região de Gotaland, a incidência estimada encontrada foi de um para cada 7000 nascidos vivos, e de um para 5900 na cidade de Gothenburg (Oskarsdottir *et al.*, 2004).

Na região do sudeste da França, por meio de registro e notificação voluntária de nascimentos de crianças com defeitos congênitos, encontrou-se uma incidência geral de um para 9700 nascidos vivos, porém, após a introdução do teste de FISH para a detecção da deleção, em 1993, houve um aumento de diagnóstico em até um para cada 4500 nascidos vivos (Tezénas *et al.*, 1996). Já Devriendt *et al.* (1998) estimaram uma incidência de um em cada 6355 nascidos vivos na região da Bélgica, com base no número de testes positivos para a deleção do cromossomo 22q11.2.

Todos estes estudos, provavelmente, subestimam a real incidência da SDG. O fenótipo clínico é variável e, freqüentemente, pacientes sem malformações cardíacas são diagnosticadas tardiamente. Na maioria das vezes os estudos dependem de pacientes referenciados e aqueles que apresentam características mínimas ou atípicas não são diagnosticados.

A deleção pode ter herança autossômica dominante, porém, na maioria dos casos ocorre uma mutação *de novo*. Poucos estudos avaliaram pais assintomáticos para a presença de deleção e a chance de herdar esta mutação de um progenitor varia de 8% a 28%. Pais sintomáticos geralmente têm um fenótipo atenuado, com uma baixa freqüência de malformações cardíacas. O aconselhamento genético é crucial para as famílias com pais afetados porque a chance de recorrência é de 50% e os descendentes freqüentemente são afetados com maior gravidade (Leana-Cox *et al.*, 1996; Digilio *et al.*, 1997; Ryan *et al.*, 1997; McDonald-McGinn *et al.*, 1999).

1.2 Alteração do Cromossomo 22

O primeiro relato da presença da microdeleção do cromossomo 22 na região q11.2 foi feita somente em 1992 por Scambler *et al.* (1992) e vários outros relatos seguiram a este, confirmando a deleção pela técnica de FISH. Estudos subseqüentes definiram a região crítica e a deleção típica utilizando-se apenas do cariótipo de alta resolução. Apesar das descrições de casos geneticamente herdados, em 90% dos casos as mutações são *de novo* sem o relato de pais afetados (Swillen *et al.*, 1998; Kates *et al.*, 2004).

A deleção mais comum ocorre com cerca de três milhões de pares de bases (3 Mb), em cerca de 7 a 8% dos casos com 1,5 Mb e em 2 a 3% dos casos ocorre apenas um rearranjo na região crítica do 22q11.2. Não foram relatadas diferenças de expressão clínica entre as deleções de 3 Mb e 1,5 Mb, mas, acredita-se que devam existir (Morrow *et al.*, 1995).

O braço longo do cromossomo 22 tem um arranjo peculiar que predispõe a região do 22q11.2 para ter deleções com tamanho 3 ou 1,5 Mb. Especificamente, existem múltiplas regiões de repetição de baixo número de cópias [*low copy repeats* (LCR)], localizadas no 22q. Estas porções de LCR só foram identificadas em primatas e é uma aquisição recente na evolução. Duas destas regiões são praticamente idênticas sendo o final proximal e distal da deleção típica. Outra região menor de LCR se localiza no meio da deleção típica de 3 Mb, aproximadamente 1,5 Mb da seqüência proximal do LCR. A deleção é causada devido a uma recombinação homóloga durante o primeiro estágio da prófase da meiose, onde uma troca intercromossomial de ácido desoxirribonucléico (DNA) desigual ocorre ou em alguns casos,

decorrente de um rearranjo intracromossomal. Em outras palavras, há um erro de leitura na sequência do DNA entre os dois cromossomos, onde a LCR proximal de um reconhece a porção LCR distal do outro. Como os cromossomos estão próximos e alinhados, ocorre um *crossing-over* desigual e uma das cópias do cromossomo perde um segmento de 3 Mb de DNA, enquanto que o outro recebe material cromossômico extra. Em torno de 10% dos casos, a perda do material genético ocorre intracromossomalmente com o pareamento de porções LCR do mesmo cromossomo (Edelmann *et al.*, 1999).

A deleção característica do cromossomo 22q11.2 é pelo menos 10 vezes mais comum que a segunda deleção humana mais comum. Provavelmente isto ocorre porque as porções LCR do cromossomo 22q11.2 são mais largas, complexas e têm maior homologia que qualquer outra porção LCR no genoma associada à síndrome de deleção humana. No maior estudo descrito até hoje sobre os mecanismos da deleção do 22q11.2 não foi relatado rearranjos intracromossomiais; por outro lado, a deleção foi atribuída a um evento anormal na meiose (Baumer *et al.*, 2004).

Na deleção típica com 3 Mb, um pouco mais de 35 genes estão presentes na região deletada e o gene principal envolvido nas características clínicas da SDG foi identificado como TBX1. Modelos murinos têm sido muito úteis e nos revelaram aspectos surpreendentes. Apesar do fenótipo do defeito no desenvolvimento do quarto arco braquial embrionário ser altamente penetrante, somente alguns animais têm lesões cardíacas ao nascimento. A habilidade de recuperação do defeito do arco aórtico

embrionário tem levantado a questão do quanto uma intervenção pré-natal poderia ser desenvolvida para combater os efeitos da deleção. Além disto, a importância de um efeito modificador de base foi inesperada. Inicialmente, os ratos portadores da deleção não tinham um fenótipo importante na paratireóide e timo. Entretanto, quando a deleção foi transmitida para outras gerações, o fenótipo tímico e da paratireóide foi mais evidente. Em seres humanos, poucos dados sustentam a existência de um efeito modificador de base (Lindsay *et al.*, 1999 e 2001; Merscher *et al.*, 2001; Jerome *et al.*, 2001; Taddei *et al.*, 2001).

Muitos pacientes de origem americana ou européia são similares em relação às manifestações fenotípicas (Ryan *et al.*, 1997; McDonald-McGinn *et al.*, 1999), entretanto, pacientes do Chile e China têm diferenças importantes que podem ser conseqüentes a um viés ou diferenças fenotípicas relacionadas a genes modificadores (Munoz *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2005). Polimorfismos no fator de crescimento endotelial vascular podem modificar o fenótipo em algumas circunstâncias (Stalmans *et al.*, 2003).

Em ratos, o TBX1 é expresso nas bolsas faríngeas mesenquimal e endodérmica. A bolsa faríngea é o segmento inicial para estruturas da face e tórax superior. A terceira bolsa (endodérmica) origina o timo e paratireóide.

A haploinsuficiência para TBX1 ocasiona estruturas precursoras menores, que diminuem a proliferação das células endodérmicas nos arcos braquiais (Xu *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). Estes arcos levam a um comprometimento do desenvolvimento das estruturas faciais, paratireóide e timo. A cascata de fatores de transcrição regula o desenvolvimento da

paratireóide e timo e o TBX1 é um dos requisitos necessário. Além disto, ele diretamente ativa o fator de crescimento fibroblástico 8 (FGF8), o FGF10, o fator miogênico 5 (MYF5) e o fator miogênico de diferenciação 1 (MYOD1). (Xu *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Ivins *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006; Zou *et al.*, 2006a e 2006b).

Os fatores FGF8 e FGF10 são necessários para promover o crescimento de células vizinhas e também têm um papel na migração da crista neural. MYF5 e MYOD1 regulam o desenvolvimento dos músculos braquiométricos (Kelly *et al.*, 2004) e o desenvolvimento anormal destes músculos podem explicar as dificuldades na deglutição e alimentação, que são comuns na infância destes pacientes.

Vários estudos de mapeamento da origem das células revelaram que TBX1 é expresso por pequeno grupo de células no campo cardíaco anterior, que se transformam em cardiomiócitos nos ductos de saída (Xu *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Maeda *et al.*, 2006). Estas células podem marcar um caminho para a subsequente migração das células da crista neural ou podem elas mesmas ser essenciais para a formação destas estruturas.

Pacientes com deleção do cromossomo 22q11.2 apresentam outras anormalidades que não são originárias dos arcos braquiais. Distúrbios comportamentais, cognitivos e psiquiátricos são muito comuns, enquanto que anormalidades esqueléticas, vertebrais e renais são vistas em poucos pacientes. O TBX1 é expresso no mesoderma cerebral em desenvolvimento e no esclerotoma que dá origem a várias estruturas da coluna espinal (Mahadevan *et al.*, 2004). Apesar do papel do TBX1 nestes locais ainda não

ser bem conhecido, seu padrão de expressão fornece um cenário para a compreensão dos fenótipos extra arcos braquiais.

Avanços no conhecimento da regulação do TBX1 levaram à possibilidade de controlar sua expressão pela via do ácido retinóico. Exposição fetal a isotretinoína é conhecida como fator causal de uma síndrome muito semelhante à deleção do cromossomo 22q11.2 (Cipollone *et al.*, 2006). O ácido retinóico é um repressor da expressão do TBX1 (Roberts *et al.*, 2005). A manipulação desta via pode fazer com que a expressão retorne ao normal em fetos haploinsuficientes, se for detectada precocemente. A identificação de genes modificadores, seja na região deletada ou de genes de base, também podem oferecer o desenvolvimento de significativas manipulações (Stalmans *et al.*, 2003; Lawrence *et al.*, 2003). Um potencial gene modificador é o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF).

Apesar do papel crucial que o TBX1 desempenha no fenótipo da deleção do cromossomo 22q11.2, há indícios de envolvimento de outros genes, como por exemplo, o gene COMT que tem um importante papel, pois é responsável por degradar as catecolaminas, incluindo dopamina e epinefrina dois neurotransmissores de extrema importância para as funções neurológicas. Na deleção de uma cópia do gene COMT ou em situações de polimorfismo, a doença psiquiátrica está presente e com uma gravidade maior. Outro gene envolvido é o GPIIb β que contribui para a trombocitopenia crônica (Murphy *et al.*, 1999; Lawrence *et al.*, 2003; McDonald-McGinn *et al.*, 2006; Gothelf *et al.*, 2007a e 2007b?).

1.3 Critérios Diagnósticos

A identificação de um lactente ou uma criança afetada na ausência de história familiar depende do reconhecimento de pelo menos uma característica vista comumente nos pacientes com a deleção, como interrupção do arco aórtico ou uma combinação de características, que sozinhas não evidenciam a presença da deleção, mas que em conjunto aumentam a suspeita.

O diagnóstico é definido pela deleção de DNA do cromossomo 22 na banda q11.2 abrangendo a região que é considerada crítica. A pesquisa por meio do cariótipo de alta resolução revela em torno de 15% das deleções. A maioria das deleções são microdeleções e são somente detectadas por outras técnicas, como a de FISH (Driscoll *et al.*, 1992).

A hibridização *in situ* com imunofluorescência ou FISH, abreviada da descrição em inglês (*fluorescence in situ hybridization*) é a técnica mais utilizada atualmente. O cromossoma é preparado a partir de sangue periférico, sendo denaturado para permitir a hibridização da sonda específica no sítio em questão. A sonda de DNA é marcada com fluorescência, para identificar a presença em duplicata, de uma região específica do genoma, no caso o cromossomo 22q11.2. Esta técnica é altamente confiável e para efeito clínico apresenta praticamente 100% de acurácia, porém, demanda custos e tempo para sua realização (Stumm *et al.*, 1999).

Outros testes genéticos moleculares têm sido desenvolvidos para detectar a deleção, como a hibridização genômica comparativa [*comparative genomic hybridization* (CGH)] (Bar-Shira *et al.*, 2006) e a *multiplex ligation-*

dependent probe amplification (MLPA) (Vorstman *et al.*, 2006). A avaliação molecular de polimorfismos também é um método para o diagnóstico desta síndrome sendo mais rápido, barato e fácil. Gioli-Pereira *et al.* (2006) pesquisando polimorfismos de nucleotídeo único também localizados no cromossomo 22q11.2, verificaram que na população brasileira esses marcadores são suficientes para determinar a perda de heterozigose em até 92% dos casos. Infelizmente, a maior parte dos exames moleculares não é comercializada e são utilizados somente em pesquisas em centros universitários.

Na prática o primeiro passo para avaliar o paciente com suspeita desta deleção e avaliá-lo pela citogenética com cariótipo de alta resolução e se o exame resultar em normalidade, realizar em seguida o teste de FISH.

É importante ressaltar que a SDG pode estar presente em outras situações que não na presença da deleção do 22q11.2, como nas deleções do braço curto do cromossomo 10, do braço longo do cromossomo 4, na síndrome alcoólica fetal e na embriopatia pelo ácido retinóico (Thomas *et al.*, 1997; Robin e Shprintzen, 2005).

Um dos primeiros critérios para definir a SDG foi proposto pela Sociedade Internacional de Imunologia e Imunodeficiência (Conley *et al.*, 1999) e definia SDG nas seguintes situações:

- Número de células CD3⁺ menor que 500 cels/mm³ acompanhado de pelo menos duas das seguintes características clínicas:
 - Malformações cardíacas conotruncais (tetralogia de Fallot, interrupção do arco aórtico, truncus arteriosus e presença de subclávia aberrante à direita).

- Hipocalcemia, com duração de três semanas, com necessidade de tratamento.
- Presença da deleção do cromossomo 22q11.2.

O diagnóstico é provável quando o número de células CD3⁺ é menor que 1500 cels/mm³ acompanhado da presença de deleção do cromossomo 22q11.2 e possível quando o número de células CD3⁺ é menor que 1500 cels/mm³ acompanhado de pelo uma das seguintes características clínicas:

- Malformações cardíacas.
- Hipocalcemia com duração de três semanas com necessidade de tratamento.
- Face dismórfica.

Mais recentemente, segundo Notarangelo *et al.* (2006), a mesma sociedade propôs novos critérios para o diagnóstico da SDG:

- Número de células T circulantes diminuído ou normal, número de células B circulantes normais e níveis séricos de imunoglobulinas diminuídos ou normais e associação com duas ou três das seguintes características clínicas:
 - Hipoparatiroidismo.
 - Malformações cardíacas conotruncais.
 - Dismorfismo facial.
 - Detecção da deleção do cromossomo 22q11.2 ou 10p.

1.4 Manifestações Clínicas

A SDG tem um amplo espectro de fenótipos, já tendo sido descritas mais de 180 manifestações clínicas, físicas e comportamentais (Anexo A). Não há uma manifestação que ocorra em 100% dos casos assim como não há descrição de algum caso em que todas as manifestações estão presentes. Vários órgãos e sistemas podem estar comprometidos e muitas vezes os pacientes necessitam de seguimento multidisciplinar. Alguns dos achados ocorrem com uma frequência menor que outros, porém, maior que na população em geral (Shprintzen *et al.*, 1997).

Uma variedade de anormalidades ocorre com frequência maior na SDG, como baixa estatura em relação à estatura dos pais (mais comum no sexo feminino), redundância das pálpebras superiores, congestão suborbital, alterações da orelha, escoliose, pés chatos com encurtamento dos tendões do calcanhar, criptorquidia e anormalidades anais (Shprintzen, 2008).

Os pacientes com SDG apresentam uma face característica, porém nem sempre perceptível nos primeiros anos de vida. A manifestação facial mais comum é o aumento do comprimento vertical da face, que pode estar presente precocemente. Este aumento é decorrente do aumento vertical maxilar, que ocasiona um aumento do comprimento do terço inferior da face. O comprimento do nariz também está aumentado. A base e as narinas são pequenas, porém, há um preenchimento sobre a ponte nasal, caracterizando um nariz em forma cilíndrica ou tubular. Retrognatia é encontrada em cerca de um terço dos pacientes (Arvystas e Shprintzen, 1984).

Nos pacientes com SDG, a angulação da base craniana é obtusa, rodando a fossa glenóidea e a articulação temporo-mandibular posteriormente. A mandíbula se posiciona posteriormente na fossa glenóidea e apesar do seu tamanho e forma normal, está posicionada retrusa em relação à maxila e é responsável pela alta frequência da seqüência de Robin nos pacientes com SDG.

A presença do *hooding* (encapuzamento) das pálpebras superiores é outro achado morfológico facial importante e é causado pelo mesmo defeito de rotação na base do crânio. Devido a esta rotação a fronte tende a se posicionar mais para frente que o normal, criando esta redundância de tecido nas pálpebras superiores. Hipertelorismo leve também é comum, forçando uma inclinação da fissura palpebral.

O padrão de formação das orelhas é peculiar nos pacientes com SDG, sendo os achados mais comuns o aumento da hélix, orelha protusa e em forma de copo. Microtia e estreitamento do canal auricular externo também são descritos (Arvystas e Shprintzen, 1984).

Em indivíduos mais velhos, as manifestações faciais se tornam mais óbvias porque a maioria das anormalidades vai se desenvolvendo e se instalando com o decorrer do tempo.

As alterações comportamentais, e psiquiátricas também são mais perceptíveis com o passar do tempo e atrasos da aquisição de linguagem, de desenvolvimento cognitivo, imaturidade social, impulsividade, ansiedade e fobias podem aparecer mais tardiamente (Shprintzen, 2008).

Determinadas manifestações clínicas podem ser usadas como forte indício da presença da SDG. As malformações cardíacas estão presentes em aproximadamente 70% dos casos e entre elas, as alterações conotruncais. Assim, os pacientes com SDG constituem uma alta porcentagem destes doentes: mais da metade dos casos de interrupção do arco aórtico tipo B, 15% das tetralogias de Fallot, quase metade dos casos de *truncus arteriosus* e aproximadamente 35% dos defeitos septais ventriculares, sendo que a malformação cardíaca mais comum encontrada nos pacientes com SDG são os defeitos septais ventriculares (Goldmuntz *et al.*, 1998; Sullivan, 2004).

As anormalidades palatais também estão presentes em grande número de pacientes com SDG. Inicialmente foi descrito que as fendas palatinas eram o defeito mais comum (Shprintzen *et al.*, 1978). Atualmente observou-se que as formas ocultas de fenda palatina, como as fendas de submucosa, são as mais freqüentes (Shprintzen 1982, 2000, 2005a e 2005b). Estas fendas são difíceis de diagnosticar sem instrumental adequado como a nasofaringoscopia, assim como assimetrias faríngeas e de palato. Muitos pacientes com disfonia ou fala anasalada não tinham diagnóstico confirmado devido a esta dificuldade técnica.

Anormalidades vasculares da faringe são umas das muitas anormalidades vasculares associadas à SDG (MacKenzie-Stepner *et al.*, 1987; Mitnick *et al.*, 1996; Tatum *et al.*, 2002). Outros vasos alterados são os vasos torácicos, do pescoço e vasculatura cerebral. Uma hipótese para o grande número de alterações vasculares nos pacientes com SDG é o

comprometimento seqüencial no desenvolvimento, suportada por vários autores o que gerou várias denominações tais como seqüência de Robin, de DiGeorge ou de Potter (Shprintzen, 2008).

Outras anormalidades estruturais têm sido relatadas em praticamente todo órgão ou sistema tais como: olhos, rins, trato gastrointestinal, medula espinal, tireóide, paratireóide e outras. Atualmente, as anormalidades que mais têm atraído atenção são as doenças de desenvolvimento e as comportamentais. O primeiro relato de distúrbio psiquiátrico na SDG foi em 1992 (Shprintzen e Singer, 1992) simultaneamente à identificação da deleção do cromossomo 22q.11.2 (Scambler *et al.*, 1992). Esta coincidência despertou grande interesse científico, pois pela primeira vez notou-se que uma alteração genética poderia influenciar fenótipos psiquiátricos. Vários genes têm sido estudados como responsáveis por este fenômeno, entre eles o COMT (Lachman *et al.*, 1996; Graf *et al.*, 2001; Gothelf *et al.*, 2005) e o Proline dehydrogenase (PRODH) (Shprintzen, 2005a; Li *et al.*, 2004). Anormalidades estruturais cerebrais como redução da substância branca e cinzenta, alterações do corpo caloso, da amígdala e do núcleo caudado foram evidenciadas em pacientes com SDG (Eliez *et al.*, 2001; Kates *et al.*, 2006; Debbane *et al.*, 2006). Até o momento as bases biológicas para a compreensão das doenças psiquiátricas na SDG não foram completamente elucidadas, porém, esta síndrome é um excelente modelo para estudo, especialmente para as psicoses humanas. Nos pacientes com SDG a ocorrência de psicose é 25 vezes mais freqüente que na população geral.

Dificuldade na aquisição de linguagem também é uma manifestação comum nos pacientes com SDG, afetando 75% dos casos, sendo relacionada com os distúrbios do palato e da articulação têmporo-mandibular (Shprintzen, 2008).

1.5 Alterações Imunológicas na SDG

A síndrome de DiGeorge é a entidade clínica que foi inicialmente descrita como o exemplo da imunodeficiência celular, com baixo número de linfócitos T, baixa resposta aos mitógenos e maior susceptibilidade a infecções por agentes intracelulares, como vírus e fungos (DiGeorge *et al.*, 1967).

O espectro de anormalidades no número de células T em pacientes com SDG é muito grande. Os pacientes podem apresentar número e função normal das células T (aproximadamente 20%), baixo número de células T e talvez alguma alteração na função proliferativa das células T e por último, ausência de células T. Este último grupo representa menos de 1% e são designados como SDG completa, tendo uma verdadeira aplasia tímica necessitando de transplante de timo.

A maioria dos pacientes apresenta uma diminuição leve ou moderada do número de células T circulantes, são os designados SDG parcial. Estes cursam com infecções de vias aéreas superiores, otite média e sinusites. Em alguns casos, pneumonias e sibilância podem ocorrer e podem estar associados com síndrome aspirativa ou com cardiopatias (Kobrinisky e Sullivan, 2007).

Muitos centros têm medido a função tímica em pacientes diagnosticados como portadores de SDG baseados nas características clínicas ou na deleção do cromossomo 22q11.2. Apesar de grande parte dos pacientes apresentarem ausência do timo ou hipoplasia tímica a maioria não apresenta defeitos imunológicos (Bastian *et al.*, 1989; Junker e Driscoll, 1995; Ryan *et al.*, 1997; Kornfel *et al.*, 2000; Kanaya *et al.*, 2006).

A função das células T geralmente é normal quando medida pela incorporação de timidina marcada para quantificar a proliferação após a estimulação com mitógenos (Bastian *et al.*, 1989; Junker e Driscoll, 1995; Sullivan *et al.*, 1999; Chinen *et al.*, 2003; Kanaya *et al.*, 2006). Outra característica é a expansão numérica proporcional das células B (CD19⁺) e células “natural killer” (CD16⁺CD56⁺) em pacientes quando comparados aos controles (Sullivan *et al.*, 1999; Kornfel *et al.*, 2000; Jawad *et al.*, 2001; Kanaya *et al.*, 2006).

Quanto à imunidade humoral, a maioria dos estudos demonstra que não está afetada pela hipoplasia tímica. As concentrações séricas de Imunoglobulina G (IgG) e imunoglobulina M (IgM) e a produção de IgG específica contra as toxinas diftéricas e tetânicas são normais e o número de pacientes com deficiência de Imunoglobulina A (IgA) parece ser maior nos pacientes com SDG que a população geral (Junker e Driscoll, 1995; Smith *et al.*, 1998; Gennery *et al.*, 2002; Chinen *et al.*, 2003; Finocchi *et al.*, 2006).

Defeitos na imunidade celular podem reduzir a produção de anticorpos para alguns antígenos, como os polissacarídicos (Schubert *et al.*,

1992; Gennery *et al.*, 2002; Cancrini *et al.*, 2005). O mecanismo básico deste defeito pode ser a diminuição do repertório das famílias de receptor das células T (Pierdominici *et al.*, 2003).

Outra consequência desta restrição do repertório de receptor de células T é um aumento na frequência de infecções e nas doenças autoimunes. Algumas doenças e manifestações autoimunes como a artrite reumatóide juvenil, trombocitopenia autoimune e Fenômeno de Raynaud são mais frequentes nos pacientes com SDG que na população geral (Rasmussen *et al.*, 1996; Sullivan *et al.*, 1997; Ryan *et al.*, 1997; Gennery *et al.*, 2002).

1.6 Avaliação da Função Tímica

O timo é um órgão linfóide primário essencial para a ontogenia das células T. É no timo que os receptores de células T sofrem seu amadurecimento e são selecionados (Rezzani *et al.*, 2008). Por meio dos modelos murinos de timectomia realizados pelo grupo de Miller, a função tímica foi delineada, não somente como um órgão produtor de linfócitos e responsável pelo desenvolvimento da imunidade, mas como órgão fundamental do desenvolvimento de tolerância central (Miller *et al.*, 1967). Acredita-se que o timo desempenhe duas funções fundamentais para indução e para manutenção da tolerância, conforme descrito abaixo:

- a) Seleção negativa de clones de linfócitos T potencialmente auto-reativos, que parecem ser responsáveis pelo principal mecanismo da chamada tolerância central.

- b) Produção das células T regulatórias CD4⁺FoxP3⁺ (Treg), consideradas como elementos fundamentais para a manutenção da chamada tolerância periférica. As células Treg controlariam a ação de linfócitos autorreativos que escaparam da seleção negativa do timo, anteriormente mencionada (Coutinho *et al.*, 2005).

A avaliação da função tímica é de extrema importância para os pacientes com SDG, e várias metodologias já foram descritas para medi-la adequadamente.

O tamanho do timo parece não se correlacionar com o grau de imunodeficiência e com o número de células T circulantes. Existem evidências da presença microscópica remanescente de células epiteliais tímicas (Bale e Sotelo-Avila, 1993), da produção extra-tímica de células T (Collard *et al.*, 1999) e, da presença do timo em locais não habituais (Shah *et al.*, 2001).

A quantidade de tecido tímico pode ser avaliada por exames de imagens como a ressonância magnética ou tomografia computadorizada. Entretanto estes métodos não permitem uma quantificação adequada e podem falhar nos casos em que o timo não está na posição habitual ou na presença de timo acessório.

O método mais efetivo é medir com marcadores biológicos como células recém emigradas do timo (RTE), nível de timulina e mais recentemente a contagem dos colcoar (TRECs).

A maioria das células recém saídas do timo tem como marcadores de superfície CD45RA e CD62L e são chamadas de células T “naive”.

Quantificando as células T naïve e a proporção de células naïve e de memória, é possível medir aproximadamente a produção tímica.

Timulina é um hormônio secretado pelas células epiteliais tímicas, sendo essencial à maturação tímica, cuja atividade biológica depende de sua ligação com zinco. Este órgão apresenta várias funções, tais como: indução da expressão de vários marcadores de células T, promoção da citotoxicidade alogênica do linfócito T e suas funções supressoras, e estimulação da produção de IL-12 e age nos estágios iniciais e finais da diferenciação do linfócito T.

Baixas concentrações de timulina foram encontradas em pacientes com SDG provavelmente decorrente da hipoplasia tímica (Cunningham-Rundles *et al.*, 1981) e estudos têm sido realizados para compreender melhor o papel do sistema neuro-endócrino com a integridade e função tímica (Consolini *et al.*, 2000).

Recentemente, situações onde as células T estão comprometidas, como a infecção por vírus da imunodeficiência humana, têm mostrado que a medida da função tímica pode ser comparável com a produção de novas células T, também conhecidas como células recém-emigradas do timo (Zhang *et al.*, 1999). Na população de células T de interesse, estas células podem ser estimadas a partir da frequência de excisões circulares de rearranjos de receptor de células T, em inglês, *TCR rearrangement excision circles* ou TREC (Fugimoto e Yamagashi, 1987; Hazenberg *et al.*, 2001). Os estudos de TREC exploram uma característica intrínseca do processo de rearranjo do TCR no timo. Para gerar a diversidade do repertório de TCRs,

durante o seu desenvolvimento no timo, as células T precursoras sofrem o processo de rearranjo gênico, fase em que ocorrem excisões de segmentos de DNA, dando origem a pequenos círculos de DNA epissomal (Ribeiro e Perelson, 2007). Estes produtos são estáveis, exclusivos das células T e foram denominados TRECs. Desta maneira, tem sido proposto que a mensuração das proporções de células T periféricas contendo TRECs representaria uma estimativa da função tímica recente.

Embora haja na literatura estudos sobre a quantificação do TREC em populações normais e mesmo em pacientes com Síndrome de DiGeorge, as casuísticas são restritas e não há nenhum estudo em população brasileira. Devido a alta prevalência desta condição e com a disponibilidade da quantificação dos TRECs, o objetivo deste estudo foi avaliar a função tímica em pacientes com SDG por meio de dados clínicos e laboratoriais de rotina associados à mensuração do TREC em células mononucleares periféricas em pacientes portadores da SDG.

Este estudo faz parte do projeto temático da FAPESP nº2008/58238-4 e constitui um subprojeto do Projeto Avaliação Funcional do Timo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Avaliar a função tímica em pacientes portadores da síndrome de DiGeorge pela quantificação do número de cópias de TREC nas células mononucleares de sangue periférico.

2.2 Objetivos específicos

- a) Descrever as alterações fenótípicas nos pacientes portadores da Síndrome de DiGeorge.
- b) Descrever as alterações imunológicas nos pacientes portadores da Síndrome de DiGeorge.

3 MÉTODOS

3.1 Casuística

Foram incluídos 14 pacientes portadores da SDG em acompanhamento na Unidade de Alergia e Imunologia, do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICr-HC-FMUSP) e ou admitidos de agosto de 2008 até um ano após o início do estudo. Foi também realizada uma busca ativa destes pacientes tanto na Unidade de Genética do Instituto da Criança, como no Grupo de Cirurgia Cardíaca Pediátrica do Instituto do Coração (INCOR).

Todos os pacientes preencheram os seguintes os critérios de inclusão, porposto por Notarangelo *et al.* (2006):

- Número de células T circulantes diminuído ou normal, número de células B circulantes normais e níveis séricos de imunoglobulinas diminuídos ou normais e associação com as seguintes características clínicas:
 - Hipoparatiroidismo.
 - Malformações cardíacas conotruncais.
 - Dismorfismo facial.
 - Detecção da deleção do cromossomo 22q11.2 ou 10p.

- Concordância por escrito do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos responsáveis e/ou pacientes (Anexo B).

Como não existem dados nacionais de normalidade para a avaliação dos TREC's, foi constituído um grupo controle de crianças saudáveis emparelhados por idade e sexo com os pacientes com SDG, na proporção de um controle para cada paciente.

No grupo controle foram incluídas crianças de outras unidades do Departamento de Pediatria, em acompanhamento de puericultura ou por distúrbios não imunológicos e que não estavam sob tratamento com imunossupressores, ou qualquer outra droga que interferisse na resposta imune (Anexo C). Estes pacientes ou seus responsáveis também assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido específico para o grupo controle (Anexo D).

Critérios de Exclusão

- a) Impedimento em comparecer às visitas ambulatoriais ou as coletas de sangue para os exames laboratoriais.
- b) Outras síndromes clínicas e/ou genéticas com características fenotípicas e/ou laboratoriais não confirmados com SDG.
- c) Não concordância em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Todos os pacientes foram submetidos a um protocolo padronizado, onde foram incluídos dados clínico-epidemiológicos tais como: dados pessoais, antecedentes pessoais, antecedentes familiares, presença de

cardiopatias, alterações faciais, dismorfismos, distúrbios neurológicos ou de comportamento, endocrinopatias, infecções recorrentes e outras comorbidades associadas (Anexo E).

Os pacientes foram examinados clinicamente pela pesquisadora, onde foram anotadas suas medidas antropométricas. As curvas de peso e estatura foram comparadas com as curvas segundo NCHS/CDC (2000). Também foram avaliados pelo grupo de Genética Médica do ICr-HC-FMUSP quanto às características faciais e outras anormalidades físicas.

3.2 Métodos

Os pacientes, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram atendidos no ambulatório pela própria pesquisadora, onde foi realizado o exame clínico com o preenchimento do protocolo de pesquisa e realização do exame físico e, posteriormente, foram encaminhados para realização dos exames laboratoriais.

O sangue para realização da avaliação laboratorial foi coletado por punção venosa antecubital com o paciente em jejum, sem sintomatologia infecciosa ou uso de antibióticos na semana da coleta. Foram colhidos cerca de 20 mL de sangue em crianças maiores de três anos e 10 mL em crianças menores, desde que não houvesse contra-indicação para tal. Todas as coletas foram agendadas previamente e realizadas na sala de coleta do ICr-HC-FMUSP, conforme as precauções universais.

As análises foram realizadas no Laboratório do ICr-HC-FMUSP (LIM 36), nos Laboratórios de Imunologia Clínica e Alergia (LIM 60) e Dermatologia

(LIM 56) do HC-FMUSP e no Laboratório de Reumatologia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de Medicina (EPM-UNIFESP).

Foram realizados exames laboratoriais para avaliação das funções endocrinológica e imunológica incluindo a função tímica.

Na Avaliação endocrinológica foram feitos os seguintes exames e técnicas laboratoriais:

- Dosagem sérica de triiodotironina (T3), tiroxina (T4), tiroxina livre (T4 livre) e TSH - método de imunoensaio automatizado.
- Anticorpos antitireoglobulina e antiperoxidase - Imunofluorescência indireta.
- Paratormônio - método imunoenzimático quimioluminescente automatizado.
- Cálcio iônico - Coleta em tubo seco com gel separador e utilizado método automatizado, por meio de eletrodo íon seletivo¹.
- Cálcio total - Coleta em tubo seco com gel separador e dosado por método automatizado colorimétrico².
- Fósforo - Coleta em tubo seco com gel separador e dosado por método automatizado colorimétrico.

Para a avaliação imunológica foram realizados os seguintes exames:

- Hemograma completo - Procedeu-se à coleta de sangue do paciente em tubo EDTA (anticoagulante) e após uma análise automatizada³.

¹ Aparelho AVL 9180 - Electrolyte analyzer - Roche Diagnostics.

² COBAS integra 400 - Roche.

³ Equipamento ADVIA 120 Hematology System - Siemens Diagnósticos.

- Dosagem sérica de imunoglobulinas IgG, IgM e IgA - Realizada por nefelometria, utilizando-se anticorpos de coelho anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM⁴). Os valores foram comparados com os valores obtidos da curva da população brasileira segundo Fujimura (1990).
- Resposta vacinal para sarampo - Realizada pela técnica de imunofluorescência indireta apenas em crianças que haviam recebido a vacina específica. A presença de anticorpos do tipo IgG indicou resposta vacinal.
- Resposta vacinal para hepatite B - Método de *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Foram considerados títulos protetores valores acima de 10,0 UI/mL pelo menos dois meses após a vacinação completa para o vírus da hepatite B.
- Subpopulação e ativação de linfócitos - Analisados em citômetro de fluxo⁵ em sangue periférico, segundo protocolo padronizado relatado a seguir. Reagentes usados com anticorpos monoclonais para CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD3⁺CD4⁺CD28⁺, CD3⁺CD8⁺CD28⁺, CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺, CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺⁶. Para aquisição dos dados foi utilizado o *Software* Cellquest⁷ e para análise dos dados o *Software* FlowJo 8.7⁸.
- Resposta proliferativa de linfócitos com mitógenos e antígenos – fitohemaglutinina A, *pokweed* mitógeno, candidina e antígeno tetânico.

⁴ Behringwerck, AG Marburg, Germany.

⁵ Canto, Becton Dickinson, Cowley, Reino Unido.

⁶ BD Biosciences, Oxford.

⁷ BD Biosciences.

⁸ Tree Star, Ashland.

3.2.1 Quantificações do número de cópias de TREC (em células mononucleares do sangue periférico)

3.2.2.1 Isolamento de células mononucleares do sangue periférico

A técnica foi realizada no LIM 36 mediante o seguinte protocolo:

- Colher 5 mL de sangue em tubos com ácido etilênico tetra acético (EDTA).
- Diluir o sangue 1:2 em PBS estéril em tubo Falcon (15 mL).
- Colocar cuidadosamente 10 mL de sangue diluído sobre 5 mL de Ficoll Paque Plus em um novo tubo Falcon (15 mL).
- Centrifugar a 1800 rpm por 30 minutos, temperatura ambiente (TA).
- Colher a nuvem de células mononucleares com pipeta Pasteur estéril e colocar em um novo tubo Falcon (15 mL); completar o volume para 10 mL com PBS e homogeneizar manualmente.
- Centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos, em TA.
- Desprezar o sobrenadante e adicionar 10 mL de PBS, homogeneizar manualmente.
- Centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos, em TA.
- Desprezar sobrenadante e realizar a extração do DNA genômico, ou congelar o botão celular à 20°C para posterior extração do DNA genômico.

3.2.2.2 Extração do DNA genômico

A técnica foi realizada mediante o seguinte protocolo:

- Descongelar o *pellet* isolado de células mononucleares e congelado anteriormente e ressuspender o sobrenadante com 3 mL de núcleo lysis.
- Agitar vigorosamente para lise nuclear.
- Acrescentar 5 µL de proteinase K (na parede do tubo) e 300 µL de SDS 10%.
- Misturar cuidadosamente por inversão.
- Incubar por 24/48 h a 37°C.
- Acrescentar 1 mL de NaCl 6 Mol e agitar vigorosamente por 15 minutos (a solução deve ficar leitosa).
- Centrifugar por 20 minutos a 2500 rpm em centrífuga refrigerada (4°C)
- Transferir o sobrenadante para outro tubo Falcon (15 mL)
- Centrifugar novamente por 15 minutos a 2500 rpm em centrífuga refrigerada.
- Transferir o sobrenadante para outro tubo Falcon contendo duas vezes o volume de etanol absoluto.
- Retirar o DNA com auxílio de uma ponteira (o DNA ficará visível como um emaranhado viscoso) e transferi-lo para um tubo de Eppendorf.
- Acrescentar 500 µL de etanol 70%.
- Centrifugar a 13.500 rpm durante 5 minutos a 4°C.

- Desprezar o sobrenadante e deixar o tudo de Eppendorf aberto para secagem do tubo ou colocar no concentrador.
- Acrescentar 400µL de TE.

3.2.2.3 Avaliação qualitativa e quantitativa de DNA

Para quantificação e verificação do grau de pureza do DNA foi utilizado o espectrofotômetro⁹ em comprimento de onda de 260 nm e 280 nm.

3.2.2.4 Detecção e quantificação de TREC por PCR quantitativo em tempo real

A quantificação da concentração do TREC será determinada pelo método de reação em cadeia de polimerase (PCR) quantitativo em tempo real, utilizando o equipamento RotorGene-3000¹⁰.

O princípio do método de PCR em tempo real baseia-se na detecção e quantificação de fluorescência associada ao acúmulo progressivo do DNA amplificado durante os sucessivos ciclos da reação. O agente fluorescente utilizado, o SYBR Green, liga-se especificamente ao DNA de dupla fita gerado durante a reação de PCR e passa a ser capaz de emitir fluorescência. À medida que as cópias de DNA de dupla fita são geradas, acumulam-se moléculas de SYBR Green capazes de emitir fluorescência, que atinge então níveis mensuráveis. Os tubos são irradiados por diodos que emitem uma luz com alto poder de excitar o fluorocromo envolvido na

⁹ NanoDrop ND-1000

¹⁰ Corbett Research Pty Ltd, Sydney, Austrália

reação e a fluorescência produzida em cada tubo é detectada utilizando-se uma câmara de captação de fluorescência acoplada a um programa de computador específico.

A PCR em tempo real será realizada utilizando-se, para um volume total de 25 µL: 100ng de DNA de cada amostra, 500 nMol de cada *primer* (senso e anti-senso) e 12,5 µL de reagente SYBR Green¹¹. Os *primers* utilizados para a reação de PCR para sjTREC serão; senso 5'-CCCTTTCAACCATGCTGACA-3', anti-senso 5'-AGGTGCCTATGCATCACCGT-3'. O tamanho do produto gerado é de 74 bp.

As condições de ciclagem da PCR serão: 10 minutos a 95°C, seguidos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 59°C, e 30 segundos a 72°C por 45 ciclos consecutivos. Os ensaios serão realizados em duplicata em um rotor de 72 poços incluindo a série de diluições do padrão do TREC plasmidial.

Reações utilizando *primers* para a β -actina (400 nM para cada *primer* e 50 ng de DNA) serão realizadas com todas as amostras, nas mesmas condições que as reações para TREC. Os *primers* utilizados serão: senso 5'-AAGATGACCCAGGTGAGTGG-3', anti-senso 5'-AACGGCAGAGAAGAGAA CCA-3' (Fugimoto e Yamagashi, 1987).

¹¹ SYBR Green PCR Master Mix - Applied Biosystems, Foster City, USA

3.3.2 Subpopulação de linfócitos T (em células mononucleares do sangue periférico)

3.3.2.1 Congelamento de células mononucleares provenientes do sangue periférico (CMSP)

Após a realização dos cálculos para determinação da concentração celular:

- Centrifugar os tubos contendo CMSP a 500xg por 10 minutos a 18-20°C.
- Elaborar as etiquetas apropriadas para cada amostra utilizando o programa PIMACO instalado no computador principal do laboratório. Nas etiquetas deverá constar: o número do código do voluntário, as iniciais, a sigla CMSP ou a sigla na língua inglesa (PBMC), o número da visita correspondente e a data de preparo
- Etiquetar o número correspondente de criotubos e envolver em fita adesiva.
- Colocar os criotubos na caixa StrataCooler que deve estar previamente resfriada a 4°C.
- Armazenar a caixa StrataCooler com os criotubos na geladeira até o momento do congelamento.
- No momento do congelamento, retirar a caixa StrataCooler e o meio de congelamento da geladeira.
- Destampar os criotubos mantendo as tampas viradas para cima.
- Após o término da centrifugação, verificar o *pellet* de células e desprezar o sobrenadante em um recipiente contendo hipoclorito a 2%.

- Resuspender o pellet e com o auxílio de uma pipeta estéril.
- Aspirar o volume necessário do frasco de meio de congelamento para cada amostra, considere 1 mL de meio de congelamento para cada 1×10^6 > sete células.
- Transferir o meio de congelamento para o tubo com células e homogeneíze bem com o auxílio da pipeta.
- Transfira 1 mL desta solução celular (meio de congelamento com as células) em cada criotubo correspondente.
- Tampar os criotubos e armazene a caixa StrataCooler no freezer - 70°C por no máximo uma semana.
- Transfira os criotubos para o galão de nitrogênio líquido, conforme a localização determinada na planilha do nitrogênio.
- Anotar as informações contidas nas etiquetas dos criotubos: identificação, iniciais e visita, na planilha do nitrogênio.

3.3.2.2 Descongelamento de células mononucleares provenientes do sangue periférico

Procedimento deve ser realizado em cabine de segurança biológica esterilizada por 15 minutos com luz ultravioleta (U.V.).

- Trabalhar com células sempre utilizando recipiente com gelo, inclusive para armazenar os reagentes.
- Separar um tubo de 15 mL previamente identificado e adicionar 10 mL de meio de cultura R10.

- Retirar os criotubos com CMSP a serem descongelados do galão de nitrogênio líquido e mantê-los no gelo até o momento do descongelamento.
- Descongelar uma amostra de cada vez rapidamente, com agitação gentil no Banho-Maria a 37°C até que a amostra se desgrude do fundo o criotubo, pare quando ainda houver um pedaço de gelo visível no criotubo.
- Adicionar 1 mL de meio de cultura R10 gotejando lentamente no criotubo.
- Transfirir para o tubo de 15 mL respectivo com R10 gotejando lentamente e retirar do criotubo um pouco de R10 e de amostra juntamente.
- Retirar o restante de amostra do criotubo e transfirir para o mesmo tubo com R10.
- Lavar o criotubo com mais 1 mL de R10 (principalmente as paredes do criotubo) e transferir para o tubo respectivo;
- Centrifugar a 600xg por 10 minutos.
- Desprezar o sobrenadante e com o auxílio de uma ponteira e retirar cuidadosamente o restante de R10 do tubo.
- Adicionar 2 mL de R10 no tubo para realizar a contagem celular, homogeneizar bem com o auxílio da ponteira.
- Preparar um tubo Eppendorf previamente identificado com 90 µl de Azul de Tripan (1%) e adicionar 10 µl da suspensão celular, homogeneizar bem.

- Transfira 10 µl desta diluição celular na câmara de Neubauer coberta com uma lamínula, para realizar a contagem das células viáveis.
- Desconsiderar durante a contagem as células os que estiverem azuis, pois estas estão inviables para a realização de experimentos.
- Realizar a contagem considerando os quatro maiores quadrantes, totalizando (n de células) quadrantes em cada extremidade;
- Realizar os cálculos: média da contagem de células nos quatro quadrantes (some os valores dos quatro quadrantes e divida por quatro) x 10 (valor da diluição do Azul de Tripán) x 2 (volume resuspendido com R10) x 10.000 (valor de correção da câmara de Neubauer); o resultado totalizará o número de células que possui no volume da suspensão celular.
- Definir e acertar a concentração celular que deverá ser utilizada no experimento.
- Identificar a placa que irá utilizar e transfira o volume necessário da suspensão celular para realizar o experimento.

3.3.2.3 Imunofenotipagem de Superfície Celular

- Após o descongelamento transferir 200 µl da suspensão celular para um well da placa (ajustar concentração celular).
- Levar para centrifugação durante 5 minutos a 1500 rpm 4°C, para retirar todo o meio restante.
- Verificar a formação de *pellet*.
- Desprezar o sobrenadante na pia de uma só vez.

- Acrescentar 170 µl de Macs Buffer em cada well.
- Levar para centrifuga por 5 minutos a 1500 rpm 4°C.
- Verificar novamente a formação de *pellet*.
- Desprezar o sobrenadante na pia vertendo a placa de uma vez o volume final de cada *well* é de 50 µl, logo, devemos somar o volume total de monoclonais e subtrair de 50 µl para encontrar o volume de buffer que será acrescentado a cada *well*.
- Pipetar os respectivos volumes de monoclonais de acordo com o painel.
- Levar para a geladeira ao abrigo da luz e deixar incubando durante 30 minutos.
- Centrifugar a 1500 rpm, 5 minutos 4°C para sedimentar.
- Acrescentar 170 µl de MACS Buffer e homogeneizar cada *well*.
- Realizar duas lavagens (1500 rpm, 5 minutos 4°C).
- Verificar a formação de *pellet*.
- Acrescentar 100 µl de PFA 1%, homogeneizar a amostra e transferir para o microtubo de citometro.
- Colocar em uma caixa apropriada com tampa ao abrigo da luz na geladeira.
- As amostras devem ser lidas em até sete dias.

3.2.3 Análise Estatística

Inicialmente foi feita uma análise descritiva dos dados nos diferentes grupos de pacientes descritos. Como a quantificação de cópias de TREC por μg de DNA não apresenta uma distribuição normal e os pacientes foram emparelhados aos controles saudáveis por idade e sexo, foi utilizado o teste de Wilcoxon para fins comparativos.

Foi utilizado o programa estatístico SPSS versão 13.0 e a significância estatística foi considerada para $p < 0,05$.

3.3 Aspectos Éticos

Este projeto recebeu a aprovação da Comissão de Ética e Pesquisa do Departamento de Pediatria (CAPPesq) sob nº 0832-08 (Anexo F). Os pacientes e/ou seus responsáveis leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, permitindo a sua inclusão no protocolo, ficando o pesquisador responsável disponível para quaisquer dúvidas pertinentes ao estudo.

4 RESULTADOS

Foram incluídos 14 pacientes (8M: 6F) com idade variando entre oito meses a 18a11m, mediana de 8a10m (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Distribuição por faixa etária dos pacientes com SDG (n = 14)

O Quadro 1 mostra os critérios de diagnósticos presentes nos pacientes analisados. Dois pacientes (pacientes 8 e 13), nos quais não se detectou a deleção do cromossomo 22q11.2, foram incluídos, pois apresentavam todos os outros critérios: hipocalcemia, dismorfismo facial, baixo número de células T e um deles, malformação cardíaca conotruncal.

Quadro 1 - Critérios diagnósticos presentes nos pacientes com SDG (n = 14)

Número do paciente	Iniciais	Sexo	Idade (anos e meses)	Deleção do 22q11	Malformação cardíaca	Hipocalcemia	Dismorfismo facial	Baixo número de células T
1	AMMC	M	17a2m	Positivo	CIV	NÃO	SIM	NÃO
2	IGBS	M	11 a 10m	Positivo	Tetralogia de Fallot	NÃO	SIM	NÃO
3	VCC	M	2a4m	Positivo	Tetralogia de Fallot	SIM	SIM	SIM
4	PLRM	M	18a	Positivo	Transposição de grandes vasos	NÃO	NÃO	SIM
5	MASS	M	8a9m	Positivo	Tetralogia de Fallot	NÃO	NÃO	NÃO
6	LCNS	F	5a5m	Positivo	CIV	NÃO	SIM	NÃO
7	ASI	M	9a9m	Positivo	Tetralogia de Fallot	NÃO	NÃO	NÃO
8	RNS	M	10a1m	Negativo	Interrupção do arco aórtico + CIV+ CIA	SIM	SIM	SIM
9	IRC	F	8a8m	Positivo	NÃO	NÃO	SIM	NÃO
10	CSS	F	18a11m	Positivo	Tetralogia de Fallot	NÃO	SIM	NÃO
11	TPS	M	8m	Positivo	CIV	SIM	SIM	SIM
12	KCS	F	12a11m	Positivo	Atresia da artéria pulmonar	NÃO	SIM	NÃO
13	ABARS	F	5a2m	Negativo	Não	SIM	SIM	SIM
14	MLQ	M	8a1m	Positivo	Truncus arteriosus CIV+ CIA	SIM	SIM	NÃO

CIV = Comunicação inter-atrial; CIV = Comunicação interventricular

4.1 Achados Clínicos

As malformações cardíacas isoladas ou associadas foram o achado mais freqüente, presente em 12 pacientes (86%), assim distribuídos: cinco casos de tetralogia de Fallot, cinco de comunicação intraventricular (CIV) sendo três isoladas e duas delas associadas com comunicação inter-atrial (CIA), uma transposição de grandes vasos isolada, uma interrupção do arco aórtico associado a CIV e CIA, um truncus arteriosus associado a CIV e CIA e uma atresia de artéria pulmonar isolada (Gráfico 2). Apenas quatro pacientes não necessitaram correção cirúrgica para estas malformações.

Gráfico 2 - Preseça de cardiopatias nos pacientes com SDG (n = 14)

O dismorfismo facial foi observado em 11 pacientes (85,7%), sendo as alterações orofaciais as mais comuns (Gráfico 3). A paciente ABARS (paciente 13) apresentou a maioria dos dismorfismos relativos à SDG, exceto estrabismo, sendo o motivo principal para o encaminhamento e

investigação. As alterações orofaciais mais prevalentes, isoladas ou em associação, foram: 64,3% pacientes (9/14) apresentavam microstomia e 57,2% dos pacientes (8/14) alterações no palato e micrognatia, assim como baixa estatura.

Dedos alongados foram observados em 50% dos pacientes, fâscies alongados, implantação baixa das orelhas e malformações dentárias em 42,8% (6/14), hipertelorismo em 35,8% (5/14), estrabismo em 21,5% (3/14). O paciente VCC (paciente 3) apresentou pé torto congênito corrigido cirurgicamente.

Gráfico 3 - Presença de dismorfismos nos pacientes com SDG (n = 14)

Os distúrbios neurológicos apresentados foram convulsões decorrentes da hipocalcemia em cinco pacientes, atraso na aquisição da linguagem em três pacientes e além destes, atrofia cerebral (n = 1) e

meningomielocele (n = 1). Quanto aos distúrbios psiquiátricos, dois pacientes desenvolveram quadro de depressão e necessitando de uso de medicação e atualmente, continuam em terapia sem tratamento medicamentoso.

Dos pacientes que apresentaram infecções de repetição, especialmente pneumonias de repetição, somente uma paciente não apresenta cardiopatia que poderia contribuir para as infecções pulmonares. A maioria dos processos infecciosos ocorreu no primeiro ano de vida, antes da correção cirúrgica da cardiopatia. Atualmente todos os pacientes não apresentam mais quaisquer processos infecciosos de repetição, porém realizam fisioterapia respiratória devido a seqüelas pulmonares decorrentes dos processos infecciosos anteriores. Os achados clínicos dos pacientes estão descritos no Quadro 2

Quadro 2 - Características clínicas dos pacientes com SDG (n = 14)

Característica/Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8*	9	10	11	12	13*	14
Fenótipo														
Baixa estatura	+		+			+		+	+				+	
Hipertelorismo	+							+					+	
Estrabismo	+					+		+			+			
Face alongada	+		+			+		+					+	
Fenda palpebral	+		+			+		+					+	
Nariz alongado	+							+					+	
Defeitos palatais	+		+			+		+		+			+	
Micrognatia	+		+			+		+			+		+	
Microstomia	+		+			+		+			+		+	
Dedos alongados		+	+			+		+			+		+	
Implantação baixa das orelhas		+	+			+		+			+		+	
Alterações dentárias			+			+		+			+		+	
Pé torto congênito			+			+		+			+		+	
Cardiopatias														
Tetralogia de Fallot		+	+		+	+	+			+				
CIV														
CIV+CIA	+							+						
Interrupção do arco aórtico				+										+
Transposição dos grandes vasos														
Truncus arteriosus														
Atresia de artéria pulmonar														
Distúrbios metabólicos														
Hipocalcemia			+					+			+		+	
Hipotireoidismo			+											
Distúrbios neuropsiquiátricos														
Depressão	+												+	
Convulsões													+	
Meningocele	+					+								
Atrofia cerebral														
Atraso na aquisição da linguagem			+						+					
Infecções de repetição														
Pneumonias	8x	3x	1x	2x	4x	4x							22x	
Sinusites		4x												

* pacientes sem detecção da deleção do 22q.11

4.2 Achados Laboratoriais

A hipocalcemia esteve presente em cinco pacientes (35,8%) e foi relacionada como causa de convulsões no período neonatal. Hipotireoidismo neonatal esteve associado com hipocalcemia em um paciente desde o nascimento.

Todos os pacientes realizaram avaliação funcional das glândulas tireóide e paratireóide. Somente um paciente apresentou hipotireoidismo e atualmente faz reposição hormonal. Não foi detectada a presença de autoanticorpos para a tireóide nos pacientes avaliados. O comprometimento da paratireóide foi detectado em quatro pacientes, incluindo o paciente com hipotireoidismo, sendo que atualmente os pacientes necessitam reposição hormonal (Quadro 3).

Quadro 3 - Avaliação laboratorial dos pacientes com SDG (n = 14)

Paciente	T4-livre (ng/dL)	TSH (μU/mL)	Anti-tireoglobulina (U/mL)	Anti-peroxidase (U/mL)	Parato-hormônio (pg /mL)	Cálcio iônico (mmol/L)	Cálcio (mg/dL)	Fósforo (mg/dL)
1	0,98	1,49	ND	ND	36,00	1,18	NR	6,1
2	1,03	1,55	ND	ND	34,00	NR	8,9	4,9
3	1,16	2,98	ND	ND	9,00	1,29	8,9	6,6
4	1,37	2,04	ND	ND	59,00	NR	NR	NR
5	1,41	5,29	ND	ND	48,00	NR	8,9	5,3
6	1,30	3,01	ND	ND	53,00	1,29	NR	4,4
7	1,23	1,15	ND	ND	62,00	NR	8,5	5,2
8	1,08	4,53	ND	ND	8,00	1,22	NR	5,5
9	1,22	5,30	ND	ND	48,00	1,25	NR	5,6
10	1,07	1,75	ND	ND	NR	NR	8,4	4,3
11	1,23	0,90	ND	ND	15,00	1,09	NR	7,0
12	1,48	3,81	ND	ND	58,00	1,16	NR	4,5
13	1,21	4,83	ND	ND	13,00	1,18	8,6	6,5
14	1,16	0,76	ND	ND	39,00	1,31	NR	4,7

ND = Não detectado; NR = Não realizado

4.3 Alterações Imunológicas

A avaliação da imunidade humoral detectou cinco pacientes com concentrações séricas de IgM abaixo de dois desvios padrão para a idade e na avaliação da anticorpopogênese, somente 21,5% dos pacientes (3/14) apresentaram concentrações pós-vacinais acima de 10,0 UI/mL, para vírus da hepatite B. Em relação ao sarampo, 28,6% (4/14) apresentaram concentrações pós-vacinais consideradas como protetoras para sarampo. O Quadro 4 mostra os valores da dosagem de Imunoglobulinas e dos anticorpos anti-sarampo e anticorpos do antígeno de superfície para vírus da hepatite B (anti-HBs) nos 14 pacientes com SDG, sendo destacados os valores alterados.

Quadro 4 - Dados laboratoriais referentes à imunidade humoral dos pacientes com SDG (n = 14)

Paciente	Idade (anos)	IgG (mg/dL)	IgM (mg/dL)	IgA (mg/dL)	Ac anti-sarampo	Anti-HBs (U/ml)
1	17	1145	59	323	Reagente	1,0
2	11	1061	30	189	Reagente	0,0
3	2	1169	47	95	Ausente	8,0
4	4	1443	160	127	Ausente	0,0
5	8	1279	79	192	Reagente	1,34
6	5	661	119	93	Reagente	0,0
7	9	1184	68	164	Reagente	2,18
8	10	1070	147	57	Reagente	0,0
9	8	1449	106	248	Reagente	71,0
10	18	1235	44	253	Reagente	0,0
11	1	496	54	39	Ausente	>1000
12	12	1287	57	295	Reagente	8,0
13	5	1310	54	91	Reagente	48,0
14	8	723	296	57	Ausente	8,0

4.4 Avaliação da Função Tímica

A quantificação do número de cópias de TREC em células mononucleares em sangue periférico foi realizada em 12 pacientes, emparelhados com seus controles (Quadro 5). Foram realizados testes estatísticos para avaliar sua distribuição e diferenças estatísticas entre as populações avaliadas. A distribuição das cópias de TREC nos pacientes e seus controles não apresentam uma distribuição normal e foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa entre as medianas de TREC dos pacientes e dos controles conforme Tabela 1 e Gráfico 4.

Quadro 5 - Quantidade de cópias de TREC/ μ g DNA em 12 pacientes com SDG e seus controles emparelhados por idade e sexo

Nº do Paciente	Paciente (μg DNA)	Controle (μg DNA)
1	3980,00	53250,00
2	3340,00	120416,67
3	3200,00	19583,33
4	4300,00	16416,67
5	4040,00	24483,33
6	4300,00	29850,00
7	3205,00	28866,67
8	3010,00	24483,33
9	12190,00	24833,33
10	1175,00	22333,33
12	1450,00	26550,00
14	2290,00	157508,33

Tabela 1 - Número de cópias de TREC em 12 pacientes com SDG

TREC (n=12)	Mediana	Valor máximo	Valor mínimo	P*
Pacientes	3272,5	12190,0	1175,0	0,002
Controles	25691,6	157508,3	16416,7	

* Teste de Wilcoxon

Gráfico 4 - Distribuição do número de cópias de TREC em 12 pacientes com SDG e seus controles

4.5 Avaliação da Subpopulação e Ativação de Células T

Todos os pacientes apresentaram número de leucócitos totais dentro da normalidade, dois com linfócitos totais abaixo dos valores normais, nove com CD3⁺, 5 com CD8⁺ e quatro com CD4⁺ também abaixo dos valores normais para a idade, destacados no Quadro 6.

Quadro 6 - Números de leucócitos, linfócitos e subpopulação de linfócitos nos pacientes com SDG (n = 14)

Paciente	Idade (anos)	Leucócitos cels/ μ L	Linfócitos totais cels/ μ L	CD3 ⁺ cels/mm ³	CD3 ⁺ /CD4 ⁺ cels/mm ³	CD3 ⁺ /CD8 ⁺ cels/mm ³
1	17	9600	4224	2995	861	1165
2	11	9500	1995	991	921	580
3	2	2900	1319	664	623	278
4	4	5900	1705	666	739	562
5	8	6400	2368	1588	786	1079
6	5	13400	3618	1772	1892	908
7	9	4900	2450	1060	874	387
8	10	7500	1762	690	722	366
9	8	8000	1760	885	723	408
10	8	9400	1269	914	440	300
11	1	12400	3162	NR	NR	NR
12	12	5780	1982	838	782	491
13	5	6050	2202	1229	699	386
14	8	5100	2096	1343	1023	583

NR = Não realizado

Em relação ao painel de ativação de linfócitos T, foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as medianas de CD3⁺CD4⁺CD28⁺, CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺, CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺ dos pacientes e dos controles (Wilcoxon bicaudal) (Gráficos de 5 a 7); para os valores de CD3⁺CD8⁺CD28⁺ as diferenças encontradas entre as medianas não foram estatisticamente significantes conforme Tabela 2.

Gráfico 5 - Distribuição de percentual de células $CD3^+CD4^+CD28^+$ em 12 pacientes com SDG e seus controles

Gráfico 6 - Distribuição de percentual de células $CD3^+CD4^+HLA-DR^+$ em 12 pacientes com SDG e seus controles

Gráfico 7 - Distribuição de percentual de células CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺ em 12 pacientes com SDG e seus controles

Tabela 2 - Valores do painel de ativação de células T de sangue periférico em 12 pacientes com SDG e seus controles

Marcadores de superfície	Mediana	Valor máximo	Valor Mínimo	Wilcoxon (p)
CD3⁺CD4⁺CD28⁺				
(P)	92,7	98,6	76,3	0,008*
(C)	98,0	99,3	85,4	
CD3⁺CD8⁺CD28⁺				
(P)	30,1	66,0	13,7	0,071
(C)	40,4	62,7	16,4	
CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺				
(P)	19,3	30,5	6,1	0,002*
(C)	7,3	13,4	3,6	
CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺				
(P)	30,9	43,3	8,4	0,002*
(C)	10,3	23,0	3,9	

P= Pacientes; C= Controles

4.6 Avaliação da Resposta Proliferativa à Mitógenos

A resposta proliferativa à mitógenos foi realizada em três pacientes com resposta normal e está representada na Quadro 7.

Quadro 7 - Resposta proliferativa à mitógenos em três pacientes com SDG

Resposta linfoproliferativa	Paciente 6 (ie)	Paciente 8 (ie)	Paciente 14 (ie)
PHA	268,7	334,4	47,6
PWM	57,8	47,4	26,7

ie= Índice de proliferação

5 DISCUSSÃO

O estudo da SDG se reveste de diferentes particularidades que vão desde a sua nomenclatura, seu amplo espectro fenotípico até todas as implicações clínicas e imunológicas advindas desta síndrome.

As síndromes de deleção do cromossomo 22q11.2 tais como síndrome Velo-Cardio-Facial, síndrome de Shprintzen e síndrome de DiGeorge entre outras, apresentam muitas manifestações clínicas com expressões variadas e diferentes graus de comprometimento (Shprintzen *et al.*, 2005). Esta variabilidade de nomenclatura fez com que estas síndromes fossem descritas separadamente recebendo a denominação do autor de sua descrição. Com o avanço da metodologia diagnóstica na área da genética, percebeu-se posteriormente, que elas apresentavam como denominador comum, a deleção do cromossomo 22q11.2. Até o momento, elas são agrupadas como “Síndromes da deleção do cromossomo 22q11.2” por dificuldades de uma denominação única (Goodship *et al.*, 1998).

Na descrição original feita por DiGeorge *et al.* (1967), as características clínicas principais eram malformações cardíacas, hipoparatiroidismo e a ausência de timo. Desde então, observou-se uma grande variedade de expressões fenotípicas que variam da ausência total do timo, com uma grave linfopenia, até uma hipoplasia mais leve, sem acometimento tímico aparente.

Como os pacientes com SDG apresentam comprometimento tímico em graus variados, ficou evidente a necessidade de uma avaliação da função tímica objetiva e eficaz que pudesse classificar adequadamente estes pacientes e a partir desta avaliação, direcionar um tratamento terapêutico e preventivo mais adequado às necessidades individuais de cada paciente.

A deleção do cromossomo 22q11.2 é a deleção cromossômica humana mais comum e sua incidência é estimada em torno de 1:3000 nascidos vivos (Goodship *et al.*, 1998). Nesta casuística, realizada dentro de um hospital universitário considerado centro de referência para imunodeficiências primárias, o número de pacientes disponíveis para inclusão no estudo foi pequeno, demonstrando a dificuldade de diagnóstico e de reconhecimento, entre os médicos, da caracterização fenotípica associada à deleção do cromossomo 22q11.2.

Na maioria das imunodeficiências primárias, há uma predominância de acometimento no sexo masculino, devido ao tipo de herança genética ligada ao cromossomo X, diferente da Síndrome de DiGeorge onde esta predominância não ocorre. Neste estudo, observou-se uma distribuição semelhante entre os sexos, como descrito na literatura (Gennery *et al.*, 2002; Chinen *et al.*, 2003; Kobrinsky e Sullivan, 2007).

Outro fato que corrobora a dificuldade do diagnóstico da SDG é a distribuição da faixa etária dos pacientes, com pacientes mais velhos, apresentando uma mediana de idade de 8a10m, sendo somente 28,5% com idade abaixo dos quatro anos.

Atualmente, já foram descritas cerca de 180 manifestações clínicas, tanto físicas como comportamentais relacionadas à SDG e não há nenhuma manifestação característica que ocorra em 100% dos casos (Shprintzen *et al.*, 1997). O fenótipo facial, embora fácil de ser reconhecido, pode ser sutil em alguns pacientes, sendo perceptível com o crescimento anatômico da face e conseqüente acentuação destas características.

Para o diagnóstico da SDG é necessária a presença de um conjunto de achados clínicos e/ou da deleção do cromossomo 22q11.2. A pesquisa da deleção somente acabará sendo realizada, se houver suspeita de que o paciente possa ser portador da síndrome.

Durante a seleção dos pacientes deste estudo, dois não apresentavam a deleção do cromossomo 22q11.2. Um dos pacientes apresentava interrupção do arco aórtico associado à comunicação interventricular e à comunicação inter-atrial e além destas malformações cardíacas, outras características clínico-laboratoriais da síndrome como: alterações faciais com microstomia, hipertelorismo, dedos alongados, hipocalcemia neonatal e linfopenia.

A outra paciente, não cardiopata, apresentava fenda palatina grave, necessitando várias cirurgias corretivas, número total de linfócitos e subpopulações CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ abaixo dos valores normais para a idade, além de hipocalcemia neonatal.

A ausência da deleção do cromossomo 22q11.2 não exclui o diagnóstico da SDG, pois alguns pacientes não apresentam as deleções características. Alguns apresentam translocação do cromossomo 20 para o

22 ou deleções de outros cromossomos, tais como do 10p13 e 18q21 (Merscher *et al.*, 2001).

A *International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee*, propôs critérios que auxiliassem o diagnóstico da SDG. Estes critérios valorizam as alterações imunológicas, considerando o número de células T circulantes associadas com as características clínicas mais freqüentes, tais como as malformações cardíacas conotruncais e dismorfismo facial, além da detecção da deleção do cromossomo 22q11.2 (Notarangelo *et al.*, 2006).

Oskarsdottir *et al.* (2005) realizaram um estudo retrospectivo em 100 pacientes com SDG e relataram os achados clínicos encontrados nos pacientes que foram diagnosticados antes e depois dos dois anos de idade. O atraso no diagnóstico também foi relatado nesse estudo, pois no grupo avaliado, a idade do diagnóstico foi distribuída da seguinte maneira: 26% no período neonatal, 17% entre 2-5 anos, 41% entre 6-12 anos e 16% na adolescência, entre 13-16 anos. A mediana de idade ao diagnóstico de todo o grupo foi de 6,7 anos. A cardiopatia foi o principal achado que levou ao diagnóstico de SDG em qualquer faixa etária. Para as crianças que foram diagnosticadas antes dos dois anos, os problemas infecciosos e hipoplasia tímica seguida pela hipocalcemia foram os achados mais frequentes após as cardiopatias. Para o grupo que teve o diagnóstico mais tardio, as infecções recorrentes seguida dos distúrbios do palato e atrasos na aquisição da linguagem foram os mais importantes. O dismorfismo facial ficou em última colocação para os dois grupos,

confirmando a idéia de que estas alterações vão se estabelecendo no decorrer dos anos.

As malformações cardíacas ocorrem entre os pacientes com SDG com uma frequência que varia de 49% a 83%. Entre as cardiopatias congênitas, as conotruncais são as mais comuns destacando-se a Tetralogia de Fallot. Nos pacientes brasileiros aqui descritos, prevaleceu a Tetralogia de Fallot em metade dos pacientes em acordo com a literatura (Goldmuntz *et al.*, 1998; Sullivan, 2004).

Há recomendações para que se proceda à investigação da presença da deleção do cromossomo 22q.11 em todos os pacientes que apresentam malformações cardíacas, tais como Tetralogia de Fallot, interrupção do arco aórtico, defeitos septais e truncus arteriosus. Esta é uma das razões porque centros de cardiologia pediátrica apresentam casuísticas, nas quais o diagnóstico é feito mais precocemente (Sullivan *et al.*, 1999; Chinen *et al.*, 2003). Esta provavelmente ainda não é uma conduta habitual em nosso meio, pois o número de casos submetidos à cirurgia cardíaca para correção de defeitos conotruncais é bastante significativo e o número de encaminhamentos para nossa unidade e relatos de casuísticas com SDG, ainda escasso.

As cardiopatias congênitas foram os achados clínicos mais encontrados seguidas pelo dismorfismo facial. Nesta faixa etária, as alterações da boca, olhos, dentes, assim como a percepção do comprometimento do desenvolvimento da fala e comportamentais, são mais facilmente notados (Butts, 2008). Em escolares, é necessária uma busca por

alterações que podem estar presentes em pacientes com SDG com frequência mais elevada que na população geral, tais como baixa estatura, dedos longos, rosto alongado e nariz em forma cilíndrica. A face dos pacientes com SDG pode ser bem característica e nesta casuística foi o principal dismorfismo presente. Microstomia, alterações de palato e micrognatia foram os achados mais freqüentemente encontrados.

Os distúrbios comportamentais, neurológicos e psiquiátricos observados nos pacientes, também são frequentes nesta síndrome. Dois pacientes aqui descritos apresentaram quadro de depressão com necessidade de medicação. Ambos pacientes realizam psicoterapia, mas apesar do tratamento não apresentam bom rendimento escolar e ainda mantém inadequação social dentro da família e no convívio com outras pessoas. Alguns autores (Gothelf *et al.*, 2007a e 2007b) recomendam o seguimento destes pacientes por um longo período, pois, quadros de depressão e ansiedade podem antecipar o estabelecimento de quadros de psicoses.

Na descrição inicial, a SDG era reconhecida especialmente pelo quadro de imunodeficiência grave ao nascimento. Outras características clínicas presentes não eram valorizadas. O aparecimento precoce de infecções de repetição ou graves decorrentes da imunodeficiência não é mais considerado a característica clínica principal destes pacientes, pois somente os pacientes com SDG completa são aqueles com maior susceptibilidade a infecções. O número de linfócitos pode estar dentro dos valores normais nos casos de comprometimento tímico mais leve e as alterações imunológicas podem se manifestar somente na idade adulta.

Com o conhecimento genético e molecular da fisiopatologia desta síndrome, outras manifestações clínicas ganharam destaque, tais como a presença de hipocalcemia, hipotireoidismo neonatal e malformações cardíacas, mesmo na ausência de dismorfismo facial ou da presença de quadros infecciosos de repetição ou graves.

Ao nascimento, podem ocorrer dificuldades na amamentação por fatores diversos como hipotonia, problemas cardíacos e obstrução de vias aéreas secundária a malformações na mandíbula. Muitas manifestações não são detectadas ao nascimento ou na infância, pois a SDG é uma doença evolutiva com achados clínicos que podem aparecer tardiamente no decorrer da vida. Pelo menos 30% dos casos não têm malformações cardíacas e muitos pacientes com malformações cardíacas têm anomalias “silenciosas” como a presença do arco aórtico direcionado para a direita, sem manifestações clínicas evidentes, sendo seu diagnóstico somente realizado se houver uma busca específica (Shprintzen, 2008).

Por esta razão, pediatras neonatologistas devem estar atentos para a presença, ao nascimento, de achados como cardiopatias congênitas, destacando-se os defeitos conotruncais, hipocalcemia no período neonatal e para possíveis defeitos da região palatal. Estas alterações podem ser identificadas logo ao nascimento, enquanto que as outras manifestações como os dismorfismos faciais e os comprometimentos do desenvolvimento pômbero-estatural e cognitivo, podem se manifestar tardiamente e atrasar o diagnóstico. Estes fatos podem explicar porque, apesar da alta incidência da síndrome, há poucos pacientes em seguimento com diagnóstico confirmado.

Na SDG completa, onde o número de células T é praticamente ausente, a suspeita de imunodeficiência é mais precoce e decorrente dos processos infecciosos com uma evolução mais grave, levando a uma busca ativa pelo diagnóstico (Markert *et al.*, 1998). Nos casos de SDG parcial ou incompleta, o número de linfócitos pode até estar dentro da faixa de normalidade ou discretamente diminuído, com suas funções preservadas e o quadro de imunodeficiência pode não estar presente nos primeiros anos de vida. Nestes pacientes, os outros achados associados à linfopenia são fundamentais para o diagnóstico precoce.

Nos pacientes avaliados, a pneumonia de repetição foi a queixa mais referida e um paciente, além das pneumonias, apresentou também sinusites de repetição. Os processos infecciosos ocorreram nos primeiros anos de vida antes da correção cirúrgica cardíaca, sendo provavelmente a cardiopatia congênita o principal fato para a ocorrência destes processos.

O paciente mais acometido por pneumonias de repetição apresentou 22 episódios de pneumonias até os três anos de idade e completou há dois meses, correção cirúrgica da fenda palatina. Com este tratamento, os processos infecciosos cessaram. Provavelmente as causas das pneumonias eram aspiração e distúrbios de deglutição, além do número reduzido de CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ em relação aos valores normais para a idade.

Os defeitos palatais são um dos achados mais importantes nas síndromes de deleção do cromossomo 22q11.2 e, ao lado das cardiopatias, são importantes causas de morbimortalidade nos doentes (Shprintzen, 2005). Estes defeitos nem sempre estão evidentes ao nascimento, pois as

fendas podem ser da região de submucosa e não detectáveis sem instrumental adequado. A presença de dificuldades na amamentação, ganho de peso, hipotonia, distúrbios de deglutição e atraso na aquisição da linguagem são indicativos da presença de alguma alteração na região palatal e deve ser investigada por um especialista.

O acometimento das glândulas paratireóides e tireóides é muito comum nesta síndrome já que as mesmas são acometidas na embriogênese durante a formação dos terceiro e quarto arcos faríngeos. A hipocalcemia neonatal é outro achado clínico de extrema importância para o diagnóstico de SDG com uma frequência variável de 17% a 60% entre os pacientes e a recomendação de investigação para a deleção do 22q11.2 também é válida para este achado.

Entre os pacientes avaliados observou-se hipocalcemia e um único caso associado ao hipotireoidismo. Para estes pacientes, a presença da hipocalcemia foi importante, pois permitiu o diagnóstico da SDG mais precocemente e no caso de um paciente, que não apresentava a deleção, confirmou o diagnóstico de SDG.

O comprometimento tanto da tireóide como da paratireóide pode ser decorrente da presença de auto-anticorpos, mas, nos pacientes aqui descritos não se observou este achado apesar da faixa etária mais elevada, onde poderiam ser encontrados auto-anticorpos, conforme sugerido pela literatura.

Sedivá *et al.* (2005) acompanharam o desenvolvimento da maturação das células tímicas em 34 pacientes com SDG com idade entre quatro dias e

19 anos e não encontraram nenhum auto-anticorpo órgão específico entre seus pacientes. Estes autores especulam se estes auto-anticorpos não aparecem com a progressão da idade.

Gennery *et al.* (2002) relataram, em pacientes com idade entre quatro e 22 anos, a presença de fenômenos auto-imunes em 33% dos seus pacientes, sendo que 30% desses tinham auto-anticorpos detectados e somente 17% apresentavam auto-anticorpos relacionados com doença auto-imune, tais como: vasculite, fenômeno de Raynaud, artrite pauciarticular, trombocitopenia e síndrome de Evan. Outro paciente deste estudo apresentava urticária recorrente e Fenômeno de Raynaud embora não fossem detectados auto-anticorpos. Estes pacientes também apresentavam baixas concentrações séricas de imunoglobulinas e pobre resposta vacinal. Deve ser enfatizada a necessidade de uma avaliação sistemática de fenômenos e doenças autoimunes nos pacientes com SDG conforme observado neste estudo, pois, as doenças detectadas, não o seriam, se não houvesse uma busca ativa por parte dos pesquisadores.

Durante a realização deste estudo, um dos pacientes (paciente 8) desenvolveu um quadro de Eritema Pérmio associado a fenômeno de Raynaud nos dedos de ambas as mãos, sendo necessário o uso de nifedipina para controle dos sintomas. Até o momento, na avaliação laboratorial, nenhum auto-anticorpo foi positivo. Atualmente o paciente faz acompanhamento no serviço de Reumatologia do Instituto da Criança e está sendo observado quanto ao desenvolvimento de doença autoimune.

A frequência de fenômenos autoimunes nos pacientes SDG é maior que na população geral, sendo a artrite reumatóide juvenil, trombocitopenia autoimune e o fenômeno de Raynaud os mais comuns (Rasmussen *et al.*, 1996; Ryan *et al.*, 1997; Sullivan *et al.*, 1997; Kobrinsky e Sullivan, 2007). Discute-se que a frequência aumentada desses achados nestes pacientes pode ser decorrente da diminuição de células T regulatórias, que previnem a formação de auto-anticorpos contra órgãos específicos ou da expansão oligoclonal homeostática compensatória das células T (Pileri *et al.*, 2004).

A SDG apresenta alteração principalmente da imunidade celular, mas atualmente, pela interferência do linfócito T na resposta humoral, a SDG não é mais considerada uma síndrome de deficiência exclusivamente celular. Pacientes com SDG podem apresentar as mais variadas formas clínicas de imunodeficiência combinada.

Os pacientes com SDG geralmente apresentam a imunidade humoral intacta, mas há relatos de deficiência de IgA, resposta vacinal deficiente e até mesmo, hipogamaglobulinemia (Kobrinsky e Sullivan, 2007).

Junker e Driscoll (1995) avaliaram 13 pacientes pediátricos e descreveram as dosagens de imunoglobulinas e resposta vacinal nos pacientes com a idade entre dois e seis anos. Todos os pacientes apresentaram concentrações séricas de imunoglobulinas normais. Para que a produção de IgG específica contra as toxinas tetânicas e diftéricas alcançassem valores normais foi necessário um “*booster*” após a vacinação inicial em três pacientes.

Gennery *et al.* (2002) relataram maior frequência de deficiência de IgA nos pacientes com SDG, quando comparados à população geral, com

variação entre 2% a 30%. Na avaliação humoral realizada nos pacientes não encontramos nenhum paciente portador de deficiência de IgA, porém 50% apresentaram concentrações séricas de IgM abaixo dos valores normais para a idade. Este dado foi semelhante ao encontrado por Finocchi *et al.* (2006) que encontraram 43% dos pacientes com SDG e disgamaglobulinemia, incluindo concentrações séricas de IgM abaixo dos valores normais para a idade e baixos títulos de isohemaglutininas.

Nos estudos apresentados, os pacientes com baixas concentrações séricas de imunoglobulinas também apresentavam quadros de infecções de repetição e infecções graves, sendo que alguns pacientes necessitaram reposição de gamaglobulina endovenosa para controle dos processos infecciosos (Gennery *et al.*, 2002; Finocchi *et al.*, 2006). Nos pacientes aqui descritos, não observamos quadros infecciosos importantes e atualmente não necessitam sequer de profilaxia antimicrobiana. Yel *et al.* (2009) tentaram explicar a ausência dos processos infecciosos nestes pacientes pelo fato de que as concentrações séricas de imunoglobulina IgG estão dentro dos valores normais para a idade e que somente as baixas concentrações séricas de IgM não predis põem aos processos infecciosos.

Defeitos na imunidade celular podem resultar em uma diminuição na produção de anticorpos para alguns antígenos, como sarampo e polissacarídeos. Finochi *et al.* (2006) relatam que 37% dos seus pacientes não responderam para antígenos polissacarídeos. O mecanismo básico deste defeito pode ser a diminuição do repertório das famílias de receptores das células T, pois a diversidade genética destes possibilita que estas

células T reconheçam antígenos específicos (Junker e Driscoll, 1995; Pierdominici *et al.*, 2003; Chinen *et al.*, 2003).

No estudo aqui descrito, houve uma preocupação na avaliação da anticorpopênese nos pacientes com SDG, sendo este um aspecto inédito a se abordado. Uma das hipóteses para este achado foi a fraca resposta vacinal para hepatite B que estes pacientes apresentam ou talvez a perda de memória ao estímulo vacinal, porém, os pacientes que mantiveram concentrações séricas consideradas acima de 10,0 UI/mL apresentam números de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ abaixo dos valores normais para a idade e não encontramos nenhuma correlação entre os outros achados que pudesse explicar este fato.

Nosso propósito é revacinar os pacientes que não apresentam as concentrações séricas protetoras e avaliar a produção de IgG pós-vacinal em quatro semanas e de forma seriada posteriormente. Desse modo, poderemos avaliar mais adequadamente se a redução da produção de anticorpos é causada por falha na resposta T ou perda da memória. Do mesmo modo, a revacinação para sarampo terá que ser avaliada individualmente, pois dependerá do grau do comprometimento de imunodeficiência celular de cada paciente.

A dosagem de TREC foi idealizada inicialmente por Douek *et al.* (1998) para estudar as mudanças na quantidade de células recém emigradas do timo com a idade e nos casos de pacientes com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana. Este estudo chamou a atenção para o fato de que as concentrações de TREC poderiam ser usadas para responder perguntas relacionadas à produção tímica.

Os TRECs são excisões circulares de DNA decorrentes dos rearranjos do receptor de célula T, que ocorre durante a maturação dos timócitos. Estes marcadores podem ser encontrados em timócitos e em células T maduras, mas seu papel nas células não está bem definido. Estes marcadores não se replicam dentro das células nem se duplicam durante a meiose e, conseqüentemente, mantêm-se estáveis durante a divisão celular, permanecendo nas células praticamente durante a vida. Assim, a quantificação de TREC é útil para medir a produção tímica (Hazenberg *et al.*, 2001).

Markert *et al.* (1999) deu início à quantificação de TREC nos pacientes com SDG como avaliação da produção tímica em pacientes com SDG completa após transplante de timo.

Pierdominici *et al.* (2003) avaliaram o repertório de receptores de células T e a produção tímica através da quantificação do TREC em nove pacientes com SDG. Como resultado, encontraram um repertório restrito de receptores de células T, assim como uma diminuição na produção tímica decorrente da redução do número de cópias de TREC quando comparados com seus controles. Entretanto, seus pacientes não relatavam quadros infecciosos e apresentavam boa resposta proliferativa quando estimulados com mitógenos.

Novamente, Markert *et al.* (2004) descreveram cinco pacientes com síndrome de DiGeorge completa, e neste relato para caracterizar a ausência tímica ou aplasia tímica, foi utilizado a quantificação do número de TREC com valores menores que 100 TRECs/100 000 células T como critério de aplasia tímica, ao invés do número de células T. Os autores argumentam

que alguns pacientes com aplasia tímica podem ter um número razoável de células T e boa resposta proliferativa a mitógenos.

Mais recentemente, Lavi *et al.* (2006) questionaram se a quantificação de TREC, associado à contagem do número de células T “naive” e as concentrações de timulina seriam marcadores úteis para correlacionar a função celular e humoral em pacientes com SDG. Em seus resultados, a quantificação do número de TREC foi menor que os controles, o que caracterizou uma hipoplasia tímica. Estes autores recomendam o uso da quantificação de TREC para instituição de esquemas terapêuticos aos pacientes em relação à profilaxia antimicrobiana e também à administração de vacinas com agentes vivos.

Embora haja na literatura estudos sobre a quantificação do TREC em populações normais e mesmo em pacientes com Síndrome de DiGeorge, as casuísticas são restritas e não há nenhum estudo em população brasileira, o que incentivou a realização deste estudo.

Na casuística aqui avaliada os pacientes apresentaram quantidades menores de TREC quando comparados aos seus controles. Apesar da hipoplasia estabelecida, os pacientes não apresentam, atualmente, quadros de infecções de repetição e, na realização de resposta proliferativa com mitógenos em três pacientes, os valores foram normais. Dados de literatura demonstraram que a hipoplasia tímica não tem grande influência na imunidade humoral (Sullivan *et al.*, 1999; Chinen *et al.*, 2003).

A síndrome de DiGeorge está classificada entre as imunodeficiências primárias sindrômicas bem definidas (Notarangelo *et al.*, 2006). No início de

sua descrição, como já foi ressaltada, esta síndrome era o exemplo de imunodeficiência celular, pois com o acometimento tímico, a produção de linfócitos T estaria comprometida. Atualmente sabe-se que as anormalidades da imunidade celular nestes pacientes são variáveis. Aproximadamente 20% dos pacientes apresentam número de células T normais e menos de 1% têm aplasia tímica que necessita cuidados imediatos, como transplante de timo. Os portadores de SDG completa com aplasia tímica, praticamente não têm células T circulantes e este quadro é extremamente grave. Estes pacientes têm risco de desenvolver doença enxerto versus hospedeiro após transfusão de derivados sanguíneos não irradiados e também infecções por agentes oportunistas como *Pneumocystis jiroveci* e citomegalovírus. É necessário o reconhecimento desta condição logo ao nascimento, pois pacientes com número muito baixo de células T não devem receber vacinas com agentes vivos pelo risco de disseminação. No Brasil, a vacina BCG (Bacilo Calmette-Guérin) é realizada, às vezes, ainda no berçário e discute-se a instalação de uma política de saúde que possa realizar uma triagem pré-vacinal entre os pacientes, para que se obtenham dados de alerta para imunodeficiência primária antes do recebimento desta imunização. Neste caso, a história familiar de crianças com óbitos precoces por processos infecciosos e mesmo consangüinidade poderiam nos alertar para a possibilidade de IDP.

A maioria dos pacientes com SDG apresenta uma discreta diminuição dos números de células T circulantes com função celular preservada, quando estimulados com mitógenos ou antígenos.

Muitos estudos reportaram uma leve diminuição do número de células T do tipo CD4⁺ em SDG quando comparados com controles normais da mesma idade (Bastian *et al.*, 1989; Junker e Driscoll, 1995; Sullivan *et al.*, 1999; Kornfel *et al.*, 2000; Jawad *et al.*, 2001; Chinen *et al.*, 2003). A população de células T é menor em pacientes com SDG que os controles saudáveis durante toda a infância, assim como a taxa de declínio do número de células T, pois nos pacientes com síndrome de deleção do cromossomo 22q11.2, a velocidade deste declínio é menor que os controles saudáveis (Sullivan *et al.*, 1999; Chinen *et al.*, 2003; Kanaya *et al.*, 2006). As hipóteses feitas por Kobrynski e Sullivan (2007) para explicar a aparente homeostase tímica, apesar da presença da hipoplasia tímica são:

- Expansão oligoclonal dos linfócitos T para manter o número de linfócitos normal, apesar de apresentarem menor diversidade de repertório de receptores.
- Declínio proporcionalmente menor no número de linfócitos T com o envelhecimento quando comparado à população geral (Kobrynski e Sullivan, 2007).

Na casuística apresentada, o número total de linfócitos estava dentro dos valores da normalidade, exceto dois pacientes que apresentam números discretamente abaixo dos valores normais para a idade. Estes pacientes também apresentam número de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ diminuídos em relação aos valores normais para a idade.

Sullivan *et al.* (1999) realizaram uma análise longitudinal do número de linfócitos no primeiro ano de vida dos pacientes com SDG e destacaram que os linfócitos T do tipo CD8⁺ eram mais afetadas que os CD4⁺.

Nos pacientes desta casuística, este achado também foi notado com um paciente com número de linfócitos T CD4⁺ diminuído enquanto que cinco apresentavam diminuição dos linfócitos T CD8⁺.

Uma possível explicação para que esta diminuição seja mais importante para a linhagem celular CD3⁺CD8⁺ é a limitação do epitélio tímico com nichos pequenos e uma restrição ao desenvolvimento das células CD3⁺CD8⁺. Para que esta hipótese seja bem estabelecida, é necessária uma compreensão melhor do controle genético da homeostase, mecanismo que regula e que pode ser o responsável pela diminuição do compartimento das células CD3⁺CD8⁺ nos pacientes com esta síndrome (Sullivan *et al.*, 1999).

Na avaliação realizada nesta casuística, não houve diferença de idade entre os pacientes com baixo número de células CD3⁺ ou CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺. McLean-Tooke *et al.* (2008) estimaram a velocidade de declínio do número de células T em pacientes com SDG comparadas à crianças saudáveis com a mesma faixa etária. Observaram que os pacientes apresentaram um declínio, com velocidade menor que os controles, proporcional à idade e que as células de memória apresentaram uma proliferação homeostática maior que às células “naive”. Os autores, também mediram a expressão de HLA-DR nos linfócitos T nos pacientes comparados aos seus controles e não encontraram nenhuma diferença relevante. Porém,

quando estes valores foram ajustados para a idade, houve um aumento de expressão de HLA-DR nos pacientes, quando comparados aos seus controles.

Pudemos observar neste estudo, que pacientes com menor idade apresentavam valores menores de células T que os pacientes mais velhos. Uma observação longitudinal com contagem de células seriadas nos mesmos pacientes é necessária para que a velocidade de declínio possa ser avaliada com maior acurácia.

Dados de literatura referem que a expressão de HLA-DR está aumentada nas células T efectoras e de memória quando comparadas com as células “naive” na população em geral e sabendo-se que as células de memória produzem uma proliferação maior quando comparadas com as células “naive”, os autores sugerem que a melhora da linfopenia com o tempo, nos pacientes com SDG, foi devido à uma “proliferação homeostática” mais de células efectoras/memória que de células T “naive”. (Holmes *et al.*, 2005)

Os linfócitos T são ativados quando seus receptores (TCRs) reconhecem e interagem com complexos antigênicos formados por peptídeos derivados de antígenos ligados ao complexo de proteínas MHC classe I ou II presentes na superfície celular das células apresentadoras de antígenos. Para que esta ativação ocorra é necessária a participação de moléculas co-estimulatórias, especialmente o receptor CD28⁺. Em condições fisiológicas a ligação TCR e CD28⁺ é induzida por contato com complexos MHC/peptídeo e com moléculas B7 (ligante do CD28), respectivamente,

presentes nas células apresentadoras de antígeno. A ligação com o TCR ou CD28⁺ com células T maduras induz à proliferação, enquanto que com timócitos imaturos CD4⁺CD8⁺ ocorre rapidamente a apoptose. (Kishimoto e Sprent, 2000).

Este mesmo trabalho demonstra que a seleção negativa para os timócitos duplamente positivos também pode ocorrer na medula do timo com a participação das moléculas de superfície, entre as quais a CD28. Estudos com ratos "*knockout*" para CD28 revelaram defeitos na seleção negativa de timócitos, demonstrando a importância desta molécula para o processo seletivo (Kishimoto e Sprent, 2000).

Na casuística aqui estudada, a presença de maior ativação dos linfócitos T CD4⁺ nos pacientes, quando comparados aos seus controles, pode ser explicada como um mecanismo compensatório pela diminuição numérica destas células. Uma análise do repertório dos receptores de linfócitos T é necessária para que esta hipótese possa ser confirmada.

A presença deste achado nos pacientes com SDG pode ser uma das causas da diminuição do número de cópias de TREC, pois já foi sugerido que esta diminuição seria decorrente do aumento da ativação induzida na divisão celular (Hazenbergh *et al.*, 2000).

Ao fim desta tese, observa-se que os objetivos foram atendidos, mas que surgiram novas perguntas para serem respondidas em relação à SDG. Foi assim que esta linha de pesquisa foi criada na unidade e só este fato, com certeza, trará ganhos aos pacientes e aos pesquisadores. Atualmente, estamos desenvolvendo estudos colaborativos com o Instituto do Coração

para busca ativa destes pacientes e certamente o conhecimento mais amplo deste modelo natural de disfunção tímica acrescentará muito ao conhecimento da função do timo, que ainda é considerado um órgão desconhecido a todos nós imunologistas.

6 CONCLUSÕES

a) A função tímica dos pacientes com SDG, avaliada pela quantificação de TREC em células mononucleares de sangue periférico, mostrou-se reduzida quando comparados a controles pareados por idade e sexo.

b) As alterações fenotípicas mais comuns nos pacientes desta casuística foram: cardiopatias, dismorfismo facial, infecções de repetição pregressas, e distúrbios neuro-psiquiátricos.

c) As alterações imunológicas encontradas nos pacientes desta casuística foram: redução das concentrações séricas de IgM, redução da anticorpopogênese pós vacinação para sarampo e hepatite B, linfopenia, com redução mais acentuada da subpopulação de linfócitos T CD8⁺ e maior expressão de receptores de ativação celular.

7 ANEXOS

Anexo A - Características clínicas em pacientes com deleção do cromossomo 22q11.2

Achados orais/Craniofaciais

1. Fissura palatal, evidente, submucosa ou submucosa oculta
2. Retrognatismo (mandíbula retraída)
3. Base do crânio plana
4. Face de choro assimétrico em lactentes
5. Face assimétrica estruturalmente
6. Face assimétrica funcionalmente
7. Excesso vertical maxilar (face longa)
8. Perfil facial retificado
9. Dentes ausentes congenitamente
10. Pequenos dentes
11. Hipoplasia do esmalte com cárie rampante (dentição decídua)
12. Face flácida hipotônica
13. Comissuras orais para baixo
14. Lábio leporino (raro)
15. Microcefalia
16. Fossa posterior do crânio pequeno

Achados olhos

17. Vasos retinianos tortuosos
18. Congestionamento Suborbital ("olheiras alérgicas")
19. Estrabismo
20. Fissura palpebral estreita (vertical)
21. Embriotoxon Posterior
22. Disco óptico pequeno
23. Nervos córneos proeminentes
24. Catarata
25. Nódulos na íris
26. Coloboma na íris (raro)
27. Coloboma da retina (raro)
28. Olhos pequenos
29. Hipertelorismo orbital
30. Distopia orbital
31. "Hooding" das pálpebras superiores (encapuzamento pálpebras superiores)

Achados de orelha/audição

32. Hélice super dobradas
33. Lóbulos anexados
34. Orelha protuberante
35. Orelhas pequenas
36. Orelhas assimétricas ligeiramente
37. Otite média freqüente
38. Ligeira perda auditiva condutiva
39. Perda auditiva neurosensorial (geralmente unilateral)
40. Marcas auriculares ou poços (raro)
41. Estreitamento do canal auditivo externo

Achados nasais

- 42. Ponte nasal proeminente
- 43. Ponta nasal bulbosa
- 44. Cúpula nasal levemente separado (aparecendo bifida)
- 45. Base alar e narinas estreitadas
- 46. Estreitamento da passagem nasal

Achados cardíacos

- 47. Defeito do septo ventricular
- 48. Defeito do septo atrial
- 49. Atresia ou estenose da pulmonar
- 50. Tetralogia de Fallot
- 51. Arco da aorta para a direita
- 52. Truncus arteriosus
- 53. Persistência do canal arterial
- 54. Interrompida do arco da aorta (tipo B)
- 55. Coarctação da aorta
- 56. Anomalias da válvula aórtica
- 57. Artérias subclávias aberrantes
- 58. Anel vascular
- 59. Origem anômala da artéria carótida
- 60. Transposição dos grandes vasos
- 61. Atresia tricúspide

Anomalias Vasculares

- 62. Deslocamento media das artérias carótidas internas
- 63. Carótidas internas tortuosa, quebrada, ausente ou acessória
- 64. Anomalias da veia jugular
- 65. Ausência de artéria carótida ou vertebral (unilateral)
- 66. Baixa bifurcação da carótida comum
- 67. Artérias vertebrais tortuosas ou quebradas
- 68. Fenômeno de Raynaud
- 69. Veias pequenas
- 70. Anomalias no Círculo de Willis

Achados do cérebro/neurológicos

- 71. Cistos periventricular
- 72. Vermis cerebelar pequeno
- 73. Hipoplasia cerebelar / disgenesia
- 74. Objetos brilhantes não identificados na substância branca (UBOS)
- 75. Hipotonia generalizada
- 76. Ataxia cerebelar
- 77. Convulsões
- 78. Choques
- 79. Espinha bífida/meningomielocele
- 80. Leve atraso no desenvolvimento
- 81. Fissura sylviana alargada

Achados de vias aéreas/faringe/laringe

- 82. A obstrução das vias aéreas na infância
- 83. Adenóides ausentes ou pequenas
- 84. Fenda laríngea (anterior)
- 85. Via aérea faríngea alargada
- 86. Laringomalácia
- 87. Hiperplasia de aritenóides
- 88. Hipotonia faríngea
- 89. Movimento assimétrico da faringe
- 90. Músculos da faringe edemaciados
- 91. Paralisia das pregas vocais unilaterais

Achados gastrointestinais/renais/abdominais

- 92. Rins hipoplásicos, aplásicos ou císticos
- 93. Megacólon Hirschsprung
- 94. Hérnia inguinal
- 95. Hérnia umbilical
- 96. Má rotação do intestino
- 97. Hepatoblastoma
- 98. Hérnia diafragmática
- 99. Anomalias anais (imperfuração, etc.)

Achados esqueleto

- 100. Mãos e pés pequenos
- 101. Dígitos cônicos
- 102. Unhas curtas
- 103. Pele rugosa, avermelhada e escamosa nas mãos e pés
- 104. Morféia
- 105. Contraturas
- 106. Polegares trifalangeais
- 107. Polidactilia (ambos pré e pós-axiais)
- 108. Sindactilia

Problemas na Infância

- 109. Dificuldade de alimentação, falha de crescimento
- 110. Vômitos pelo nariz
- 111. Refluxo gastroesofágico
- 112. Regurgitação nasal
- 113. Irritabilidade
- 114. Constipação crônica (geralmente não Hirschsprung)

Achados na fala/linguagem

- 115. Hipernasalidade grave
- 116. Grave comprometimento da articulação
- 117. Atraso na expressão da linguagem
- 118. Insuficiência velofaríngea (geralmente grave)
- 119. Alterações de linguagem

- 120. A voz aguda
- 121. Rouquidão

Achados cognitivos / aprendizagem

- 122. Dificuldades de aprendizagem (conceito de matemática, leitura compreensão)
- 123. Dificuldade de abstração, pensamento concreto
- 124. Queda nos escores de QI em idade escolar (artefato de teste)
- 125. Intelecto normal limítrofe
- 126. Retardo mental leve
- 127. Déficit de atenção/ hiperatividade

Anomalias diversas

- 128. Dessaturação de oxigênio espontaneamente sem apnéia
- 129. Trombocitopenia
- 130. Doença de Bernard-Soulier
- 131. Artrite reumatóide juvenil

Achados psicológicos /psiquiátricos

- 132. Transtorno afetivo bipolar
- 133. Doença maníaco-depressiva e psicose
- 134. Desordem cíclica de mudança de humor
- 135. Transtorno de humor
- 136. Depressão
- 137. Manias
- 138. Transtorno esquizoafetivo
- 139. Impulsividade
- 140. Apatia
- 141. Distímia, ciclotímia
- 142. Esquizofrenia
- 143. Imaturidade social
- 144. Transtorno obsessivo-compulsivo
- 145. Transtorno de ansiedade generalizada
- 146. Fobias

Achados imunológicos

- 147. Infecções respiratórias superiores de repetição
- 148. Doença das vias aéreas inferiores frequentes (pneumonia, bronquite)
- 149. Diminuição das populações de células T
- 150. Reduzido hormônio tímico
- 151. Hiperreatividade das vias aéreas

Achados geniturinário

- 152. Hipospádia
- 153. Criptorquidismo
- 154. Refluxo Geniturinário

Achados endocrinológicos

- 155. Hipocalcemia
- 156. Hipoparatiroidismo
- 157. Pseudo-Hipoparatiroidismo
- 158. Hipotiroidismo
- 159. Ligeira deficiência de crescimento, baixa estatura relativa
- 160. Timo ausente ou hipoplásico
- 161. Glândula pituitária hipoplásica

Achados do esqueleto/músculos/ ortopédicos

- 162. Escoliose
- 163. Hemivértebras
- 164. Espinha bífida oculta
- 165. Vértebras em borboleta
- 166. Fusão de vértebras (principalmente cervical)
- 167. Nódulos medula espinhal
- 168. Sírix
- 169. Osteopenia
- 170. Anomalia de Sprengel, deformidades da escápula
- 171. Pé torto equinovaro congênito
- 172. Pequenos músculos esqueléticos
- 173. Luxações articulares
- 174. Dor nas pernas crônicas
- 175. Achatamento dos arcos do pé
- 176. Hiperextensibilidade das articulações
- 177. Costelas extra numerária
- 178. Fusão das costelas

Achados pele/tegumento

- 179. Cabelo abundante
- 180. Pele de aspecto fino (padrões venosos facilmente visíveis)

Associações e seqüências secundárias

- 181. A seqüência de Robin
- 182. Seqüência de DiGeorge
- 183. Seqüência Potter
- 184. Associação CHARGE
- 185. Holoprosencefalia

Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos pacientes e responsáveis

Anexo I

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
 DA
 FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
 (Instruções para preenchimento no verso)

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

1. NOME DO PACIENTE :

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Avaliação tímica em pacientes portadores de síndrome de DiGeorge

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Ângela Bueno Ferraz Fomin

CARGO: médica assistente INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 05558

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Pediatria - Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO ☐ RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☒ RISCO MAIOR ☐

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

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 12 meses

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

1. **Justificativa e os objetivos da pesquisa** – Prezados pacientes, pais ou responsáveis, estamos realizando um estudo para avaliar a função do timo em pacientes com síndrome de DiGeorge/Velocardio-facial. Todas as crianças com diagnóstico confirmado desta síndrome serão avaliadas e serão acompanhadas no ambulatório de alergia e imunologia do Instituto da Criança
2. **Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais** - Durante o retorno ambulatorial o paciente será encaminhado para coleta de sangue, um volume de cerca de 5 ml, cuja análise será realizada no Instituto do Coração e no Laboratório de Reumatologia..
3. **Desconfortos e riscos esperados** Quais são os possíveis efeitos colaterais, riscos e desconfortos decorrentes da participação?
O procedimento é simples, rápido, e praticamente isento de riscos. O médico fará seu exame clínico e depois o pessoal da enfermagem fará a coleta de sangue.
4. **Benefícios que poderão ser obtidos** –
Este estudo vai auxiliar na avaliação da função do timo. Pacientes que apresentam mal funcionamento do timo podem apresentar quadros de infecções de repetição ou quadros de doenças auto-imunes. Estas alterações podem se detectadas precocemente e tratadas mais adequadamente.
5. **Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.**
Nenhum

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

1. **Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.**
Quem eu devo contatar caso precisar de mais informações ou ajuda?
Em caso de dúvida sobre o estudo ou a medicação usada entre em contato com os médicos do estudo.
 2. **Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.**
Seu filho precisa participar?
Cabe a você e a seu filho decidir se ele irá ou não participar do estudo. Se você e seu filho decidirem que ele irá participar, vocês dois receberão este Termo de Consentimento Livre e esclarecido para assinar. Se seu filho participar, ele será livre para se retirar do estudo a qualquer tempo e sem fornecer o motivo para tal. Isso não irá afetar o tratamento padrão que seu filho recebe.
Da mesma maneira, o médico do estudo pode decidir que a saída do estudo é o melhor para o seu filho e então ele será retirado do estudo. Por exemplo, se a rinite alérgica de seu filho piorar muito ou se ele não for capaz de seguir todas as instruções fornecidas.
- Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade** –
As informações coletadas serão confidenciais?
Caso você concorde com a participação de seu filho no estudo, as anotações médicas de seu filho serão diretamente verificadas pelo Comitê de Ética e Pesquisa, para checar se o estudo está sendo realizado corretamente. Ao assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido você está dando permissão para que isto seja feito.
Caso você e seu filho decidam que ele irá participar do estudo o médico de família de seu filho (caso ele tenha um) será informado, se vocês concordarem.

As informações coletadas durante o estudo serão arquivadas em um computador, mas não com o nome de seu filho. Somente o médico do estudo irá saber que as informações são relacionadas a seu filho. Os resultados do estudo podem ser publicados na literatura médica, mas a identidade de seu filho não será revelada.

1. Disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

Quais são os custos da participação?

As medicações serão fornecidas pela Instituição e o exame não será cobrado.

Quem eu devo contatar caso precisar de mais informações ou ajuda?

Em caso de qualquer dano relacionado com o estudo ou a qualquer momento em que você ou seu filho tenha quaisquer questões sobre o estudo ou sobre a medicação do estudo, por favor, entre em contato com:

Dra. Ângela Bueno Ferraz Fomin Tel: 8609-8512 ou 3069-8585/ 3069 8512

2. Viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa. -

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

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

São Paulo, de de 200

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

Anexo C - Idade, sexo e emparelhamento dos controles

Controle	Idade	Sexo
1	16	Masculino
2	11	Masculino
3	3	Masculino
4	19	Masculino
5	9	Masculino
6	5	Feminino
7	10	Masculino
8	9	Masculino
9	9	Feminino
10	19	Feminino
12	13	Feminino
14	10	Masculino

Anexo D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos controles e responsáveis

Anexo I

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Instruções para preenchimento no verso)

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

1. NOME DO PACIENTE :

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Avaliação tímica em pacientes portadores de síndrome de DiGeorge

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Ângela Bueno Ferraz Fomin

CARGO: médica assistente INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 65558

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Pediatria - Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO ☐ RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☒ RISCO MAIOR ☐

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

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 12 meses

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

1. **Justificativa e os objetivos da pesquisa** – Prezados pacientes, pais ou responsáveis, estamos realizando um estudo para avaliar a função do timo em pacientes com síndrome de DiGeorge/ Velocardio-facial e também em pacientes saudáveis. Ao aceitar participar deste projeto você ou seu filho estarão colaborando para melhorar a compreensão desta doença e assim os cuidados médicos destes pacientes.
2. **Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais** - Durante sua consulta ambulatorial, o paciente será encaminhado para coleta de sangue, e um volume de cerca de 5 ml será utilizado para realizar este exame, que é realizado no Instituto do Coração e no Laboratório de Reumatologia da Escola Paulista de Medicina.
3. **Desconfortos e riscos esperados** Quais são os possíveis efeitos colaterais, riscos e desconfortos decorrentes da participação?
O procedimento é simples, rápido, e praticamente isento de riscos. O médico fará seu exame clínico e depois o pessoal da enfermagem fará a coleta de sangue.
4. **Benefícios que poderão ser obtidos:**
Este estudo vai auxiliar na avaliação da função do timo. Pacientes que apresentam mal funcionamento do timo podem apresentar quadros de infecções de repetição ou quadros de doenças auto-imunes. Estas alterações podem ser detectadas precocemente e tratadas mais adequadamente.
5. **Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.-**
Nenhum

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

1. **Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.**
Quem eu devo contatar caso precisar de mais informações ou ajuda?
Em caso de dúvida sobre o estudo ou a medicação usada entre em contato com os médicos do estudo.
2. **Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.**
Seu filho precisa participar?
Cabe a você e a seu filho decidir se ele irá ou não participar do estudo. Se você e seu filho decidirem que ele irá participar, vocês dois receberão este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para assinar. Se seu filho participar, ele será livre para se retirar do estudo a qualquer tempo e sem fornecer o motivo para tal. Isso não irá afetar o tratamento padrão que seu filho recebe.
Da mesma maneira, o médico do estudo pode decidir que a saída do estudo é o melhor para o seu filho e então ele será retirado do estudo. Por exemplo, se a rinite alérgica de seu filho piorar muito ou se ele não for capaz de seguir todas as instruções fornecidas.

Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade –

As informações coletadas serão confidenciais?

Caso você concorde com a participação de seu filho no estudo, as anotações médicas de seu filho serão diretamente verificadas pelo Comitê de Ética e Pesquisa, para checar se o estudo está sendo realizado corretamente. Ao assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido você está dando permissão para que isto seja feito.

Caso você e seu filho decidam que ele irá participar do estudo o médico de família de seu filho (caso ele tenha um) será informado, se vocês concordarem.

As informações coletadas durante o estudo serão arquivadas em um computador, mas não com o nome de seu filho. Somente o médico do estudo irá saber que as informações são relacionadas a seu filho. Os

resultados do estudo podem ser publicados na literatura médica, mas a identidade de seu filho não será revelada.

1. Disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

Quais são os custos da participação?

As medicações serão fornecidas pela Instituição e o exame não será cobrado.

Quem eu devo contatar caso precisar de mais informações ou ajuda?

Em caso de qualquer dano relacionado com o estudo ou a qualquer momento em que você ou seu filho tenha quaisquer questões sobre o estudo ou sobre a medicação do estudo, por favor, entre em contato com:

Dra. Ângela Bueno Ferraz Fomin Tel: 8609-8512 ou 3069-8585/ 3069 8512

2. Viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa. -

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

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

São Paulo, de de 200

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

Anexo E - Protocolo

PROTOCOLO DiGeorge Ambulatório IMUNO ICr-HCFMUSP Data preenchimento: __/__/__ NOME: _____ PRONTUÁRIO: _____ Sexo M ☐ F ☐ Cor: _____ DN: __/__/__ Local: _____ Procedência: _____ Mãe: _____ Idade: _____ Pai: _____ Idade: _____ Endereço: _____ Telefone para contato: _____		<div style="border: 1px solid black; width: 150px; height: 50px; margin: 0 auto;"></div>
DIAGNÓSTICOS: 1. _____ 2. _____ 3. _____ 4. _____ 5. _____ 6. _____	MEDICAÇÕES EM USO: _____ _____ _____ _____ _____	
HISTÓRIA : ☐ fenótipo ☐ hipocalcemia ☐ Distúrbios palato ☐ Distúrbios psiquiátricos ☐ Cardiopatia: Motivo da investigação: _____ Critério diagnóstico: _____ Defeito molecular/genético: _____ Idade encaminhamento: _____ Idade início sintomas: _____ Idade diagnóstico definitivo: _____		
ANTECEDENTES PESSOAIS: Neonatal: RNT/ RNPT Peso naso.: _____ Queda coto umb.: _____ Cirurgia cardíaca: _____ Data: _____ Auto-imunidade: _____ desde _____ Neoplasia: _____ desde _____ Vacinas calendário básico: ☐ completo ☐ Incompleto Reações: _____ Vacinas especiais: _____ Outras intercorrências: _____ _____ _____ _____		

INFECÇÕES:

Infecção/Tipo	Idade	Agente isolado/ material cultura	Tratamento medicação/internações	Evolução/Complicações
OMA				
Sinusite				
Pneumonia				
Sepse				
Diarreia				
Meningite				
Abscessos/local:				
Amigdalite				
Outras:				

CONSANGUINIDADE: ☐ NÃO ☐ SIM grau: _____

ANTECEDENTES FAMILIARES pai=1 mãe=2 irmãos=3 avós=4 tios=5 outros=6 _____

Imunodeficiência: tipo _____

Auto-imunidade: ☐ tireoidite ☐ hipoparatiroidismo ☐ D celíaca ☐ diabetes ☐ artrites ☐ LES

☐ anemia megaloblástica ☐ anemia hemolítica ☐ PTI

Neoplasia: tipo _____

Outras: _____

Idade materna ao nasc. ____ G ____ P ____ A ____ Óbitos precoces? ____ Aleitamento ☐ sim ☐ não

Sexo e idade dos irmãos: _____

EXAME FÍSICO: Peso= ____ p ____ Estatura= ____ p ____ IMC ____ M_P_ ou G_P_

Geral: ☐ Baixa estatura ☐ fala anasalada ☐ pescoço curto ☐ dedos longos ☐ sopro cardíaco ☐ escoliose

Fácies: ☐ boca pequena ☐ alteração dentes ☐ hipertelorismo ☐ micrognatia ☐ alteração orelhas

☐ fenda palatina ☐ estrabismo ☐ choro assimétrico

Outras alterações: _____

CONDUTA:

☐ ATB profilático _____ ☐ _____

☐ vigilância auto-imunidade ☐ vigilância neoplasia

Outras: _____

	Data/valores	Data/valores
Hb/leucócito		
Bast/seg		
Linf/mon		
Eos/basof		
Plaquetas		
CD3		
CD4		
CD8		
CD19		
CD56		
CD4/CD8		
CD45 RA		
CD45RO		
Treg		
IgG/IgM		
IgA /IgE		
IgG2		
Ca/P		
paratohorm.		
T3/T4L/TSH		
Glicemia		
Sarampo		
Rubéola		
Hepatite B		

	Data/valores	Data/valores
TREC		
PPD		
CANDIDINA		
TRICOFITINA		
Cultura de Linf Paciente		
Controle		
Ac cardiolipina		
Ac lhota		
Ac microsomal		
Ac insulina		
Anticoag lupic		
FAN / FR		
ANCA		
Ac musc liso		
Ac endotélio		
Ac TPO		
Ac TGL		
HIV		

TIPO	Data/Dados
RX tórax (típo)	
Tomo tórax (típo)	
ECO	
Fundo de Olho	
OUTROS	

[illegible]

EXAMES - INVESTIGAÇÃO SEGUIMENTO

DATA							
Peso							
Estatura							
Hb							
Ht							
Leuc							
Neutrófilos							
Eos							
Linf							
Plaq							
IgG							
IgM							
IgA							
IgE							
IgG2							
AC sarampo							
AC rubéola							
AC HBs							
CD3+							
CD4+							
CD8+							
CD19+							
CD16+							
CD56+							
CD45RA+							
CD45RO+							
PHA							
PWM							
OKT3							
Candidina							
Lise NK							
NBT							
QTX							
DHR							
T3							
T4							
T4L							
TSH							
glicemia							
paratohormonio							
Ca/P							
TREC							

AUTO IMUNIDADE☐ Ac tTG IgA _____☐ HLA DQ2 E DQ8: _____☐ FAN: _____☐ Ac Anti-microsomal: _____☐ Ac Anti-peroxidase: _____☐ Ac anti-insulina: _____☐ Ac anti-endomísio: _____☐ ANCA _____☐ FR _____☐ Ac músculo liso: _____☐ Ac Anti-tireoglobulina _____☐ Ac anti-ilhota: _____

DATA			
MEDICAÇÃO ROTINA			
INFECÇÕES			
INTERNAÇÕES			
ATB TERAPÊUTICO			
OUTRAS INTERCOR RÊNCIAS			
Exame físico – alterações			
EXAMES			
OBS			
EXAMES SOLICITADOS / Justificativa!!	.controle semestral	.controle semestral	.controle semestral
	.controle anual	.controle anual	.controle anual
	.exames especiais	.exames especiais	.exames especiais
CONDUTA			

Anexo F - Aprovação da CAPPesq

Ref.: Carta datada de 24.04.09

Ao**Departamento de Pediatria**

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 05.05.09, tomou conhecimento que o Protocolo de Pesquisa nº **0832/08** intitulado: "**AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO TÍMICA EM PACIENTES PORTADORES DA SÍNDROME DE DIGEORGE**", será **tese de doutorado** da aluna **ANGELA BUENO FERRAZ FORMIM**, tendo como orientadora a **PROFA. DRA. CRISTINA MIUKI JACOB**.

CAPPesq, 05 de maio de 2009.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

8 REFERÊNCIAS

Arvystas M, Shprintzen RJ. Craniofacial morphology in the velocardio-facial syndrome. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1984; 4:39-45.

Bale PM, Sotelo-Avila C. Maldevelopment of the thymus: 34 necropsy and 10 surgical cases, including 7 thymuses medial to the mandible. *Pediatr Path.* 1993; 13:181-90.

Bar-Shira A, Rosner G, Rosner S, Goslstein M, Orr-Urtreger A. Array-based comparative genome hybridization in clinical genetics. *Pediatr Res.* 2006; 60(3):353-8.

Bastian J, Law S, Vogler L, Lawton A, Herrod H, Anderson S, Horowitz S, Hong R. Prediction of persistent immunodeficiency in the DiGeorge anomaly. *J Pediatr.* 1989; 115(3):391-6.

Baumer A, Riegel M, Schinzel A. Non-random asynchronous replication at 22q11.2: favours unequal meiotic crossovers leading to the human 22q11.2 deletion. *J Med Genet.* 2004; 41(6):413-20.

Butts SC. The facial phenotype of the velo-cardio-facial syndrome. *Int JPediatr Otorhinolaryngol.* 2008;73(3):343-50.

Cancrini C, Romiti ML, Finocchi A, Di Casare S, Ciaffi P, Capponi C, Pahwa S, Rossi P. Post-natal ontogenesis of the T-cell receptor CD4 and CD8 Vbeta repertoire and immun function in children with DiGeorge syndrome. *J Clin Immunol*. 2005; 25(3):265-74.

Carlson CH, Sirotkin R, Pandita R, Goldberg J, Mckie R, Wadey SR, Patanjali SR, Weissman SM, Anyane-Yeboah K, Warburton D, Scambler P, Shprintzen R, Kucherlapati R, Marrow BE. Molecular definition of 22q11 deletions in 151 velocardio-facial syndrome patients. *Am J Hum Genet*. 1997; 61(3):620-9.

Centers for Disease Control and Prevention 2000 growth charts for the United States: improvements to the 1977 National Center for Health Statistics. Ogden CL, Kuczmarski RJ, Flegal KM, Mei Z, Guo S, Wei R, Grummer-Strawn LM, Curtin LR, Roche AF, Johnson CL. *Pediatrics*. 2002; 109(1):45-60.

Chinen J, Rosenblatt HM, Smith EO, Shearer WT, Noroski LM. Long-term assessment of T-cell population in DiGeorge syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 111(3):573-9.

Cipollone D, Amati F, Carsetti R, Placid S, Biancolella M, D'Amati G, Novelli G, Siracusa G, Marino B. A multiple retinoic acid antagonist induces conotruncal anomalies, including transposition of the great arteries, in mice. *Cardiovasc Pathol*. 2006; 15(4):194-202.

Collard HR, Boeck A, Mc Laughlin TM, et al. Possible extrathymic development of nonfunctional T cells in a patient with complete DiGeorge syndrome. *Clin Immunol*. 1999; 91:156-62.

Conley ME, Notarangelo LD, Etzioni A. Diagnostic criteria for primary Immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). *Clin Immunol*. 1999; 93(3):190-7.

Consolini R, Legitimo A, Calleri A, Milani M. Distribution of age-related thymulin titres in normal subjects through the course of life. *Clin Exp Immunol*. 2000; 121(3):444-7.

Coutinho A, Caramalho I, Seixas E, Demengeot J. Thymic commitment of regulatory T cells is a pathway of TCR-dependent selection that isolates repertoires undergoing positive or negative selection. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005; 293:43-71.

Cunningham-Rundles C, Cunningham-Rundles S, Iwata T, Incefy G, Garofalo JA, Menendez-Botet C, Lewis V, Twomey JJ, Good RA. Zinc deficiency, depressed thymic hormones, and T lymphocyte dysfunction in patients with hypogammaglobulinemia. *Clin Immunol Immunopathol*. 1981; 21(3):387-96.

Debbane M, Schaer M, Farhoumand R, et al. Hippocampal volume reduction in 22q11.2 deletion syndrome. *Neuropsychologia*. 2006; 44:2360-5.

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.

Di George AM, Lischner HW, Dacou C, Arey JB. Absence of the thymus. *Lancet*, 1967; 1(7504):1387.

Digilio MC, Marino B, Giannotti A, Dallapiccola B. Familial deletions of chromosome 22q11. *Am J Med Genet.* 1997;73(1):95-6.

Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature.* 1998; 396:690-5.

Driscoll DA, Budarf ML, Emanuel BS. A genetic etiology for DiGeorge syndrome: consistent deletions and microdeletions of 22q11. *Am J Hum Genet.* 1992; 50(5):924-33.

Edelmann L, Pandita RK, Spiteri W, Funke B, Goldberg R, Palanisamy N, Chaganti RS, Magenis E, Shprintzen RJ, Morrow BE. A common molecular basis for rearrangement disorder on chromosome 22q11. *Hum Mol Genet.* 1999; 8(7):1157-67.

Eliez S, Blasey CM, Schmitt EJ, et al. 2001.Velocardiofacial syndrome: are structural changes in the temporal and mesial temporal regions related to schizophrenia? *Am J Psychiatry.* 158:447-53.

Finocchi A, Di Cesare S, Romiti ML, Capponi C, Rossi P, Carsetti R, Cancrini C. Humoral immune response and CD27+ B cells in children with DiGeorge syndrome (22q11.2 deletion syndrome). *Pediatr Allergy Immunol*. 2006; 17(5):382-8.

Fugimoto S, Yamagashi H. Isolation of an excision product of T-cell receptor α -chain gene rearrangements. *Nature*. 1987; 327(6199):242-3.

Fujimura MD. *Níveis séricos das subclasses da imunoglobulina G em crianças normais e nefróticas* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1990.

Gennery AR, Barge D, O'Sullivan JJ, Flood TJ, Albinun M, Cant AJ. Antibody deficiency and autoimmunity in 22q11.2 deletion syndrome. *Arch Dis Child*. 2002; 86(6):422-5.

Gioli-Pereira L, Pereira AC, Mesquita SM, Lopes AA, Krieger JE. PCR screening for 22q11.2 microdeletion: development of a new cost-effective diagnostic tool. *Clin Chim Acta*. 2006; 369(1):78-81.

Goldmuntz E, Clark BJ, Mitchell LE, et al. Frequency of 22q11 deletions in patients with conotruncal defects. *J Am Coll Cardiol*. 1998; 32:492-8.

Goodship J, Cross L, Liling J, Wren C. A population study of chromosome 21q11 deletions in infancy. *Arch Dis Child*. 1998; 79(4):348-51.

Gothelf D, Eliez S, Thompson T, et al. COMT genotype predicts longitudinal cognitive decline and psychosis in 22q11.2 deletion syndrome. *Nat Neurosci.* 2005, 8:1500-2.

Gothelf D, Feinstein C, Thompson T, Gu E, Penniman L, Van Stone E, Kwon H, Eliez S, Reiss AL. Risk factors for the emergence of psychotic disorders in adolescents with 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Psychiatry.* 2007a; 164(4):663-9.

Gothelf D, Michaelovsky E, Frish A, Presburger G, Burg M, Aviran-Goldring A, Frydman M, Yeshaya J, Shohat M, Korostishevsky M, Apter A, Weizman A. Association of the low activity COMT 158 Met alleles with ADHD and OCD in subjects with velocardiofacial syndrome. *Int Neuropsychopharmacol.* 2007b; 10(3):301-8.

Graf WD, Unis AS, Yates CM, et al. Catecholamines in patients with 22q11.2 deletion syndrome and the low-activity COMT polymorphism. *Neurology.* 2001; 57:410-6.

Greenberg F, Elder FF, Haffner P, Northrup H, Ledbetter D H. Cytogenetic findings in a prospective series of patients with DiGeorge anomaly. *Am J Hum Genet.* 1988; 43(5):605-11.

Hazenberg MD, Otto SA, Cohen Stuart JW, Verschuren MC, Borleffs JC, Boucher CA, Coutinho RA, Lange JM, Rinke de Wit TF, Tsegaye A, van Dongen JJ, Hamann D, de Boer RJ, Miedema F. Increased cell division but not thymic dysfunction rapidly affects the T-cell receptor excision circle content of the naïve T cell population in HIV-1 infection. *Nat Med*. 2000; 6(9): 1036-42.

Hazenberg MD, Verschuren MC, Hamann D, Miedema F, van Dongen JJ. T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *J Mol Med*. 2001; 79(11):631-40.

Holmes S, He M, Xu T, Lee PP. Memory T cells have expression patterns intermediate between naïve and effector. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102(15):5519-23.

Ivins S, Lammerts van Beuren K, Roberts C, James C, Lindsay E, Baldini A, Ataliotis P, Scambler PJ. Microarray analysis detects differentially expressed genes in the pharyngeal region of mice lacking Tbx1. *Dev Biol*. 2005; 285(2):554-69.

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.

Jerome LA, Papaioannou VE. DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, Tbx1. *Nat Genet.* 2001;27(3):286-91.

Jiang L, Duan C, Chen B, Li Y, Huan Y, Wu KK. Association of 22q11 deletion with isolated congenital heart disease in three Chinese ethnic groups. *Int J Cardiol.* 2005;105(2):216-23.

Junker AK, Driscoll DA, Humoral immunity in DiGeorge syndrome. *J Pediatr.* 1995; 127(2):231-7.

Kanaya Y, Ohga S, Ikeda K, Furuno K, Ohno T, Takada H, Kinukawa N, Hara T. Maturational alterations of peripheral T cell subsets and cytokine gene expression in 22q11.2 deletion syndrome. *Clin Exp Immunol.* 2006; 144(1):85-93.

Kates WR, Antshel K, Roizen N, Fremont W, Shprintzen RJ. Velo-cardio-facial syndrome. In: Butler MG, Meaney FJ (Eds.). *Genetics of developmental disabilities*. New York: Marcel Dekker; 2004.

Kates WR, Antshel KM, Abdulsabur N, Colgan D, Funke B, Fremont W, Higgins AM, Kucherlapati R, Shprintzen RJ. A gender-moderated effect of a functional COMT polymorphism on prefrontal brain morphology and function in velo-cardio-facial syndrome (22q11.2 deletion syndrome). *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2006; 141B(3):274-80.

Kelly RG, Jerome-Majewska LA, Papaioannou VE. The del22q11.2 candidate gene Tbx1 regulates branchiomic myogenesis. *Hum Mol Genet.* 2004; 13(22):2829-40.

Kishimoto H, Sprent J. The thymus and central tolerance. *Clin Immunol* 2000; 95(1 Pt 2):S3-7.

Kobrynski LJ, Sullivan KE. Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *Lancet.* 2007; 370:1443-52.

Kornfel SJ, Zefferen B, Christodoulou CS, Day NK, Cawkewell G, Good RA. DiGeorge anomaly: a comparative study of the clinical and immunologic characteristics of patients positive and negative by fluorescence in situ hybridization. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;105:983-2.

Lachman HM, Morrow B, Shprintzen RJ, et al. Association of codon 108/158 catechol- o-methyl transferase gene polymorphism with the psychiatric manifestations of VCFS. 1996; *Am J Med Genet.* 67:468-72.

Lavi RF, Kamchaisatian W, Sleasman JW, Martin DP, Haraguchi S, Day NK, et al. Thymic output markers indicate immune dysfunction in DiGeorge syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 118:1184-6.

Lawrence S, McDonald-McGinn DM, Zackai E, Sullivan KE. Thrombocytopenia in patients with chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *J Pediatr.* 2003; 143(2):277-8.

Leana-Cox J, Pangkanon S, Eanet KR, Curtin MS, Wulfsberg EA. Familial DiGeorge/velocardiofacial syndrome with deletion of chromosome area 22q11.2: report of five families with a review of the literature. *Am J Med Genet.* 1996; 65(4):309-16.

Li T, Ma X, Sham PC, et al. Evidence for association between novel polymorphisms in the PRODH gene and schizophrenia in a Chinese population. *Am J Med Genet.* 2004; 129B:13-15.

Lin L, Bu L, Cai CL, Zhang X, Evans S. Isl1 is upstream of sonic hedgehog in a pathway required for cardiac morphogenesis. *Dev Biol.* 2006; 295(2):756-63.

Lindsay EA, 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.

Lindsay EA, Vitelli F, Su H, Morishima M, Huynh T, Pramparo T, Jurecic V, Ogunrinu G, Sutherland HF, Scambler PJ, Bradley A, Baldini A. Tbx1 haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice. *Nature.* 2001; 410(6824):97-101.

MacKenzie-Stepner K, Witzel MA, Stringer DA, et al. Abnormal carotid arteries in the velocardiofacial syndrome: a report of three cases. *Plast Reconstr Surg.* 1987; 80:347-51.

Maeda J, Yamagishi H, McAnally J, Yamagishi C, Srivastava D. Tbx1 is regulated by forehead proteins in the secondary heart field. *Dev Dyn.* 2006; 235(3):701-10.

Mahadevan NR, Horton AC, Gibson-Brown JJ. Developmental expression of the amphioxus Tbx1/10 gene illuminates the evolution of vertebrate brachial arches and sclerotome. *Dev Genes Evol.* 2004; 214(11):559-66.

Markert ML, Alexieff MJ, Li J, et al. Complete DiGeorge syndrome: development of rash, lymphadenopathy, and oligoclonal T cells in 5 cases. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 113:734-41.

Markert ML, Boeck A, Hale LP, et al. Transplantation of thymus tissue in complete DiGeorge syndrome. *N Engl J Med.* 1999; 341:1180-9.

Markert ML, Hummel DS, Rosenblatt HM, Schiff SE, Haville TO, Williams LW, Schiff RI, Buckley RH. Complete DiGeorge syndrome: persistence of profound immunodeficiency. *J Pediatr.* 1998; 132(1):15-21.

McDonald-McGinn DM, Kirschner R, Goldmuntz E, Sullivan K, Eicher P, Gerdes M, Moss E, Solot C, Wang P, Jacobs I, Handler S, Knightly C, Heher K, Wilson M, Ming JE, Grace K, Driscoll D, Pasquariello P, Randall P, Larossa D, Emanuel BS, Zackai EH. The Philadelphia story: the 22q11.2 deletion: report in 250 patients. *Genet Couns.* 1999; 10(1):11-24.

McDonald-McGinn Dm, Reilly A, Wallgren-Pettersson C, Hoyme HE, Yang SP, Adam MP, Zackai EH, Sullivan KE. Malignancy in chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *Am J Med Genet.* 2006; 140(8):906-9.

McLean-Tooke A, Barge D, Spickett GP e Gennery AR. Immunologic defects in 22q11.2 deletion syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2008; 122(2):362-7.

Merscher S, Funke B, Epstein JA, Heyer J, Puech A, Lu MM, Xavier RJ, Demay MB, Russell RG, Factor S, Tokooya K, Jore BS, Lopez M, Pandita RK, Lia M, Carrion D, Xu H, Schorle H, Kobler JB, Scambler P, Wynshaw-Boris A, Skoultschi AI, Morrow BE, Kucherlapati R. TBX1 is responsible for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome. *Cell.* 2001; 104(4):619-29.

Miller JFAP, Mitchell GF. The thymus and the precursors of antigen-reactive cells. *Nature.* 1967; 216(5116):659-63.

Mitnick RJ, Bello JA, Golding-Kushner KJ, Argamaso RV, Shprintzen RJ. The use of magnetic resonance angiography prior to pharyngeal flap surgery in patients with velo-cardio-facial syndrome. *Plast Reconstr Surg.* 1996; 97:908-19.

Morrow B, Goldberg R, Carlson C, Gupta RD, Sirotkin H, Collins J, Dunham I, O'Donnell HO, Scambler P, Shprintzen RJ, Kucherlapati R. Molecular definition of the 22q11 deletions in velo-cardio-facial syndrome. *Am J Hum Genet.* 1995; 56(6):1391-403.

Munoz S, Garay F, Flores I, Heusser F, Talesnik E, Aracena M, Mellado C, Méndez C, Arnaiz P, Repetto G. Heterogeneidad de la prestación clínica de síndrome de microdeleção de cromosoma 22, região q11. *Rev Med Chile.* 2001;129: 515-21.

Murphy KC, Jones LA, Owen MJ. High rates of schizophrenia in adults with velo-cardio-facial syndrome. *Arch Gen Psychiatry.* 1999; 56(10):940-5.

Notarangelo L, Casanova JL, Conley ME, Chapel H, Fischer A, Puck J, Roifman C, Serger R, Geha RS. Primary immunodeficiency diseases: An update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee Meeting in Budapest, 2005. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 117(4):883-96.

Oskarsdottir S, Person C, Erison BO, Fasth A. Presenting phenotype in 100 children with the 22q11 deletion syndrome. *Eur J Pediatr.* 2005; 64(3):146-53.

Oskarsdottir S, Vujic M, Fasth A. Incidence and prevalence for the 22q11 deletion syndrome: a population-based study in Western Sweden. *Arch Dis Child.* 2004; 89(2):148-51.

Pierdominici M, Mazzetta F, Caprini E, Marziali M; Digilio MC, Marino B, Aiuti A, Amati F, Russo G, Novelli G, Pandolfi F, Luzi G, Giovannetti A. Biased T-cell receptor repertoires in patients with chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome velocardiofacial syndrome). *Clin Exp immunol.* 2003; 132(2):323-31.

Piliero LM, Sanford AN, McDonald-McGinn D, Zackai EH, Sullivan KE. T-cell homeostasis in humans with thymic hypoplasia due to chromosome 22q11.2 deletions syndrome. *Blood.* 2004; 103(3):1020-15.

Rasmussen AS, Williams CA, Ayoub EM, Sleasman JW, Gray BA, Bent-Williams A, Stalker HJ, Zori RT. Juvenile rheumatoid arthritis in velo-cardio-facial syndrome: coincidence or unusual complication. *Am J Med Genet.* 1996; 64(4):546-50.

Rezzani R, Bonomini F, Rodella LF. Histochemical and molecular overview of the thymus as site for T-cells development. *Prog Histochem Cytochem.* 2008; 43(2):73-120.

Ribeiro RM, Perelson AS. Determining thymic output quantitatively: using models to interpret experimental T-cell receptor excision circles (TREC) data. *Immunol Rev.* 2007; 216:21-34.

Roberts C, Ivins SM, James CT, Scambler PJ. Retinoic acid down-regulates Tbx1 expression in vivo and in vitro. *Dev Dyn.* 2005; 232: 928-38.

Robin NH, Shprintzen RJ. Defining the clinical spectrum of deletion 22q11.2. *J Pediatr*. 2005; 147:90-6.

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 of clinical with interstitial chromosome 22q11 deletion:a European collaborative study. *J Med Genet*. 1997; 34(10):798-804.

Scambler PJ, Kelly D, Lindsay E, Williamson R, Goldberg R, Shprintzen R, Wilson DI, Goodship JA, Burn J. Velo-cardio-facial syndrome associated with chromosome 22 deletions encompassing the DiGeorge locus. *Lancet*. 1992; 339(8802):1138-9.

Schubert MS, Moss RB. Selective polysaccharide antibody deficiency in familial DiGeorge syndrome. *Ann Allergy*. 1992; 69(3):231-8.

Sedivá A, Bartunková 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(14):CR182-7.

Shah SS, Lai SY, Ruchelli E, Kazahaya K, Mahboubi S. Retropharyngeal aberrant thymus. *Pediatrics*. 2001; 108:E94.

Shprintzen RJ, Goldberg RB, Lewin ML, et al. A new syndrome involving cleft palate, cardiac anomalies, typical facies, and learning disabilities: velocardio-facial syndrome. *Cleft Palate J.* 1978; 15:56-62.

Shprintzen RJ, Higgins AM, Anstshel K, Fremont W, Roizen N e Kates W. Velo-cardio-facial syndrome. *Cur Opin Pediatr.* 2005; 17(6):725-30.

Shprintzen RJ, Morrow B, Kucherlapati R. Vascular anomalies may explain many of the features of velo-cardio-facial syndrome. *Am J Hum Genet.* 1997; 61:34A.

Shprintzen RJ, Singer L. Upper airway obstruction and the Robin sequence. *Int Anesthesiol Clin.* 1992; 30:109-14.

Shprintzen RJ. Palatal and pharyngeal anomalies in craniofacial syndromes. *Birth Defects.* 1982; 18(1):5378.

Shprintzen RJ. Velo-cardio-facial syndrome. In: Cassidy SB, Allanson J (Eds.). *Management of genetic syndromes.* 2ª Ed. New York: Wiley-Liss. 2005a. p 615-32.

Shprintzen RJ. Velo-cardio-facial syndrome. *Prog Pediatr Cardiol.* 2005b; 20:187-93.

Shprintzen RJ. Velo-cardio-facial syndrome: 30 years of study. *Dev Disabil Res Rev.* 2008; 14(1):3-10.

Shprintzen RJ. Velo-cardio-facial syndrome: a distinctive behavioral phenotype. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2000; 6:142-7.

Smith CA, Driscoll DA, Emanuel BS, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Sullivan KE. Increased prevalence of immunoglobulin A in patients with the chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome cardio/velocarsiofacial syndrome). *Clin Diagn Lab Immunol.* 1998; 5(3):415-7.

Stalmas I, Lambrechts D, De Smet F, Jansen S, Wang J, Maity S, Kneer P, von der Ohe M, Swillen A, Maes C, Gewillig M, Molin DG, Hellings P, Boetel T, Haardt M, Compernelle V, Dewerchin M, Plaisance S, Vlietinck R, Emanuel B, Gittenberger-de Groot AC, Scambler P, Morrow B, Driscoll DA, Moons L, Esguerra CV, Carmeliet G, Behn-Krappa A, Devriendt K, Collen D, Conway SJ, Carmeliet P. VEGF: a modifier of the de22q11 (DiGeorge) syndrome? *Nat Med.* 2003; 9(2):173-82.

Stumm M, Tönnies H, Wieacker PF. Molecular cytogenetic techniques for the diagnosis of chromosomal abnormalities in childhood disease. *Eur J Pediatr.* 1999; 158(7):531-6.

Sullivan K, McDonald-McGinn D, Driscoll D, Zmijewski CM, Ellabban AS, Reed L, Emanuel BS, Zackai EH, Athreya BH, Keenan G. Juvenile rheumatoid arthritis-like polyarthritis in chromosome 22q11.2 deletions syndrome (DiGeorge anomaly/velocardiofacial syndrome/conotruncal anomaly face syndrome). *Arthritis Reum.* 1997; 40(3):430-6.

Sullivan KE, McDonald-McGinn Dm, Driscoll D, Emanuel BS, Zackai EH, Jawad AF. Longitudinal analysis of Lymphocyte function and numbers in the first year of life and chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *Clin Labor Diag Immunol*. 1999; 6(6):906-11.

Sullivan KE. The clinical, immunological, and molecular spectrum of chromosome 22q11.2 deletion syndrome and DiGeorge syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2004; 4:505-12

Swillen A, Devriendt K, Vantrappen G, Voegels A, Rommel N, Fryns JP, Eyskens B, Gewilling M, Dumoulin M. Familial deletions of chromosome 22q11: the Leuven experience. *Am J Med Genet*. 1998; 80(5):531-2.

Taddei I, Morishima M, Huynh T, Lindsay EA. Genetic factors are major determinants of phenotypic variability in a mouse model of the DiGeorge/del22q11 syndromes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98:11428-31.

Tatum III SA, Chang J, Havkin N, Shprintzen RJ. Pharyngeal flap and the internal carotid in velo-cardio-facial syndrome. *Ann Facial Plast Surg*. 2002; 4:73-80.

Tézenas Du Montcel S, Mendizabai H, Aymé S, Lévy A, Philip N. Prevalence of 22q11 microdeletion. *J Med Genet*. 1996; 33(8):719

Thomas JA, Graham JM Jr. Chromosome 22q11 deletions syndrome: an update and review for the primary pediatrician. *Clin Pediatr (Phila)*. 1997; 36(5):253-66.

Vorstman JA, Jalali GR, Rappaport F, Kacker AM, Scott C, Emanuel BS. MLPA: a rapid, reliable, and sensitive method for detection and analysis of abnormalities of 22q. *Hum Mutat*. 2006; 27(8):814-21.

Wilson DI, Burn J, Scambler P, Goodship J. DiGeorge Syndrome part of CATCH 22. *J Med Genet*. 1993; 30(10):852-6.

Wilson DI, Cross IE, Goodship JA, Brown J, Scambler PJ, Bain HH, Taylor JF, Walsh K, Bankier A, Brun J, et al. A prospective cytogenetic study of 36 cases of DiGeorge syndrome. *Am J Hum Genet*. 1992; 51(5):957-63.

Wulfsberg E A, Leana-Cox J, Neri G. What's in a name? Chromosome 22q abnormalities and the DiGeorge, velocardiofacial, and conotruncal anomalies face syndrome. *Am J Med Genet*. 1996; 65(4):317-9.

Xu H, Creeato F, Baldini A. Timed mutation and cell-fate mapping reveal reiterated roles of Tbx1 during embryogenesis and a crucial function during segmentation of the pharyngeal system via regulation of endoderm expansion. *Development*. 2005; 132(19):4387-95.

Yang L, Cai CL, Lin L, Qyang Y, Chung C, Monteiro RM, Mummery CL, Fishman GI, Cogen A, Evans S. Isl1Cre reveals a common Bmp pathway in heart and limb development. *Development*. 2006; 133(8):1575-85.

Yel L, Ramanuja S, Gupta S. Clinical and immunological features in IgM deficiency. *Int Arch Allergy Immunol*. 2009; 150(3):291-8.

Zhang L, Lewin SR, Markowitz M, Lin H-H, Skulsky E, Karanickolas R, He Y, Jin X, Tuttleton S, Vesanen M, Spiegel H, Kost R, Lunzen Jv, Stellbrink H-J, Wolinsky S, Borkowsky W, Palumbo P, Kostrikis LG, Ho DD. Measuring recent thymic emigrants in blood of normal and HIV-1-infected individuals before and after effective therapy. *J Exp Med*. 1999; 190:725-32.

Zhang Z, Cerrato F, Xu H, Vitelli F, Morishima M, Vincentz J, Furuta Y, Ma L, Martin JF, Baldini A, Lindsay E. Tbx1 expression in pharyngeal epithelia is necessary for pharyngeal arch artery development. *Development*. 2005; 132(23):5307-15.

Zou D, Silvius D, Davenport J, Grifone R, Maire P, Xu PX. Patterning of the third pharyngeal pouch into thymus/parathyroid by Six and Eya1. *Dev Biol*. 2006a; 293(2):499-512.

Zou D, Silvius D, Rodrigo-Blomqvist S, Enerback S, Xu PX. Eya1 regulates the growth of optic epithelium and interacts with Pax2 during the development of all sensory areas in the inner ear. *Dev Biol*. 2006b; 298(2):430-41.