

DIOGO CORDEIRO DE QUEIROZ SOARES

**Análise de mediadores solúveis de promoção e supressão da
resposta imune em pacientes com a síndrome de deleção 22q11.2**

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

Programa de Pediatria

Orientadora: Profa. Dra. Chong Ae Kim

**São Paulo
2020**

DIOGO CORDEIRO DE QUEIROZ SOARES

**Análise de mediadores solúveis de promoção e supressão da
resposta imune em pacientes com a síndrome de deleção 22q11.2**

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

Programa de Pediatria

Orientadora: Profa. Dra. Chong Ae Kim

**São Paulo
2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Soares, Diogo Cordeiro de Queiroz
Análise de mediadores solúveis de promoção e
supressão da resposta imune em pacientes com a
síndrome de deleção 22q11.2 / Diogo Cordeiro de
Queiroz Soares. -- São Paulo, 2020.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Pediatria.
Orientadora: Chong Ae Kim.

Descritores: 1.Síndrome da deleção 22q11.2
2.Síndrome de DiGeorge 3.Imunodeficiência primária
4.Autoimunidade 5.Timo 6.Quimiocinas

USP/FM/DBD-069/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Aos Pacientes e os seus Familiares, essenciais à realização deste estudo.

Aos meus pais, irmãos, aos meus avós Luiz e Lisete e à minha querida Dedé (*in memoriam*), sem os quais certamente não teria chegado até aqui.

À minha esposa Sandra por todo o incentivo, compreensão, paciência e amor.

Ao meu querido amigo Hely (*in memoriam*) que foi tão fundamental na minha caminhada e continua acompanhando os meus passos.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, nosso Pai Celeste, que nos deu o dom da vida e a oportunidade de crescermos diuturnamente, sempre nos amparando nos momentos de dificuldade com o seu amor incondicional.

À minha amada esposa, **Sandra**, pelo apoio irrestrito em todos os momentos, especialmente naqueles de incerteza diante de novos desafios, por acreditar em mim e compreender o meu amor pela Ciência, em especial pela Medicina, sempre me incentivando e encorajando o meu crescimento profissional.

Aos meus queridos **pais e irmãos**, por todo o amor, carinho, incentivo e apoio constantes, fundamentais para que eu conseguisse chegar até aqui. Aos meus avós **Luiz e Lisete**, por serem sempre um ponto de sustentação, por acreditarem em mim desde antes mesmo de eu me entender como um ser neste mundo e não medir esforços para proporcionar os meios para o meu crescimento pessoal e profissional.

À minha querida **Dedé** (*in memoriam*), uma grande mãe que Deus me deu nesta existência. Mulher humilde e com pouco estudo, mas indubitavelmente uma Doutora na arte da vida, exemplo de bondade, decência, honestidade... a minha profunda gratidão por tanto amor, carinho e abnegação... por contribuir de forma tão importante na minha vida, a fim de que eu me tornasse o homem que sou hoje.

À minha tia-avó e amiga **Lourdes** pelas longas conversas e ensinamentos desde a minha infância, pela acolhida sempre calorosa em sua casa, por compartilhar as suas vivências fabulosas, pelo incentivo ao meu desenvolvimento pessoal.

Aos meus **tios e tias, primos e primas, sogros, cunhados**, pelo carinho, pelas palavras de encorajamento e pela compreensão diante da ausência.

Aos meus amigos, em especial ao meu “amigo-irmão” **Hely** (*in memoriam*) que sempre foi o meu grande apoiador, parceiro de todas as horas, e partiu deste plano de forma tão prematura, certamente por ter missões de maior grandeza, a minha eterna gratidão e imensa saudade, atenuada pela certeza de que nos reencontraremos novamente.

Aos “amigos-cunhados-compadres” **Luciano** e **Nathalia**, pela amizade, pelo apoio e compreensão diante da minha ausência, por sempre se fazerem presentes na minha vida.

À **Profa. Dra. Chong Ae Kim**, grande orientadora e incentivadora, que com um coração enorme e um cuidado maternal acreditou na minha capacidade e não mediu esforços para contribuir de todas as formas possíveis para o meu aprimoramento profissional e pessoal, cujos exemplos e ensinamentos levarei para sempre, onde quer que eu esteja.

À **Profa. Dra. Magda Maria Sales Carneiro Sampaio**, pioneira no Brasil e uma das maiores lideranças mundiais na Imunologia Pediátrica, que tive o enorme privilégio de conhecer durante o início da minha graduação e que se tornou desde então uma grande mentora, amiga e constante fonte de inspiração.

À **Profa. Dra. Leuridan Cavalcante Torres**, além de orientadora uma grande amiga, a minha eterna gratidão por ter me apresentado o universo da Pesquisa Translacional. Grande exemplo de determinação, resiliência e abnegação, mostra diariamente que é possível fazer ciência de alto nível, mesmo com a escassez de recursos.

Aos **colegas da Unidade de Genética do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, em especial à **Profa. Dra. Débora Romeo Bertola**, eminente médica geneticista e grande fonte de inspiração, por todos os ensinamentos durante a minha formação em Genética Médica e à **Dra. Rachel Sayuri Honjo Kawahira** por todos os conselhos, pela confiança, amizade e suporte à minha formação profissional, bem como aos **médicos residentes**, que auxiliaram nos atendimentos dos pacientes.

À **equipe do Laboratório de Citogenômica do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM 03)**, em especial à **Profa. Dra. Leslie Domenici Kulikowski**, **Dra. Marília Moreira Montenegro** e **Dra. Evelin Aline Zanardo** pelo auxílio na caracterização citogenômica dos pacientes.

Ao **Departamento de Genética da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)**, particularmente à **Profa. Dra. Maria Isabel de Souza Aranha Melaragno**, **Dra. Anelisa Gollo Dantas** e **Natália Rodrigues Nunes Nishimoto** pela parceria e auxílio na caracterização citogenômica dos pacientes.

À **Divisão de Imunologia do *Children's Hospital of Philadelphia* (CHOP)**, em especial à **Profa. Dra. Kathleen Sullivan**, pela acolhida, ensinamentos, orientações e grande incentivo ao desenvolvimento deste estudo.

À **Mariza Kazue Umetsu Yoshikawa**, bibliotecária do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que se tornou uma grande amiga ao longo dos anos de convivência, sempre disponível para auxiliar, a qualquer dia ou hora. Sempre lembrarei das nossas conversas e dos nossos cafezinhos com muito carinho.

A todos os **funcionários do Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, em especial à **Claudete, Marli, Dona Cida e Dona Carol**, sempre disponíveis e amáveis com o corpo clínico e os pacientes e familiares.

À **Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, em especial à **Profa. Dra. Cristina Miuki Abe Jacob (*in memoriam*)**, ao **Dr. Antônio Carlos Pastorino, Dra. Ana Paula Beltran Moschione Castro e Dra. Mayra de Barros Dorna**, a minha gratidão pela recepção desde a época da minha graduação, pelos ensinamentos e oportunidades de colaboração.

À **equipe do Laboratório de Investigação em Imunodeficiências Primárias do Departamento de Dermatologia da FMUSP (LIM 56)**, em especial às queridas amigas **Noemia Mie Orii e Rosângela Araújo**, que com muita paciência e compreensão me apresentaram a apaixonante técnica de Citometria

de Fluxo, à **Dona Sílvia** pelo sorriso afável e o seu cafezinho irresistível, ao **Prof. Dr. Dewton de Moraes Vasconcelos**, mentor e amigo, que possibilitou uma imersão na área de imunodeficiências primárias e mostrou que é possível fazer medicina translacional no Brasil e ao **Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte**, pela oportunidade de contato com a pesquisa básica e translacional ainda durante a minha graduação.

Ao **Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP)**, sobretudo à equipe do **Laboratório de Pesquisa Translacional**, representada pela querida amiga **Dra. Marina Cadena da Matta**, que contribuiu enormemente com os experimentos realizados durante esse estudo, bem como aos pacientes e funcionários do **Serviço de Imunologia Clínica e Hospital-Dia**, onde tive o primeiro contato com as imunodeficiências primárias. Um agradecimento especial a **Gerlane, Carlos Eduardo, Lívia, Ana Carla, Paula, Dasyanne, Bárbara, Vilma e Soraia** por todo o apoio, ensinamentos, almoços. Foi uma bela e importante fase da minha vida, da qual sempre lembro com muito carinho.

Ao meu querido mestre e amigo **Prof. Dr. Edvaldo da Silva Souza**, exemplo de profissional ético e comprometido com o seu trabalho, que contribuiu de forma singular na minha formação como médico e me iniciou no universo da Pesquisa, sempre abrindo as portas e me incentivando a seguir adiante, juntamente com a querida **Profa. Dra. Ana Rodrigues Falbo**. A minha eterna gratidão a vocês.

Ao mestre e amigo **Prof. Dr. Gilliatt Hanois Falbo**, que tal como um pai, ensina aos seus alunos com exemplos e atitudes. A minha profunda gratidão por todos os ensinamentos, por me aproximar da ética médica e por me ensinar a fazer

ciência com respeito aos princípios éticos e morais e em prol dos menos favorecidos.

Aos meus primeiros mentores e inspiradores na difícil e fascinante arte da Medicina, particularmente do universo da Imunologia: **Dr. Francisco José Trindade Barretto** e **Dr. João Bosco de Oliveira Filho**, sem os quais certamente não estaria aqui, os meus sinceros agradecimentos.

Às **secretárias do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, representadas pela **Mônica, Helen, Rosângela e Adriana**, essenciais para o funcionamento do Departamento.

Ao amigo **Nivaldo**, responsável pelo Serviço de Reprografia do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sempre disponível para ajudar a todos com muita cordialidade e em especial pela impressão desta tese.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo apoio financeiro, essencial à realização desse trabalho.

A todos os que contribuíram para a minha formação como pessoa e profissional que não foram citados aqui, a minha sincera gratidão.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

EPÍGRAFE

“A Ciência e a Religião são as duas alavancas da inteligência humana.”

Allan Kardec (1804-1869)

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

Francisco Cândido Xavier (1910-2002)

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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. Divisão 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. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE QUADROS	
LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Síndrome de microdeleção SD22q11.2	1
1.1.2 Fisiopatologia e diagnóstico	3
1.1.3 Características clínicas e imunológicas	5
1.2 Imunidade inata e adaptativa, e os mecanismos de ativação e supressão da resposta imune.....	10
2 JUSTIFICATIVA	23
3 HIPÓTESE	26
4 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos Específicos.....	28
5 ASPECTOS ÉTICOS	30
6 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
6.1 Casuística	32
6.2 Local e Período do Estudo.....	32
6.3 Definição das variáveis sociodemográficas e clínicas.....	33
6.4 Testes laboratoriais para avaliação imunológica.....	34
7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
8 RESULTADOS	39
9 DISCUSSÃO	51
10 CONCLUSÕES	60
11 ANEXOS	62
12 REFERÊNCIAS.....	71
APÊNDICES	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do cromossomo 22 mostrando a região da deleção 22q11 em humanos	4
Figura 2. Representação esquemática da região da deleção 22q11 em humanos	6
Figura 3. Interação entre a resposta imune inata e adaptativa em resposta a uma infecção bacteriana	11
Figura 4. Papel das quimiocinas e seus receptores na homeostase do sistema imune e em doenças	12
Figura 5. Funções de vários membros da superfamília do TNF na inflamação, proliferação celular, apoptose e morfogênese.....	16
Figura 6. Representação esquemática da transdução de sinal bidirecional para o sistema CD137/CD137L e seus efeitos nas células apresentadoras de antígeno, células T e células NK	18
Figura 7. Moléculas coestimuladoras, incluindo B7-CD28, CD40L-CD40, ICOS-ICOS-L e OX40-OX40L e coinibidoras, incluindo B7-CTLA-4 e PD1-PD-L.....	19
Figura 8. Técnica de CBA para a detecção de quimiocinas	35
Figura 9. Níveis (pg/mL) de sTREM-1, MCP1/CCL2 e IL8/CXCL8 no sangue periférico dos pacientes com SD22q11.2 e controles e nos pacientes com SD22q11.2 com (DAI+) e sem doença autoimune (DAI-).....	42
Figura 10. Níveis solúveis (pg/mL) de sOX-40 e s4-1BB no sangue periférico dos pacientes com SD22q11.2 e controles e nos pacientes com SD22q11.2 com (DAI+) e sem doença autoimune (DAI-)	43
Figura 11. Níveis (pg/mL) de IP10/CXCL10 e RANTES/CCL5 no sangue periférico dos pacientes com SD22q11.2 e controles e nos pacientes com SD22q11.2 com (DAI+) e sem doença autoimune (DAI-).....	44
Figura 12. Níveis solúveis (pg/mL) de sPD1 e sPDL1 no sangue periférico dos pacientes com SD22q11.2 e controles e nos pacientes com SD22q11.2 com (DAI+) e sem doença autoimune (DAI-)	45
Figura 13. Níveis (pg/mL) de RANTES/CCL5, IP10/CXCL10, 4-1BB e OX40 no sangue periférico dos pacientes com SD22q11.2 com e sem plaquetopenia ..	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição das frequências absolutas e relativas das características clínicas de 15 pacientes com a SD22q11.2..... 40

Tabela 2. Análises da associação das características clínicas e laboratoriais de acordo as medianas dos valores absolutos de sTREM1, sOX40 e s4-1BB encontrados no sangue periférico dos pacientes com SD22q11.2..... 48

Tabela 3. Análises da associação das características clínicas e laboratoriais de acordo as medianas dos valores absolutos de sPD1 e sPD-L1 encontrados no sangue periférico dos pacientes com SD22q11.2 49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Variáveis sociodemográficas e clínicas dos pacientes com SD22q11.2 33

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
®	Marca registrada
APC	do inglês, <i>antigen-presenting cell</i>
Array CGH	do inglês, <i>Array Comparative Genomic Hybridization</i>
Array SNP	do inglês, <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
BCP	Broncopneumonia
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
CBA	do inglês, <i>Cytometric bead array</i>
CD	do inglês, <i>Cluster of differentiation</i>
CIA	Comunicação interatrial
CIV	Comunicação interventricular
DAI	Doença autoimune
DG	Doença de Graves
Dra.	Doutora
ELISA	do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<i>et al.</i>	E outros
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
ICr-HCFMUSP	Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IDP	Imunodeficiências primárias
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IMIP	Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira

IP10	do inglês, <i>Interferon gamma-induced Protein 10</i>
ITU	Infecção do Trato Urinário
IVAS	Infecção de Vias Aéreas Superiores
LCR	do inglês, <i>Low Copy Repeats</i>
LIM	Laboratório de Investigação Médica
MCP1	do inglês, <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
ml	Mililitro
MLPA	do inglês, <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
NK	do inglês, <i>Natural killer</i>
OMA	Otite Média Aguda
PD1	do inglês, <i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	do inglês, <i>Programmed death-ligand 1</i>
pg	Picograma
Profa.	Professora
RANTES	do inglês, <i>Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted</i>
SD22q11.2	Síndrome de deleção 22q11.2
sPD1	do inglês, <i>soluble Programmed death 1</i>
sPD-L1	do inglês, <i>soluble Programmed death-ligand</i>
sTREM1	do inglês, <i>soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 1</i>
T4F	Tetralogia de Fallot
TCD4⁺	Linfócito T CD4 positivo
TCD8⁺	Linfócito T CD8 positivo
TGF	do inglês, <i>Transforming growth factor</i>
TH	Tireoidite de Hashimoto
TNF	do inglês, <i>Tumor necrosis fator</i>
TNFR	do inglês, <i>Tumor necrosis factor receptor</i>
TREC	do inglês, <i>T-cell receptor excision circles</i>
Treg	do inglês, <i>Regulatory T-cells</i>
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo

RESUMO

SOARES DCQ. *Análise de mediadores solúveis de promoção e supressão da resposta imune em pacientes com a síndrome de deleção 22q11.2* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

INTRODUÇÃO: A síndrome de deleção 22q11.2 (SD22q11.2) é a síndrome de microdeleção mais comum em seres humanos, com uma prevalência estimada de 1:4000 nascidos-vivos. Possui uma ampla variabilidade fenotípica, sendo associada a mais de 180 manifestações distintas. Dentre os achados clínicos, as alterações no sistema imunológico ocorrem em aproximadamente 75% dos casos, podendo se apresentar sob a forma de infecções de repetição, atopia e/ou doenças autoimunes, sugerindo tratar-se de uma doença de desregulação do sistema imune. **OBJETIVO:** Avaliar mediadores solúveis de promoção e supressão da resposta imune em pacientes com a SD22q11.2. **MÉTODOS:** Participaram do estudo 15 pacientes com o diagnóstico confirmado de SD22q11.2 e 15 indivíduos saudáveis, sem história familiar de SD22q11.2, malformações congênitas *major* ou história clínica sugestiva de imunodeficiências. Através da coleta de sangue periférico, foram realizadas análises de mediadores relacionados à regulação do sistema imune, utilizando as técnicas de *Cytometric Bead Array* (CBA) e *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA). **RESULTADOS:** O estudo compreendeu um total de 15 pacientes (15,5 anos \pm 8,4; 4 mulheres e 11 homens) com SD22q11.2 e 15 indivíduos saudáveis (17,5 anos \pm 7,2; 7 homens e 8 mulheres). Quando comparados os pacientes com SD22q11.2 e os indivíduos saudáveis, observou-se que os pacientes apresentam níveis aumentados de sTREM-1, MCP1, IL8 e níveis

reduzidos de sOX40 e RANTES. Quando comparados os pacientes com SD22q11.2 com e sem doença autoimune, observou-se que o grupo com doença autoimune apresenta níveis aumentados de sTREM1, s4-1BB, IP10, RANTES, sPD1 e reduzidos de sOX40 e de sPDL1. **CONCLUSÕES:** Os pacientes com SD22q11.2 possuem defeitos na produção de mediadores solúveis envolvidos na promoção e supressão da resposta inflamatória, sendo fundamentais para manter o equilíbrio fisiológico do sistema imune, independente de exposição a fatores externos que possam desencadear a ativação da resposta imunológica. Os mediadores avaliados poderão servir como biomarcadores para predição de autoimunidade nos pacientes com SD22q11.2.

Descritores: Síndrome da Deleção 22q11.2; Síndrome de DiGeorge; Imunodeficiência primária; Autoimunidade; Timo; Quimiocinas.

ABSTRACT

SOARES DCQ. *Analysis of soluble mediators of promotion and suppression of the immune response in patients with the 22q11.2 deletion syndrome* [Thesis].

São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

INTRODUCTION: 22q11.2 deletion syndrome (22q11.2DS) is the most common human microdeletion syndrome, with an estimated prevalence of 1:4000 live births. It has a wide phenotypic variability, with more than 180 different related manifestations. Among the clinical findings, immune abnormalities are present in approximately 75% of the cases and includes recurrent infections, atopy and/or autoimmune diseases, suggesting that it is a disease of dysregulation of the immune system. **OBJECTIVE:** to evaluate soluble mediators of promotion and suppression of the immune response in 22q11.2DS patients. **METHODS:** Fifteen patients with a confirmed diagnosis of 22q11.2DS and 15 healthy patients without a family history of 22q11.2DS, major congenital malformations or a clinical history suggestive of immunodeficiencies were enrolled in the study. Through the sample of peripheral blood, analyzes of mediators related to immune regulation were performed, using techniques of Cytometric Bead Array (CBA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **RESULTS:** The study comprised a total of 15 22q11.2DS patients (15.5 years \pm 8.4; 4 women and 11 men) and 15 healthy individuals (17.5 years \pm 7.2; 7 men and 8 women). When comparing 22q11.2DS patients with healthy individuals, the patients presented higher levels of TREM1, MCP1, IL8 and reduced levels of sOX40 and RANTES. When comparing 22q11.2DS patients with and without autoimmune disease, the group with autoimmune disease has increased levels of sTREM1, s4-1BB, IP10, RANTES,

sPD1 and reduced levels of sOX40 and sPDL1. **CONCLUSIONS:** 22q11.2DS patients have defects in the production of soluble mediators involved in the promotion and suppression of the inflammatory response, being essential to maintain the physiological balance of the immune system, regardless of exposure to external factors that may trigger the activation of the immune response. The mediators evaluated can be used as biomarkers to predict autoimmunity in patients with 22q11.2DS.

Descriptors: 22q11.2 deletion syndrome; DiGeorge syndrome; Primary immunodeficiency; Autoimmunity; Thymus gland; Chemokines.

1

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Síndrome de microdeleção SD22q11.2

A primeira descrição na literatura da síndrome de microdeleção 22q11.2 (SD22q11.2) ocorreu em 1955 pela foniatra Eva Sedláčková, que descreveu um grupo de crianças com insuficiência velofaríngea, voz anasalada, dismorfismos faciais, anomalias congênitas e deficiência intelectual. Alguns anos depois, ela também reportou pacientes com características semelhantes, além de malformações cardíacas e fendas palatinas submucosas, denominando a síndrome da hipoplasia velo-facial^{1,2}.

Mais de uma década após os primeiros relatos de casos da SD22q11.2, surgiram outras publicações a respeito, como a realizada pelo cardiologista pediátrico William Strong que descreveu uma família com dismorfismos faciais, cardiopatia congênita e deficiência intelectual³. No mesmo ano, o endocrinologista pediátrico Angelo DiGeorge publicou o relato de três pacientes com malformações cardíacas conotrunciais, hipocalcemia secundária a hipoplasia das glândulas paratireóides, agenesia de timo e imunodeficiência grave^{4,5}.

Consecutivamente, vários outros relatos semelhantes foram publicados, como a descrição de cardiopatias conotrunciais, face assimétrica ao choro e voz anasalada em japoneses, a qual denominaram síndrome de anomalias faciais e conotrunciais⁶. Robert Shprintzen (1978) descreveu um grupo de pacientes que apresentava anomalias no palato, cardiopatias congênitas e dismorfismos

faciais, denominando a síndrome velocardiofacial, também conhecida como síndrome de Sphrintzen⁷.

Entre o primeiro relato de caso em 1955 até a descoberta da região cromossômica a SD22q11.2, várias nomenclaturas distintas foram apresentadas na literatura: síndrome cardiofacial de Cayler⁸, síndrome Opitz G/BBB com herança autossômica dominante⁹ e alguns casos com quadro clínico sugestivo de síndrome CHARGE (coloboma, cardiopatia, atresia das coanas, atraso do crescimento e desenvolvimento, hipoplasia dos genitais, anomalias dos pavilhões auriculares/surdez)¹⁰.

Contudo, desde o início da década de 90, quando foi descrita a deleção em 22q11.2, houve o reconhecimento que se tratavam da mesma entidade clínica, e alguns autores defendem que se agrupe como a SD22q11.2¹¹. Trata-se da forma mais comum de microdeleção em seres humanos, com uma prevalência estimada de 1:4000 nascidos-vivos. Não obstante, a sua ocorrência pode ser bem mais frequente, em virtude de possuir um grau variável de expressividade^{11,12}.

Durante a gestação, a identificação da SD22q11.2 em fetos com ou sem alterações ultrassonográficas nos testes pré-natais não-invasivos é de 1:347 e 1:992, respectivamente, sugerindo que essa entidade seja ainda mais frequente do que se estima atualmente^{13,14}. Além disso, tem sido observado um aumento na incidência em decorrência de uma maior expectativa de vida dos indivíduos com SD22q11.2, que têm alcançado a idade reprodutiva, e com isso podem gerar crianças acometidas pela síndrome¹⁵.

1.1.2 Fisiopatologia e diagnóstico

O termo “deleção”, em genética, é utilizado para designar a perda de material genético. Já o termo “microdeleção” significa que a perda de material genético não é detectável à microscopia convencional, ou seja, ao estudo através do cariótipo com bandeamento G, sendo necessárias técnicas de citogenômica, que serão abordadas adiante. No caso da SD22q11.2, esta perda envolve um pequeno segmento do braço longo do cromossomo 22 (representado pela letra q), na região 1, banda 1, sub-banda 2¹⁶⁻¹⁸.

A maioria dos pacientes com a SD22q11.2 (cerca de 90%) apresenta uma deleção de cerca de 3 milhões de pares de bases (Mb) na região 22q11.2. Todavia, existem alguns casos considerados atípicos, pois apresentam uma deleção menor nesta região, que pode ser de 1,5 Mb, presente em 7 a 8% dos casos, ou ainda rearranjos menores dentro da região crítica de 3 Mb, sendo observados em 2 a 3% dos pacientes^{19,20}. No intervalo deletado de 3 Mb são conhecidos 45 genes codificadores de proteínas, sete miRNAs e 10 genes não codificantes de proteína (**Figura 1**). Atualmente existem vários estudos buscando definir a implicação dos diferentes genes na região deletada no fenótipo dos pacientes, bem como a influência de alterações em outras regiões do genoma sob a variabilidade fenotípica observada nesses indivíduos^{11,18}.

Como mostra a **Figura 1**, o braço longo do cromossomo 22 apresenta um arranjo não usual, com quatro regiões de repetições de baixo número de cópias (do inglês *Low Copy Repeats* – LCRs) que são maiores, mais complexas e possuem maior grau de homologia do que outras LCRs presentes no genoma humano, o que predispõe a região q11.2 à deleção^{18,21,22}.

A deleção em 22q11.2 foi identificada pela primeira vez por meio do método de cariótipo com bandeamento G²³. Entretanto, a identificação da deleção com esse método é de baixa sensibilidade, não sendo adequado para investigar microdeleção por ser uma alteração submicroscópica, conforme mencionado anteriormente.

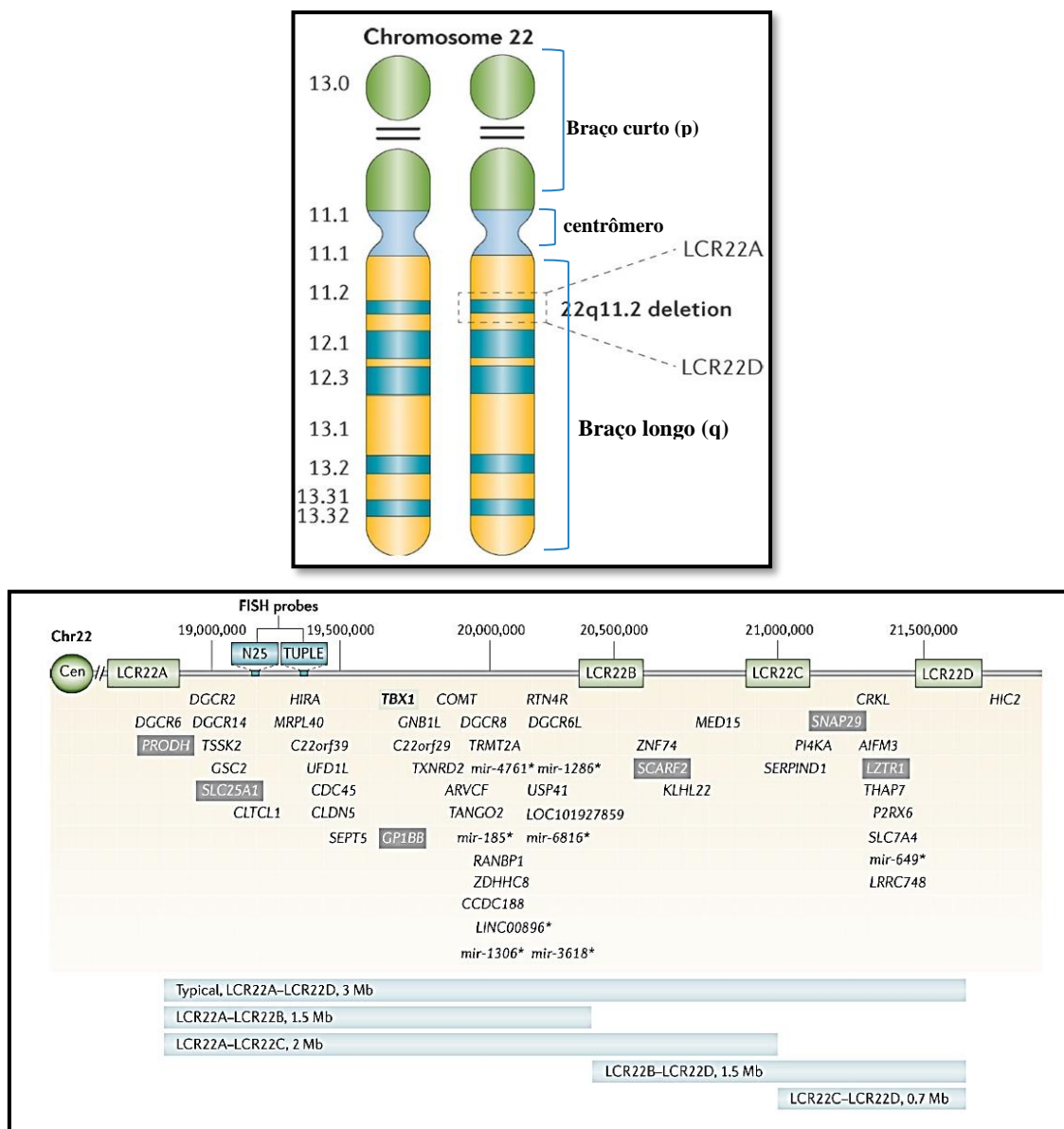


Figura 1. Representação esquemática do cromossomo 22 mostrando a região da deleção 22q11 em humanos, bem como os principais genes localizados nos diferentes tamanhos de deleção. Fonte: McDonald-McGinn *et al.*, 2015²⁴.

A partir de 1992, o diagnóstico de microdeleção cromossômica passou a ser realizado por meio da técnica de hibridação *in situ* com fluorescência (FISH) com sonda de DNA específica para a região 22q11.2, sendo considerada “padrão-ouro”^{25,26}. Apesar disso, dependendo da sonda utilizada e da localização da microdeleção, pode não detectar algumas microdeleções chamadas atípicas^{27,28}.

Nos últimos anos, a identificação de microdeleções de sido feita por amplificação *multiplex* de sondas dependente de ligação (MLPA[®] – do inglês *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), técnica indicada para a investigação de condições com suspeita clínica conhecida^{18,24}.

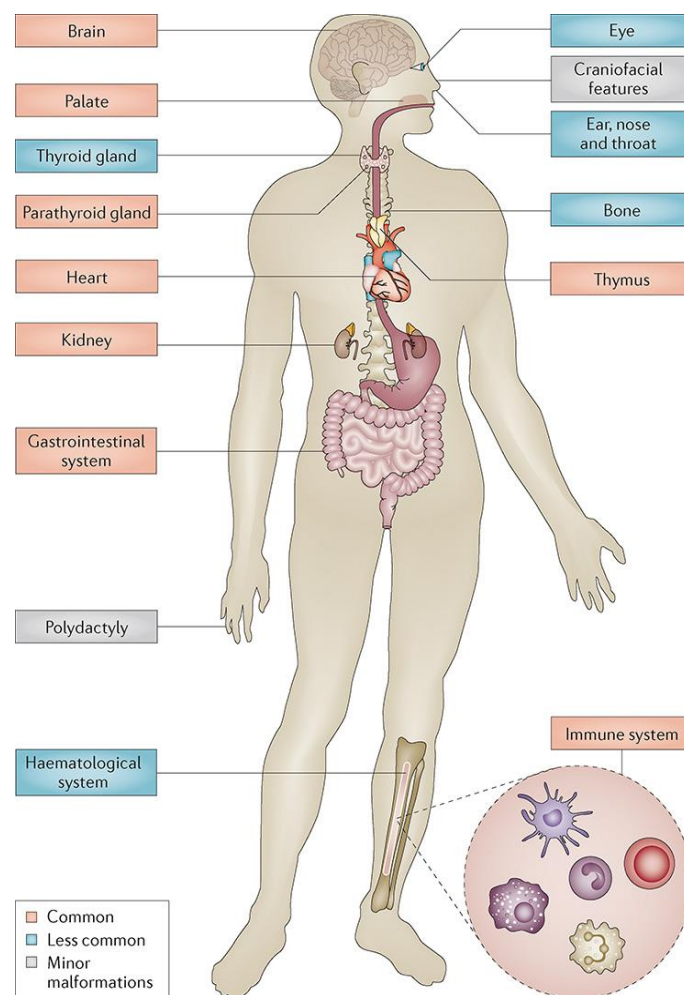
Outra possibilidade de diagnóstico é através da análise cromossômica por *microarray* (CGH ou SNP-*array*). Uma vez que avalia todo o genoma em um único experimento, esse método tem a vantagem de identificar precisamente a deleção na região 22q11.2, e caracterizar outras alterações em qualquer região do genoma que podem estar relacionadas ao fenótipo naqueles pacientes sem deleção em 22q11.2^{18,29}.

1.1.3 Características clínicas e imunológicas

As características clínicas que levam à suspeita diagnóstica variam de acordo com a idade do paciente; contudo, normalmente incluem a presença de dois ou mais dos principais sinais clínicos, a saber: dismorfismos faciais característicos, malformações cardíacas conotrunciais, defeitos palatais, regurgitação nasal e/ou voz anasalada, imunodeficiência primária, hipocalcemia, distúrbios no

desenvolvimento e/ou de aprendizado e distúrbios comportamentais e/ou transtornos psiquiátricos^{30,31,32} (**Figura 2**).

É importante ressaltar que em razão do amplo espectro clínico, que inclui mais de 180 achados físicos e comportamentais, sobretudo quando não se encontram presentes alterações típicas ou quando os pacientes já se encontram na adolescência ou na idade adulta, essa hipótese diagnóstica pode não ser considerada, ou ainda haver um atraso significativo para a elucidação diagnóstica e, conseqüentemente, para o manejo adequado^{33,34}.



Nature Reviews | Disease Primers

McDonald-McGinn, D.M. et al. (2015) 22q11.2 deletion syndrome. *Nat. Rev. Dis. Primers*. doi:10.1038/nrdp.2015.71

Figura 2. Representação esquemática do acometimento multissistêmico na SD22q11.2, sendo destacados os achados mais comuns (vermelho), menos comuns (azul) e as malformações menores (cinza). Fonte: McDonald-McGinn *et al.*, 2015²⁵.

Dentre as alterações clínicas encontradas nos pacientes com a SD22q11.2, a deficiência do sistema imune foi inicialmente descrita como graves. Foram relatadas infecções fúngicas crônicas, bronquites e otites. As taxas de sobrevivência dos pacientes são baixas, sendo os quadros infecciosos responsáveis pela maioria dos óbitos desses pacientes^{35,36}.

Em 0,5 a 1% dos pacientes, observa-se uma forma grave de imunodeficiência primária decorrente à aplasia tímica, com importante linfopenia e denominada como forma completa da síndrome de DiGeorge, condição que requer abordagem específica, tal qual as imunodeficiências combinadas graves, e inclui o transplante de timo³⁶⁻³⁹.

De forma geral, as alterações no sistema imunológico são encontradas em 75% dos casos, mesmo na ausência de infecções de repetição e/ou doenças autoimunes, sendo tais anormalidades possivelmente decorrentes da hipoplasia ou aplasia do timo^{40,41}. Nesse sentido, tem sido descrito que o tamanho do timo isoladamente não é suficiente para causar alterações no número de células T circulantes, possivelmente pelo fato de existirem fragmentos microscópicos de células epiteliais tímicas em localizações anômalas⁴².

Todavia, a redução no tamanho do timo compromete a maturação das células T nos pacientes com SD22q11.2, sendo notada uma redução na expressão de células T recém-emigradas do timo (TRECs, do inglês *T cell receptor rearrangement excision circles*)^{43,44}, bem como uma redução quantitativa de células TCD3⁺, quando comparados a indivíduos controles na mesma faixa etária^{35,45-48}. Quanto à função, a proliferação de células T é habitualmente normal

e, quando reduzida, é decorrente de redução nos níveis de células T ativadas^{45,48,49}.

Em relação à resposta imune humoral, existe um grupo de pacientes que apresenta significativa disfunção de anticorpos, alterações muito semelhantes às observadas nos pacientes com imunodeficiência comum variável, sendo transitórias na maioria dos casos. Também tem sido descritas alterações da imunidade humoral menos graves como deficiência seletiva na produção sérica da imunoglobulina A (IgA), resposta vacinal reduzida e hipogamaglobulinemia transitória da infância^{40,50-52}.

Os indivíduos com SD22q11.2 também apresentam doenças autoimunes, sendo tireoidite autoimune, artrite reumatoide juvenil, púrpura trombocitopênica idiopática, anemia aplástica e anemia hemolítica mais frequentemente descritas⁵³⁻⁵⁷. Alguns autores observaram que 10% dos pacientes com a SD22q11.2 apresentavam citopenias autoimunes e que essas ocorreram com maior frequência nos pacientes com maior comprometimento da função de células T⁵⁸. Também foi descrita uma maior prevalência de artrite idiopática juvenil e púrpura trombocitopênica idiopática nos pacientes com a SD22q11.2 quando comparados a população em geral³⁵.

O mecanismo subjacente à maior susceptibilidade às doenças autoimunes não está bem estabelecido, porém acredita-se que durante a maturação das células T no timo, uma falha na seleção negativa dessas células possa estar envolvida com uma maior produção de células T auto-reativas. Além disso,

observa-se uma diminuição das células T reguladoras (Treg), o que pode contribuir com a maior predisposição à autoimunidade^{59,60}.

A deleção de genes supressores tumorais, como também defeitos na imunovigilância contra tumores podem estar associados a predisposição a neoplasias nos pacientes com SD22q11.2¹¹. Algumas deleções atípicas incluem o gene supressor de tumor *SMARCB1*, conhecido por desempenhar um papel importante em tumores rabdoídes⁶¹.

Estudos sugerem, ainda, que o gene *COMT*, localizado na região deletada, e que desempenha um papel na desintoxicação de agentes cancerígenos, ao ter a sua função comprometida leve a uma menor produção enzimática e conseqüentemente leve a menor desintoxicação de catecóis tóxicos, os quais acumulam no tecido e levam a danos celulares⁶².

As neoplasias mais comumente relatadas nesses pacientes são hepatoblastoma, carcinoma de células renais, tumor de Wilms, neuroblastoma, tumor teratóide rabdoíde atípico, linfoma, leucemia linfoblástica aguda, osteosarcoma e carcinoma papilífero de tireoide⁶¹⁻⁶⁶.

Mais estudos são necessários para identificar os mecanismos pelos quais os indivíduos com SD22q11.2 podem ter um risco aumentado a desenvolvimento de tumores e determinar eventos da imunidade inata e adaptativa associados aos tipos de neoplasias mais frequentes nessa população.

1.2 Imunidade inata e adaptativa, e os mecanismos de ativação e supressão da resposta imune

Conceitualmente, o sistema imune é dividido em inato e adaptativo. A imunidade inata representa a primeira linha de defesa contra micro-organismos e promove uma resposta rápida e padronizada a um número grande, mas limitado, de estímulos.

A imunidade inata é representada por: (1) barreiras físicas e químicas, tais como epitélio e agentes antimicrobianos produzidos nas superfícies epiteliais; (2) células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos), células dendríticas e células assassinas naturais (NK, do inglês *natural killer*) e outras células linfoides; e (3) proteínas sanguíneas, incluindo membros do sistema complemento e outros mediadores da inflamação, presentes em todos os indivíduos, independentemente de contato anterior com imunógenos ou agentes invasores⁶⁷.

Já o sistema imune adaptativo (também denominado sistema imune adquirido ou específico) é estimulado diante de processos infecciosos e aumenta em magnitude e capacidade defensiva em cada exposição subsequente a um microrganismo particular. O sistema imune adaptativo reconhece e reage a diversas substâncias microbianas e não microbianas e é composto, essencialmente pelos linfócitos e os seus produtos, tais como os anticorpos **(Figura 3)**⁶⁸.

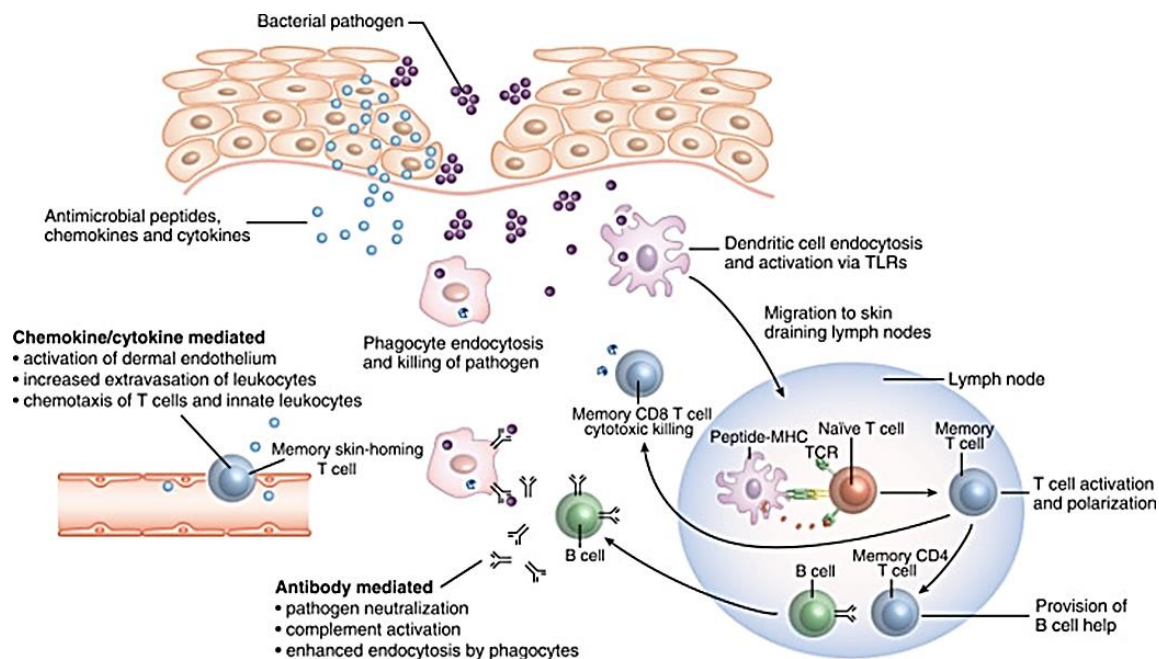


Figura 3. Interação entre a resposta imune inata e adaptativa em resposta a uma infecção bacteriana. Fonte: Clark & Kupper, 2005⁶⁹.

Dentre os componentes da imunidade inata, as citocinas constituem um grande grupo de proteínas com estruturas e funções distintas, que regulam e coordenam muitas atividades de células da imunidade inata e adaptativa. Entre as várias funções das citocinas, estão o crescimento e a diferenciação de todas as células imunes, a ativação de funções efetoras dos linfócitos e fagócitos e a migração de células imunes do sangue periférico para os tecidos ou para diferentes localizações dentro dos tecidos.

As quimiocinas compõem um subgrupo de citocinas estruturalmente relacionadas, fundamentais para a manutenção da recirculação linfocitária e migração de células para os tecidos, atuando na homeostase do sistema imunológico (**Figura 4**)⁷⁰.

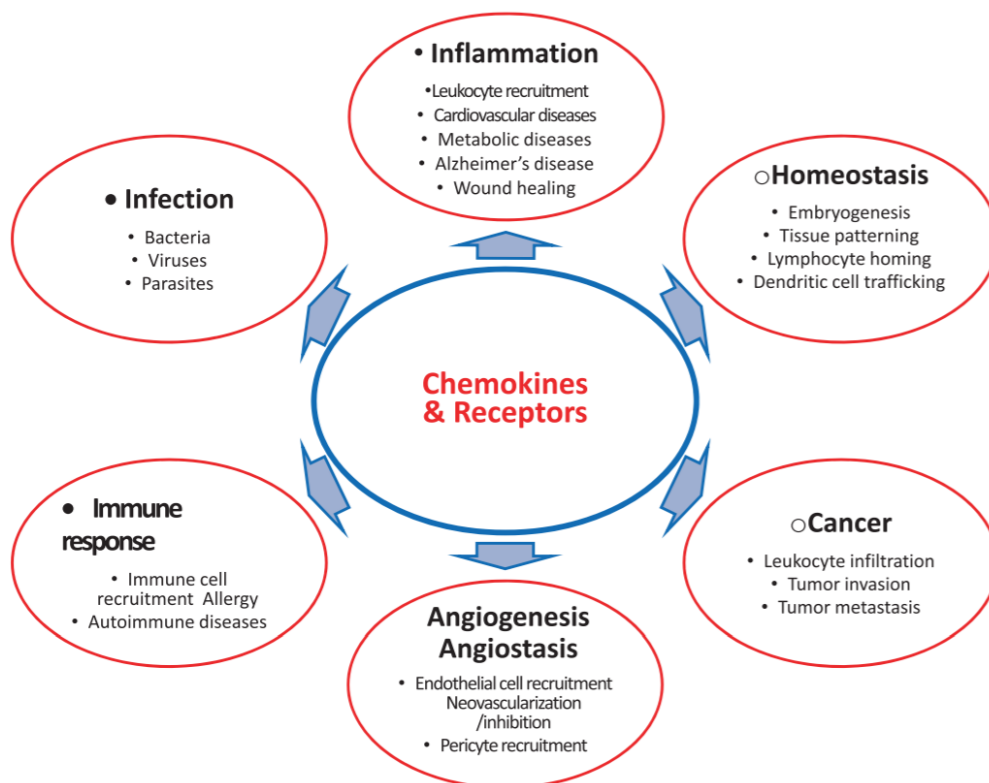


Figura 4. Papel das quimiocinas e seus receptores na homeostase do sistema imune e em doenças. Fonte: Tang & Wang, 2018⁷¹.

Existem cerca de 50 quimiocinas humanas, classificadas em quatro famílias baseadas no número e localização de resíduos N-terminais de cisteína. Embora existam exceções, o recrutamento de neutrófilos é mediado principalmente pelas quimiocinas CXC, o recrutamento de monócitos pelas quimiocinas CC e o recrutamento de linfócitos por ambas as quimiocinas CXC e CC⁷².

As quimiocinas das subfamílias CC e CXC são produzidas pelos leucócitos e por vários tipos de células teciduais, tais como células endoteliais, células epiteliais e fibroblastos. Em muitas dessas células, a secreção das quimiocinas é induzida pelo reconhecimento dos microrganismos através de vários receptores celulares do sistema imune inato.

Além disso, as citocinas inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumor necrosis factor*), a interleucina 1 (IL-1) e a interleucina 17 (IL-17), induzem a produção de quimiocinas. Várias quimiocinas CC também são produzidas por células T ativadas, fornecendo uma ligação entre a imunidade adaptativa e o recrutamento de leucócitos para os sítios inflamatórios⁷³.

Algumas quimiocinas são produzidas por células em resposta a estímulos externos e estão envolvidas em reações inflamatórias, enquanto outras quimiocinas são produzidas constitutivamente em tecidos e atuam na organização tecidual⁷⁴.

A interleucina 8 (IL-8/CXCL8) foi uma das primeiras quimiocinas descritas, sendo inicialmente identificada como um fator quimiotático influenciado por diversos estímulos, principalmente aqueles que desencadeiam estresse oxidativo, como por exemplo, produção de espécies reativas de oxigênio, hipóxia e produção de mediadores pró-inflamatórios, tais como: TNF α e IL-1 β ⁷⁵. A IL-8 já foi atribuída como um importante mecanismo para doenças inflamatórias e autoimunes, devido às suas propriedades pró-inflamatórias, sendo responsável pela migração de neutrófilos dos vasos para o sítio inflamatório, em vigência de infecção ou não⁷⁶.

A proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1/CCL2) é uma quimiocina expressa por diversos tipos celulares, como células endoteliais, de músculo liso, monócitos e fibroblastos. Várias citocinas pró-inflamatórias estimulam a produção de MCP-1, incluindo IL-1, TNF α e fator de transformação do crescimento beta (TGF- β , do inglês *transforming growth factor- β*). É a quimiocina mais importante na regulação da migração/infiltração de monócitos/macrófagos

nos tecidos, uma vez que tem participação direta no recrutamento de células dendríticas, monócitos e células T para o local da lesão tecidual. Em altas concentrações, promove a ativação *burst* respiratório de monócitos/macrófagos com produção de espécies reativas de oxigênio⁷⁷. Níveis elevados tem sido associados com obesidade, aterosclerose e doenças cardiovasculares⁷⁸.

O RANTES (CCL5) é um outro membro da família das quimiocinas, que participa da ativação de eosinófilos, monócitos e linfócitos TCD4⁺. Atua aumentando a expressão de IL-12 e interferon gama (IFN- γ) e estimula a migração de células Th1, principalmente células T de memória, sendo expressa no baço, timo, além de células hematopoiéticas⁷⁹.

Níveis elevados de RANTES tem sido associados a resposta inflamatória crônica, dentre elas, estão incluídas aterosclerose, artrite reumatoide, dermatite atópica, asma, reações de hipersensibilidade do tipo tardia, glomerulonefrite, endometriose, alguns distúrbios neurodegenerativos (p.ex. doença de Alzheimer) e certos tipos de tumores. Acredita-se que nos processos inflamatórios crônicos, o RANTES promova a quimiotaxia de leucócitos para os locais de inflamação⁸⁰. Ademais, desempenha um papel fundamental na resposta imune às infecções virais.

Nas infecções virais, as células TCD8⁺ efetoras produzem RANTES juntamente com substâncias citotóxicas como perforina e granzima A. A sua importância na atividade antiviral é destacada por contribuir ao desenvolvimento de mecanismos de evasão por diversos vírus. Por exemplo, o citomegalovírus humano expressa um análogo do receptor de quimiocina viral (US28) que é capaz de reduzir os níveis circulantes de RANTES⁸¹.

Dentre as quimiocinas do grupo CXC, a CXCL10 (IP-10, do inglês *interferon- γ -inducible protein 10*) foi inicialmente identificada como quimiocina induzida pelo IFN- γ e secretada por vários tipos de células, como monócitos, neutrófilos, células endoteliais, células dendríticas entre outras, sendo funcionalmente classificada como uma quimiocina "inflamatória". A CXCL10 regula respostas imunes por ativação e recrutamento de leucócitos, como células T, eosinófilos, monócitos e células NK⁸².

Além das citocinas e quimiocinas, outros mediadores participam do processo inflamatório. O TREM-1 (do inglês, *Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1*) é uma glicoproteína receptora, membro da superfamília das imunoglobulinas, expresso seletivamente na superfície de neutrófilos e monócitos/macrófagos. A via de TREM-1 resulta na degranulação de neutrófilos, sobrevivência celular e potente produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-8 e quimiocinas como MCP1 e GM-CSF⁸³.

Em modelos animais de choque séptico, o uso de proteínas capazes de bloquear as interações dos receptores de TREM-1 na superfície celular com os seus respectivos ligantes, promove a redução da cascata de mediadores inflamatórios liberados durante a exacerbação da resposta imune. Esse bloqueio foi realizado em ensaios *in vivo* de endotoxemia, pneumonias bacterianas e peritonite polimicrobiana, com uma melhora na sobrevivência dos animais testados⁸⁴⁻⁸⁶.

Além das moléculas citadas anteriormente, existem diversos outros membros da superfamília do TNF, dentre os quais: TNF α , TNF β , FasL, CD30L, 4-1BBL, CD27L, OX40L, 4-1BBL. Todos estes ligantes são principalmente expressos

como proteínas na superfície celular e interagem com células que expressam os receptores correspondentes⁸⁷ (**Figura 5**).

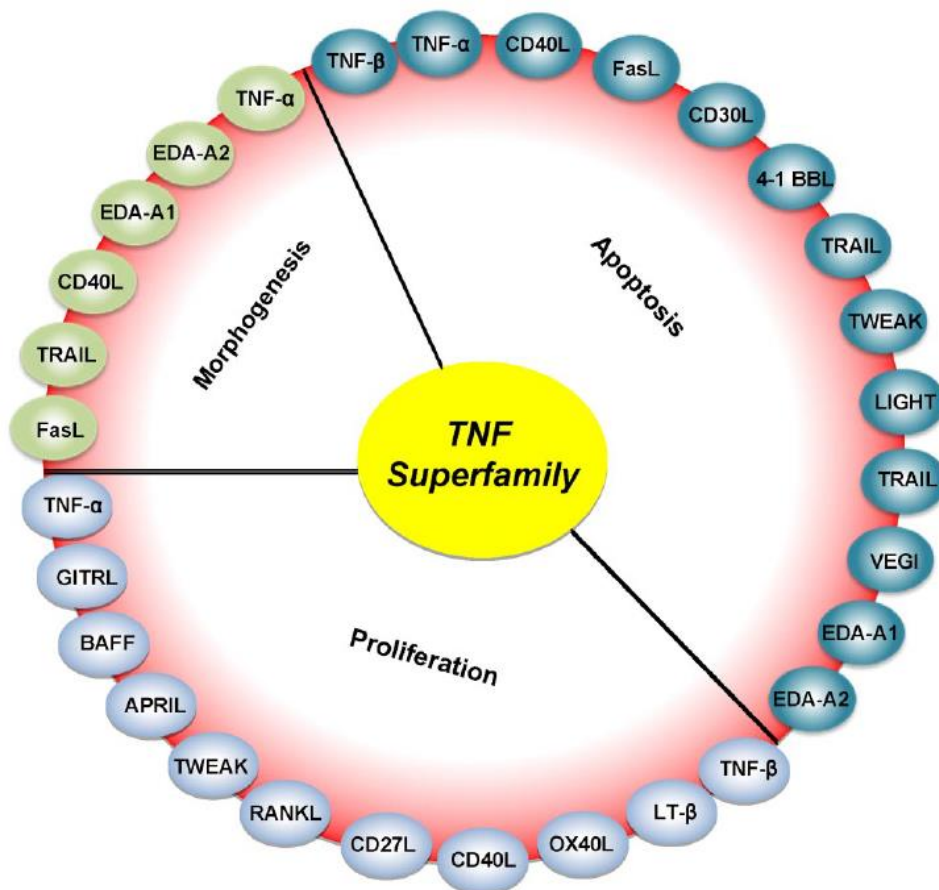


Figura 5. Funções de vários membros da superfamília do TNF na inflamação, proliferação celular, apoptose e morfogênese. Fonte: Aggarwal *et al.*, 2012⁸⁷.

O nível de expressão dos receptores pode variar, dependendo da linhagem de células imunes e seu estado de ativação. Por exemplo, o receptor OX40 e seu ligante (OX40L) é um receptor localizado na superfície de células TCD4⁺ ativadas e sua ativação pode promover sinais coestimuladores para as células que intensificam a sua proliferação e produção de citocinas, e prolongam a sobrevivência de células T de memória efetora⁸⁸.

Um outro importante membro da superfamília do TNF é o OX40 (CD134). Esta molécula, através da interação com o seu ligante, OX40L (CD254 ou gp34) promove coestimulação para a ativação das células T e é crucial para a produção de células T de memória, dessa forma contribuindo para a continuidade da resposta imune⁸⁹.

A importância do eixo OX40/OX40L na geração de memória e no desenvolvimento de autoimunidade tem sido demonstrado em vários estudos com modelos animais e em algumas doenças autoimunes em humanos, a exemplo da artrite reumatoide juvenil^{90,91}. Ademais, níveis séricos elevados de OX40 também tem sido observados em pacientes com neoplasias, reforçando o seu papel na regulação do sistema imune⁹².

Outros membros desta família que têm sido relacionados com a estimulação e supressão das respostas de linfócitos incluem o 4-1BB (CD137) e seu ligante 4-1BBL, que são expressos em células dendríticas ativadas, macrófagos e células B. Os efeitos dessas interações também são bidirecionais, pois tanto as células T como as células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês *antigen-presenting cells*) recebem os sinais de ativação. Esse tipo de interação é, às vezes, referido como diálogo de células T:APC^{93,94} (**Figura 6**).

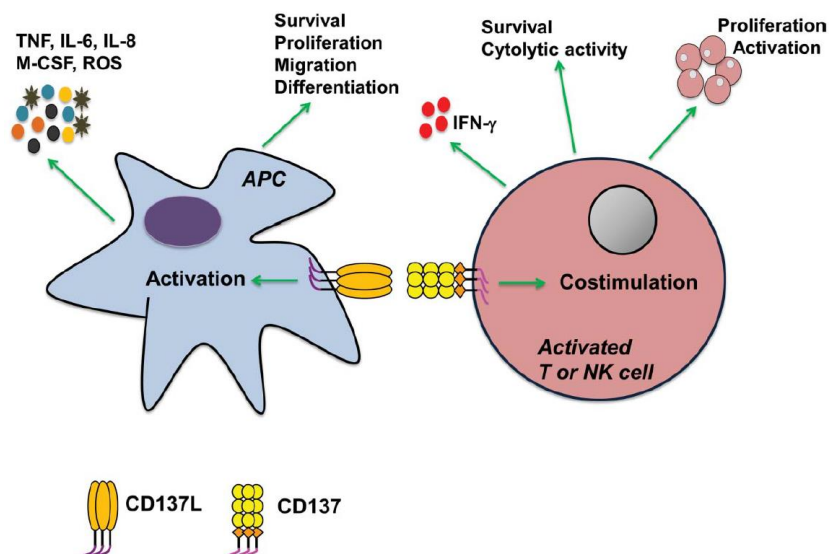


Figura 6. Representação esquemática da transdução de sinal bidirecional para o sistema CD137/CD137L e seus efeitos nas células apresentadoras de antígeno, células T e células NK. Fonte: Dharmadhikari *et al*⁹⁵.

Em contrapartida, existem mecanismos que promovem a diminuição da resposta imune celular, através da expressão de correceptores inibidores presentes na superfície celular dos linfócitos T (**Figura 7**). Durante a última década, vários correceptores inibidores foram relacionados com o fenômeno de "exaustão" da célula T, incluindo o *Programmed death 1* (PD1)^{45,96}. Também chamado de "esgotamento" das células T, termo atribuído à redução gradual das funções celulares que ocorre nos linfócitos efetores (TCD8⁺ e TCD4⁺) em condições de exposição crônica ao antígeno⁹⁷.

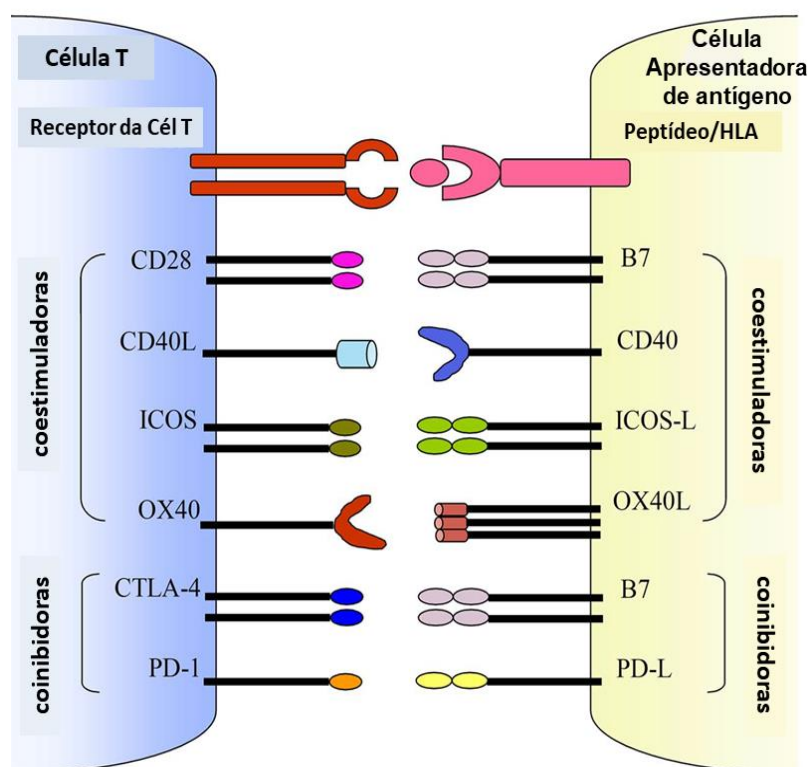


Figura 7. Moléculas coestimuladoras, incluindo B7-CD28, CD40L-CD40, ICOS-ICOS-L e OX40-OX40L e coinibidoras, incluindo B7-CTLA-4 e PD1-PD-L. Fonte: adaptado de Huang., 2011⁹⁸.

A molécula PD1 e seu ligante (PD-L1) se apresentam como receptores de membrana celular e na forma solúvel no plasma (sPD1 e sPD-L1). As moléculas solúveis sPD1 e sPD-L1 podem ser liberadas através da clivagem proteolítica desses receptores da membrana. O sPD-L1 mantém sua atividade biológica e é capaz de se ligar ao receptor PD1 presente na membrana dos leucócitos, especialmente nos linfócitos T, ativando a via PD1/PD-L1⁹⁹.

O PD1 é um receptor de inibição da resposta imune, membro da família do receptor CD28, capaz de atenuar as respostas imunes por regular negativamente a proliferação e a atividade funcional de células T. A expressão de PD1 nas células T ativadas, especialmente nas T reguladoras, é um dos

mecanismos de regulação da resposta imune. O PD1 é expresso nas células T ativadas, células B e células mielóides, sendo particularmente importante para a tolerância periférica a auto-antígenos^{99,100}.

A sinalização do PD1 conduz o ciclo celular à parada em G0/G1, mas não aumenta a morte celular. O efeito inibitório de PD1 sobre a ativação de linfócitos T é mediada pela interação com o ligante PD-L1 e PD-L2. O PD-L1, também chamado B7-H1, é uma proteína transmembrana tipo 1 de 40kDa, codificada pelo gene *CD274*, presente em células apresentadoras de antígenos, como monócitos/macrófagos, células dendríticas, células B, assim como células tumorais, como mecanismo de escape imunológico. A ligação PD1/PD-L1 desfosforila moléculas, reduzindo a via de sinalização fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase (PI3K/Akt) levando à inibição da resposta imune pela diminuição da produção de citocinas e induz a anergia dos linfócitos T e a apoptose celular^{97,101,102}.

A deficiência dos genes para receptores PD1 em modelos animais e a presença de variantes patogênicas nesses genes em humanos estão associados ao desenvolvimento de doenças autoimunes, dentre as quais *Diabetes mellitus* tipo I, miocardite autoimune, lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide e doença de Graves^{103,104}.

A forma solúvel do PD1 (sPD1) possui apenas o domínio extracelular e funciona como antagonista natural das interações de PD1/PD-L1 entre as células, interferindo em um dos mecanismos de inibição da ativação de linfócitos T e com isso, ampliando a resposta imunológica¹⁰³.

Para doenças crônicas como câncer, os níveis séricos elevados de sPD1 são um fator de bom prognóstico, já que ocorre bloqueio do seu ligante, impedindo as interações PD1-PD-L1, com a ampliação e manutenção da ativação de células T contra os antígenos tumorais. Porém, nas doenças autoimunes, a produção elevada de sPD1 é desfavorável para o controle da doença, pois a persistência da ativação da resposta imune pode ocasionar a exacerbação do processo inflamatório e levar ao aumento do número de clones auto-reativos¹⁰³. Estudos recentes tem demonstrado que o sPD1 bloqueia a via PD1/PD-L1 na resposta autoimune e antitumoral, aumentando a ação das células T citotóxicas¹⁰⁵.

2

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

A SD22q11.2 é a síndrome de microdeleção cromossômica mais comum em seres humanos e pode apresentar um amplo espectro de manifestações clínicas, que podem diferir até mesmo em pacientes com deleções idênticas entre si. A imunodeficiência observada nesses pacientes não é decorrente apenas da deficiência quantitativa de células T, haja vista que anormalidades no repertório, bem como na proliferação de células T têm sido descritas.

Os dados da literatura supra citados nos permitem afirmar que alterações imunológicas são comuns nos pacientes com SD22q11.2 e não são necessariamente associadas à presença de infecções graves e/ou recorrentes. Entretanto, a maioria dos estudos avalia aspectos isolados do sistema imune, de modo que existem diversos fenômenos imunológicos presentes nos pacientes que são pouco compreendidos. Não obstante, sabe-se que pacientes com a SD22q11.2 possuem maior risco de desenvolver doenças autoimunes e tem sido descrita incidência aumentada para neoplasias.

Na última década, avanços significativos na imunologia molecular e celular permitiram ampliar o conhecimento dos padrões de resposta imune das doenças autoimunes e do câncer. Algumas moléculas expressas durante a ativação e regulação da resposta imune se tornaram alvos moleculares envolvidos em múltiplas vias de sinalização da resposta inflamatória resultante da presença de

numerosas células que participam dos eventos associados à ativação e regulação da imunidade inata e adaptativa.

Diante do exposto e considerando a prevalência da SD22q11.2, a sua repercussão multissistêmica, por vezes com grave comprometimento, que leva ao aumento significativo da morbimortalidade dos pacientes, faz-se necessário avaliar novos alvos terapêuticos e possíveis biomarcadores de prognósticos.

É importante ressaltar que existem poucos estudos na literatura de investigação ampla do sistema imunológico desses indivíduos, sobretudo em se tratando de mecanismos de ativação e supressão da resposta imune. Isso dá ao nosso grupo de pesquisa a perspectiva de uma melhor compreensão dos fenômenos imunológicos observados nesse grupo de pacientes.

3

HIPÓTESE

3 HIPÓTESE

- Pacientes com a SD22q11.2 apresentam desregulação de mediadores solúveis presentes nos mecanismos de ativação e supressão da resposta imune, e devem estar associados com a predisposição à autoimunidade observada nesses pacientes.

4

OBJETIVOS

4 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os mediadores solúveis de ativação e supressão da resposta imune em pacientes com SD22q11.2, e associá-los à presença de doenças autoimunes

3.2 Objetivos Específicos

Em pacientes com diagnóstico clínico e molecular de SD22q11.2:

- Descrever as características clínicas;
- Determinar a concentração sérica de quimiocinas;
- Determinar as concentrações séricas de sPD1, sPD-L1, s4-1BB, sOX40 e sTREM1;
- Comparar com os resultados dos testes laboratoriais entre os pacientes com SD22q11.2 e os controles;
- Associar a expressão dos mediadores estudados com a presença ou não de doença autoimunes.

5

ASPECTOS ÉTICOS

5 ASPECTOS ÉTICOS

Os protocolos estabelecidos, bem como os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido do Protocolo de Pesquisa (Anexos B e C), foram aprovados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC-FMUSP (CAPPesq) sob o número CAAE: 37684314.9.0000.0068 (Anexo A), seguindo a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

6

MATERIAIS E MÉTODOS

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Casuística

Pacientes: O estudo compreendeu um total de 15 pacientes (15,5 anos \pm 8,4; 4 mulheres e 11 homens) com SD22q11.2, com diagnóstico clínico e molecular estabelecido por geneticista clínico e citogeneticista, respectivamente, e sem sinais clínicos de infecção aguda no momento da coleta.

Controle de comparação: Foram 15 indivíduos saudáveis (17,5 anos \pm 7,2; 7 homens e 8 mulheres) sem história familiar de SD22q11.2, malformações congênitas *major* ou história clínica sugestiva de imunodeficiências e sem sinais clínicos de infecção aguda no momento da coleta.

6.2 Local e Período do Estudo

O estudo foi desenvolvido na Unidade de Genética do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICr – HC-FMUSP) em pacientes com o diagnóstico confirmado da SD22q11.2. O período de inclusão e coleta de dados clínicos e laboratoriais foi de abril/2016 a dezembro/2017.

O diagnóstico molecular da SD22q11.2 foi realizado no Laboratório de Citogenômica (LIM 03) do HC-FMUSP e na Disciplina de Genética da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

A investigação imunológica foi realizada no Laboratório de Pesquisa Translacional do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) – Recife, PE.

6.3 Definição das variáveis sociodemográficas e clínicas

As variáveis sociodemográficas e clínicas foram coletadas na consulta clínica ou conforme informação obtida no prontuário do paciente, incluindo exames complementares.

Quadro 1. Variáveis sociodemográficas e clínicas dos pacientes com SD22q11.2

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO OPERACIONAL	CATEGORIZAÇÃO
Idade	Expressa em anos completos, determinada pelo número de anos completos do nascimento até o momento da entrevista, conforme informação do entrevistado ou do prontuário clínico	Variável contínua
Sexo	De acordo com o gênero do paciente	Variável nominal dicotômica 1. Masculino 2. Feminino
Infecções de repetição	Foram utilizados os critérios propostos pelo Grupo Brasileiro de Imunodeficiências (BRAGID) para imunodeficiências primárias: <ul style="list-style-type: none"> • Duas ou mais pneumonias no ano • Quatro ou mais otites no último ano • Estomatites de repetição ou monilíase por mais de dois meses • Abscessos de repetição ou ectima • Um episódio de infecção sistêmica grave (meningite, osteoartrite, septicemia) • Infecções intestinais de repetição/diarreia crônica 	Variável nominal dicotômica 1. Não 2. Sim
Doenças Autoimunes	Presença ou não do diagnóstico de doenças autoimunes, mediante consulta aos prontuários dos pacientes.	Variável nominal dicotômica 1. Não 2. Sim
Alterações Palatais	Presença de malformações estruturais e/ou funcionais determinadas a partir de exame	Variável nominal dicotômica 1. Não

	clínico associado à realização de nasofibrosopia.	2. Sim
Cardiopatias Congênitas	Malformação cardíaca estrutural determinada a partir da realização de ecocardiograma transtorácico com Doppler colorido.	Variável nominal dicotômica 1. Não 2. Sim
Malformações Gênit-Urinárias	Malformação gênit-urinária determinada a partir do exame clínico associado à realização de ultrassonografia do abdome total.	Variável nominal dicotômica 1. Não 2. Sim

6.4 Testes laboratoriais para avaliação imunológica

6.4.1 Determinação dos níveis de proteínas livres no plasma por Cytometric Bead Array (CBA)

O CBA é uma técnica que se baseia no uso de esferas de poliestireno, denominadas esferas de captura, marcadas com diferentes graus de fluorescência e recobertas com anticorpos monoclonais específicos para cada molécula solúvel (**Figura 8**). Essa técnica permite a avaliação simultânea de diversos analitos no mesmo ensaio utilizando volumes pequenos de amostra. Para dosagens, 25 µL da amostra de plasma, alíquotas de 25 µL da mistura de esferas de captura e 25 µL do reagente de detecção, anticorpos monoclonais específicos para cada molécula solúvel/citocina conjugados ao fluoróforo PE foram utilizados. Após a incubação, foi realizada etapa de lavagem e aquisição no citômetro de fluxo. Foram adquiridos 300 eventos por molécula solúvel/citocina no equipamento de citometria de fluxo, e as concentrações nas amostras expressas em pg/mL foram determinadas a partir das curvas-padrão utilizando o FCAP Array Software (BD BIOSCIENCES, CA).

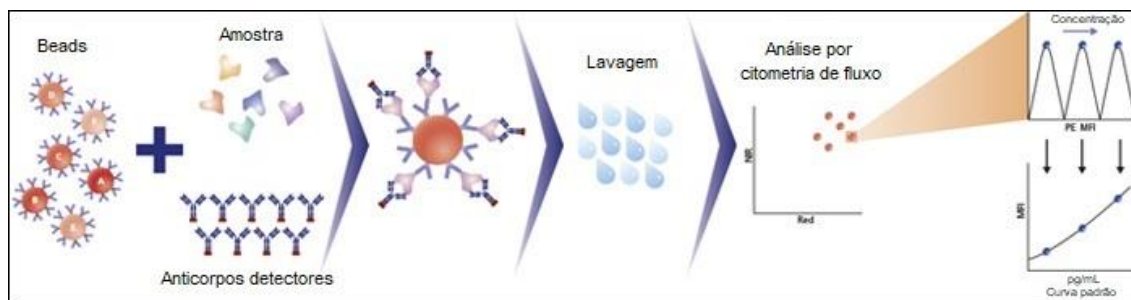


Figura 8. Técnica de CBA para a detecção de quimiocinas. Fonte: adaptada do catálogo da BD Biosciences.

- **Quantificação de quimiocinas pela técnica *Cytometric Bead Array* (CBA)**

A concentração das quimiocinas séricas (IP-10, MCP-1, RANTES e IL-8) foi determinada no soro dos pacientes e controles. A determinação foi realizada por citometria de fluxo, utilizando BD™ CBA – *Human chemokines Kit*, seguindo instruções do fabricante. Foram adquiridos 1800 eventos no aparelho de citometria de fluxo (FACsVerse™, BD BIOSCIENCES, Sunnyvale, CA). Os dados foram analisados com o programa BD FACSuite™ (BD Biosciences, CA) e expressos em pg/mL.

6.4.2 Quantificação das concentrações séricas de *sPD1*, *sPD-L1*, *s4-1BB*, *sOX40* e *sTREM1*

As concentrações séricas desses mediadores foram quantificadas em amostras de plasma por *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA), utilizando os kits da R&D system (*sPD1*, *sPD-L1*, *s4-1BB*) e *sCD134/OX40* (Soluble) Human ELISA Kit (Invitrogen, conforme instruções do fabricante). Os níveis de *sTREM-1* foram dosados utilizando Human *sTREM-1* ELISA kit (Hycult Biotech, USA) seguindo as instruções. As concentrações foram expressas em pg/mL.

7

ANÁLISE ESTATÍSTICA

7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A estatística descritiva das variáveis categóricas foi representada em tabelas com distribuição das frequências absolutas e relativas, enquanto as variáveis contínuas foram apresentadas como medidas de tendência central (mediana, mínimo e máximo).

Para as variáveis quantitativas, foi inicialmente aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. As variáveis quantitativas com distribuição não normal foram apresentadas em valores de mediana e intervalo interquartil (IQR: 25%-75%). O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparação entre dois grupos. O teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* foi utilizado para comparação entre três ou mais grupos. Para evitar erro estatístico tipo I, as análises pelo teste *Kruskal-Wallis* foram seguidas pela correção de Dunn para testagem múltipla. Foi adotado o nível de significância estatística de $p < 0.05$. A análise estatística foi realizada através do programa *GraphPad Prism v8.0* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

8

RESULTADOS

8 RESULTADOS

8.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES COM SD22q11.2

As características clínicas dos pacientes com SD22q11.2 estão descritas na **Tabela 1**. Todos os pacientes avaliados tiveram o diagnóstico molecular da SD22q11.2 confirmados por meio dos testes de detecção de deleções e duplicações de regiões genômicas, como *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) e/ou por *array* genômico.

Tabela 1. Distribuição das frequências absolutas e relativas das características clínicas de 15 pacientes com a SD22q11.2

CARACTERÍSTICAS	N=15	%
IDADE (anos)		
Mediana (mín-max)	15 (2-37)	
Interquartil (25-75)	11-18	
SEXO		
Masculino	11	73,3
Feminino	4	26,7
ALTERAÇÕES PALATAIS		
Sim	9	69,2
Não	4	30,8
Não avaliado ¹	2	
<i>Tipos de alterações²</i>		
Voz anasalada	9	-
Insuficiência velofaríngea	7	-
Fenda submucosa	3	-
Fenda labial e/ou palatina	3	-
CARDIOPATIA CONGÊNITA		
Sim	9	60
Não	6	40
<i>Tipos de alterações²</i>		
Tetralogia de Fallot	3	-
Comunicação interventricular ou interatrial	6	-
Outras ³	4	-
MALFORMAÇÃO GÊNITO-URINÁRIA		
Sim	3	20
Não	12	80
<i>Tipos de alterações²</i>		
Criptorquidia	3	-
Estenose da junção ureteropielica	1	-
Rim displásico	1	-
Refluxo vésico-ureteral	1	-

¹ Avaliação não foi possível em virtude da faixa etária dos pacientes; ² Alguns pacientes apresentam mais de um tipo de alteração; ³ Interrupção do arco aórtico tipo B, *Truncus arteriosus*, Estenose pulmonar valvar.

8.2 ANÁLISES DAS QUIMIOCINAS MCP-1/CCL2, IL8/CXCL8 E DO MEDIADOR SOLÚVEL sTREM-1

Como pode ser observado na **Figura 9**, observou-se que os pacientes apresentaram níveis elevados de sTREM-1, MCP1 e IL8 quando comparados aos controles ($p < 0,05$)

Diante desses achados e pelo fato de se tratar de moléculas relacionadas à atividade inflamatória e autoimunidade, fizemos a comparação entre os pacientes com a SD22q11.2 com e sem doenças autoimunes. Foram observados níveis significativamente aumentados de sTREM-1 nos pacientes com doenças autoimunes ($p = 0,01$). Não houve diferenças significativas nos níveis de MCP1 e IL8 entre os grupos de pacientes com e sem doenças autoimunes.

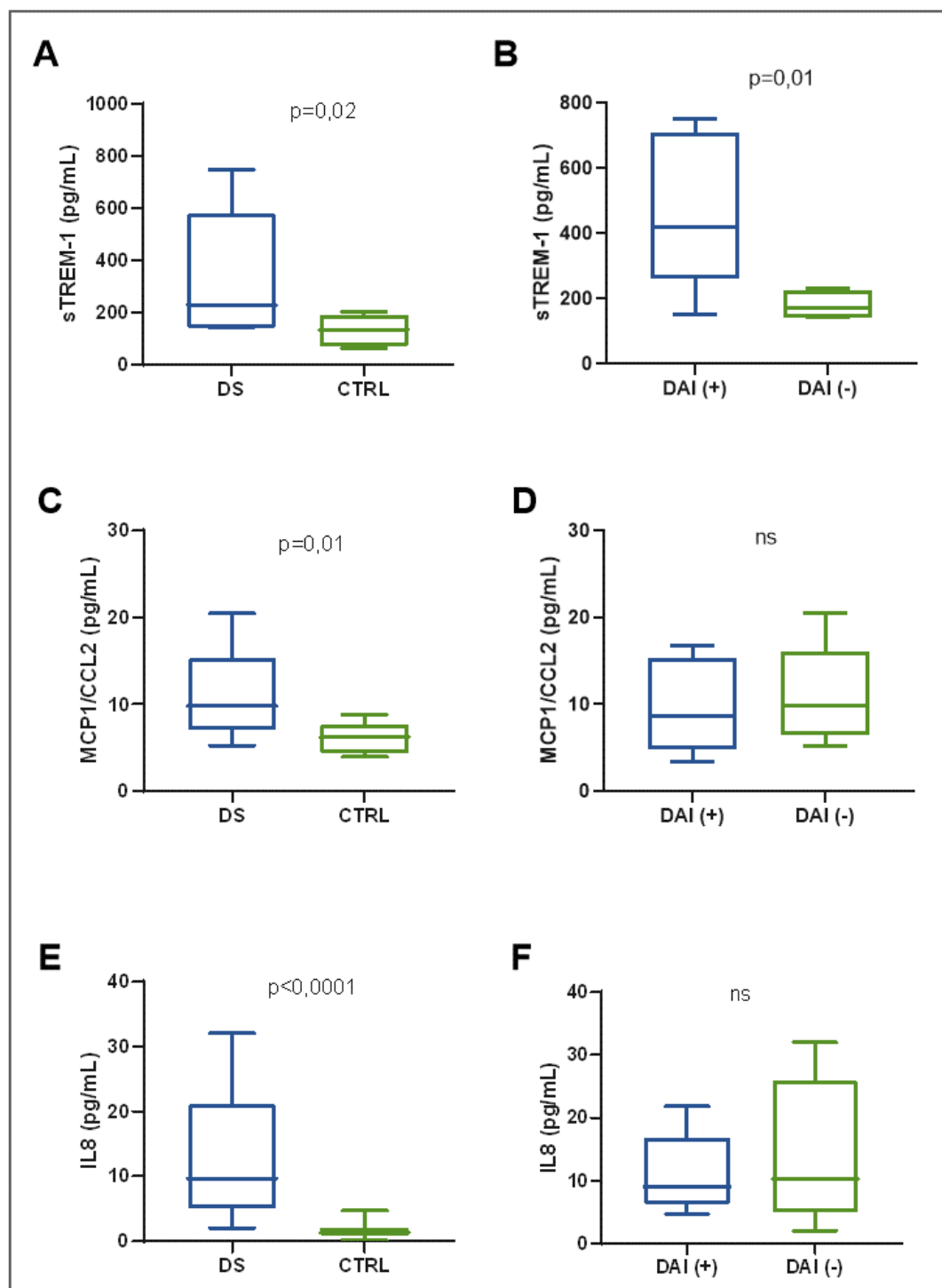


Figura 9. Níveis (pg/mL) de sTREM-1, MCP1/CCL2 e IL8/CXCL8 no sangue periférico dos pacientes com SD22q11.2 e controles (**A**, **C** e **E**, respectivamente) e nos pacientes com SD22q11.2 com (DAI+) e sem doença autoimune (DAI-) (**B**, **D** e **F**, respectivamente). Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25–75%). Foi considerado significativo $p < 0,05$. ns: não significativo.

8.3 ANÁLISES DOS MEDIADORES SOLÚVEIS sOX40 e s4-1BB

Foram observados níveis séricos diminuídos de sOX40 nos pacientes com SD22q11.2 quando comparados aos controles ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa nos níveis de s4-1BB entre os pacientes com a SD22q11.2 e os controles.

Verificou-se que o grupo de pacientes com doenças autoimunes apresentaram níveis diminuídos de sOX40 e elevados de s4-1BB quando comparados ao grupo sem doenças autoimunes ($p < 0,05$; **Figura 10**).

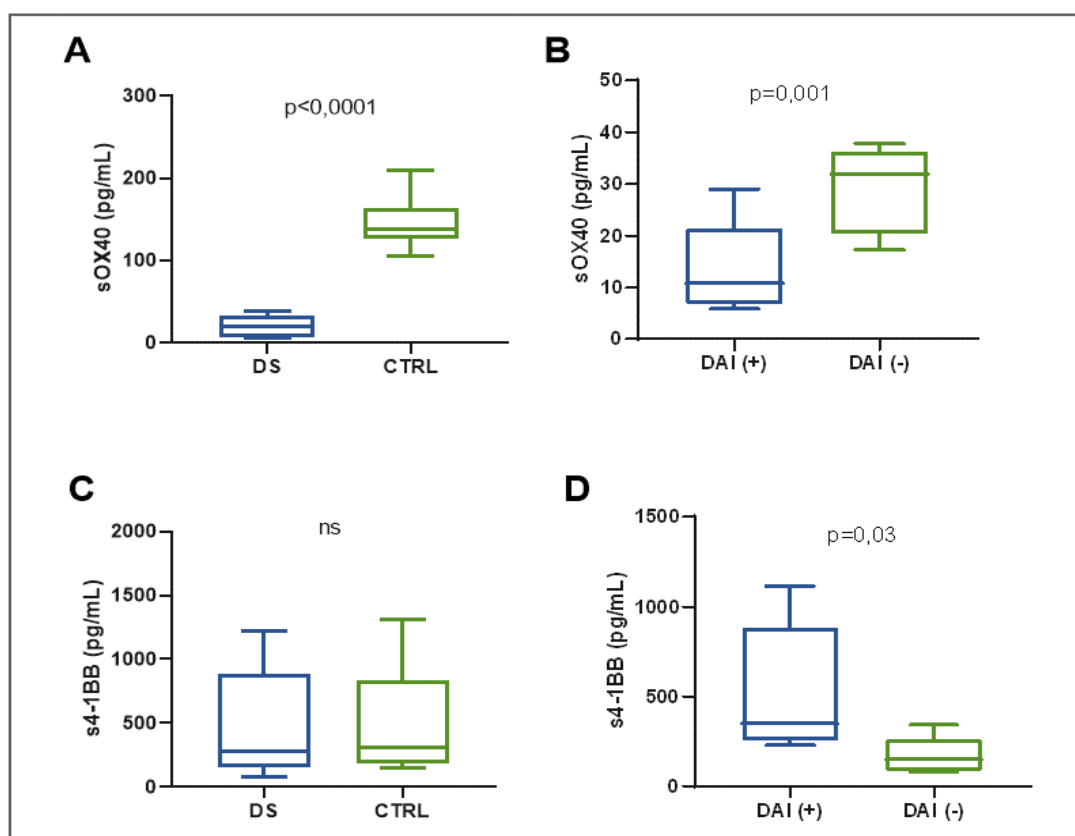


Figura 10. Níveis solúveis (pg/mL) de sOX-40 e s4-1BB no sangue periférico dos pacientes com SD22q11.2 e controles (**A** e **C**, respectivamente) e nos pacientes com SD22q11.2 com (DAI+) e sem doença autoimune (DAI-) (**B** e **D**, respectivamente). Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25–75%). Foi considerado significativo $p < 0,05$. ns: não significativo.

8.4 ANÁLISES DAS QUIMIOCINAS IP10/CXCL10 E RANTES/CCL5

Conforme a **Figura 11**, foram observados níveis séricos significativamente menores de RANTES/CCL5 nos pacientes com SD22q11.2 quando comparados aos controles ($p=0,001$).

Os pacientes com doenças autoimunes apresentaram níveis elevados de IP10/CXCL10 e RANTES/CCL5 quando comparados aos sem doenças autoimunes ($p=0,006$ e $0,002$, respectivamente).

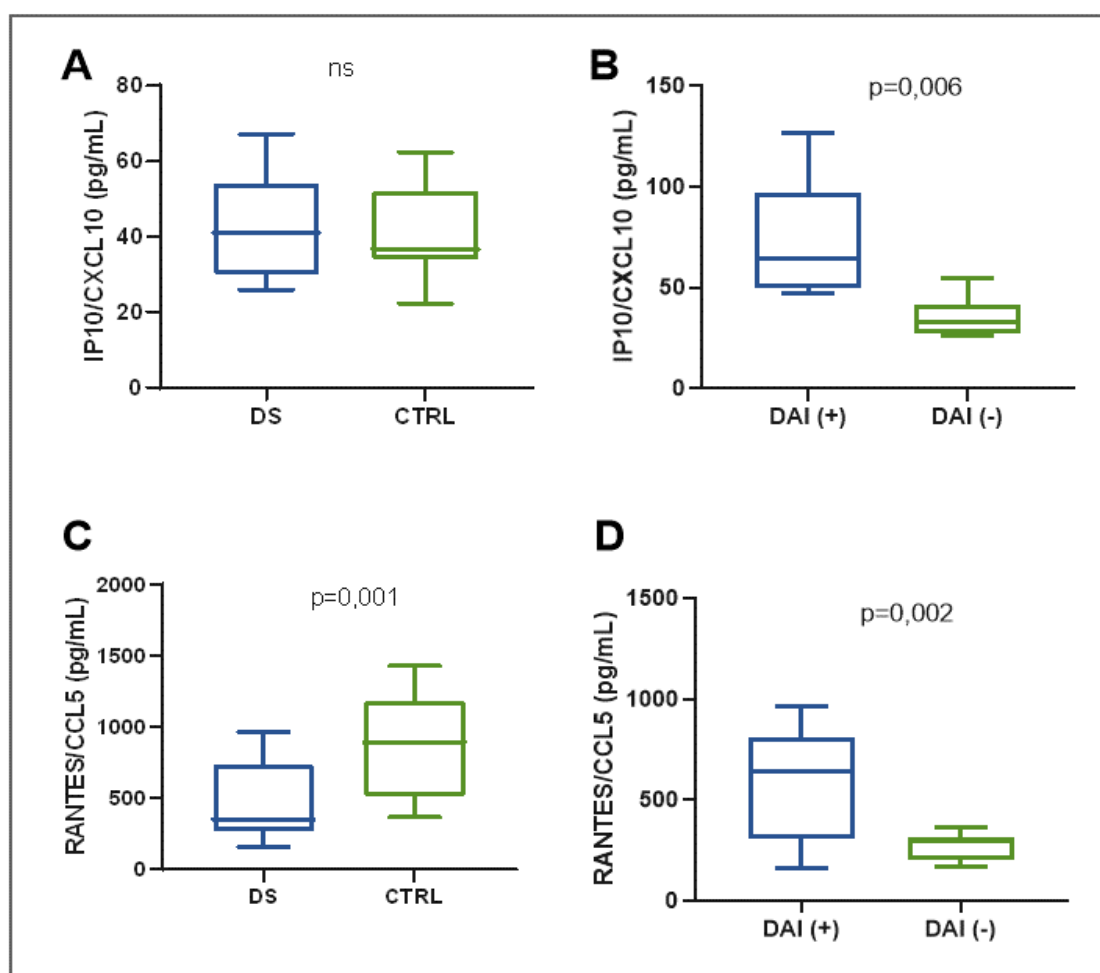


Figura 11. Níveis séricos (pg/mL) de IP10/CXCL10 e RANTES/CCL5 dos pacientes com SD22q11.2 e controles (**A** e **C**, respectivamente) e nos pacientes com SD22q11.2 com (DAI+) e sem doença autoimune (DAI-) (**B** e **D**, respectivamente). Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25–75%). Foi considerado significativo $p<0,05$. ns: não significativo.

8.5 ANÁLISE DOS MEDIADORES SOLÚVEIS sPD1 e sPDL1

Conforme a **Figura 12**, foram observadas aumento dos níveis de sPD1 nos pacientes com doenças autoimunes ($p=0,03$), enquanto os níveis de sPDL1 foram elevados no grupo de pacientes sem doença autoimunes ($p=0,03$ e $p=0,01$, respectivamente).

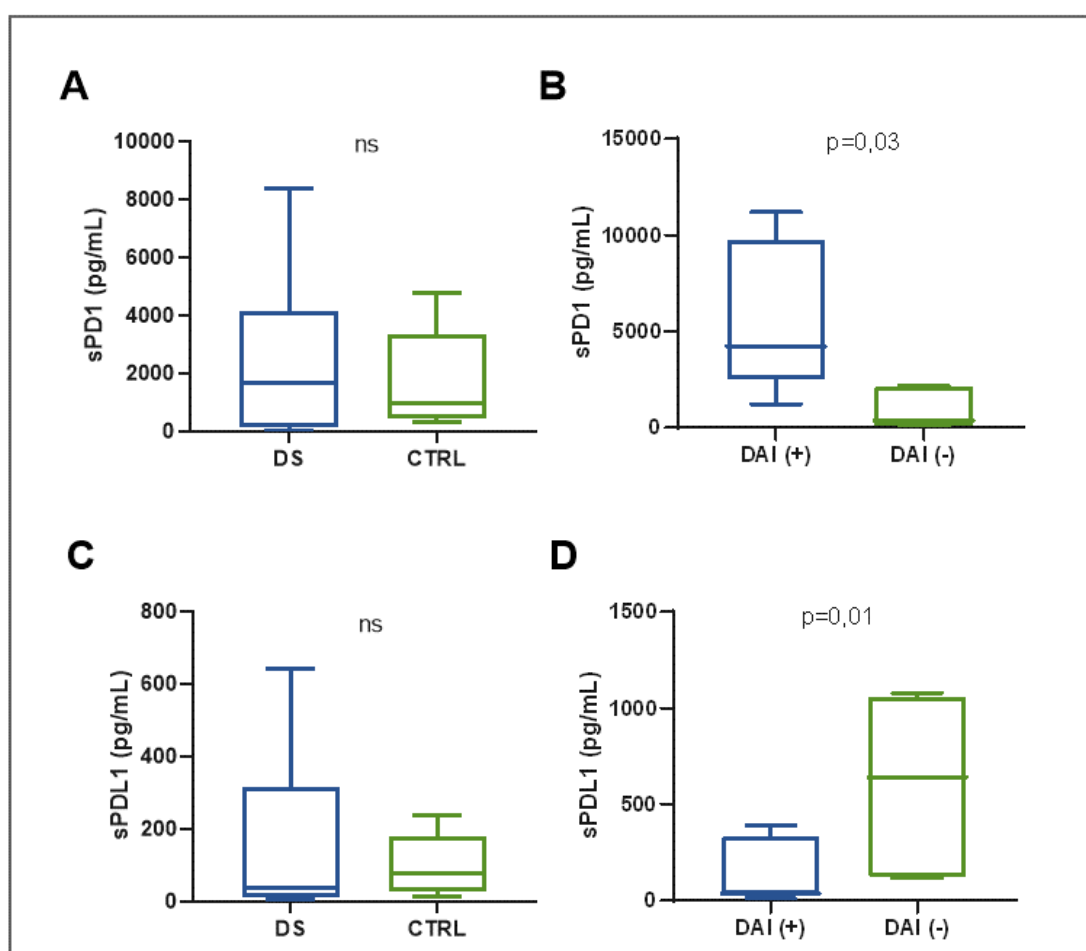


Figura 12. Níveis solúveis (pg/mL) de sPD1 e sPDL1 no sangue periférico dos pacientes com SD22q11.2 e controles (A e C, respectivamente) e nos pacientes com SD22q11.2 com (DAI+) e sem doença autoimune (DAI-) (B e D, respectivamente). Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25–75%). Foi considerado significativo $p<0,05$. ns: não significativo.

8.6 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE RANTES/CCL5, IP10/CXCL10, s4-1BB e sOX40 NOS PACIENTES COM E SEM PLAQUETOPENIA

Quando comparados os pacientes com a SD22q11.2 com e sem plaquetopenia, observou-se níveis elevados sOX40 naqueles que tinham plaquetopenia ($p=0,002$). Não foi observada diferença estatisticamente significativa nos níveis séricos de RANTES/CCL5, IP10/CXCL10 e s4-1BB entre os grupos (**Figura 13**).

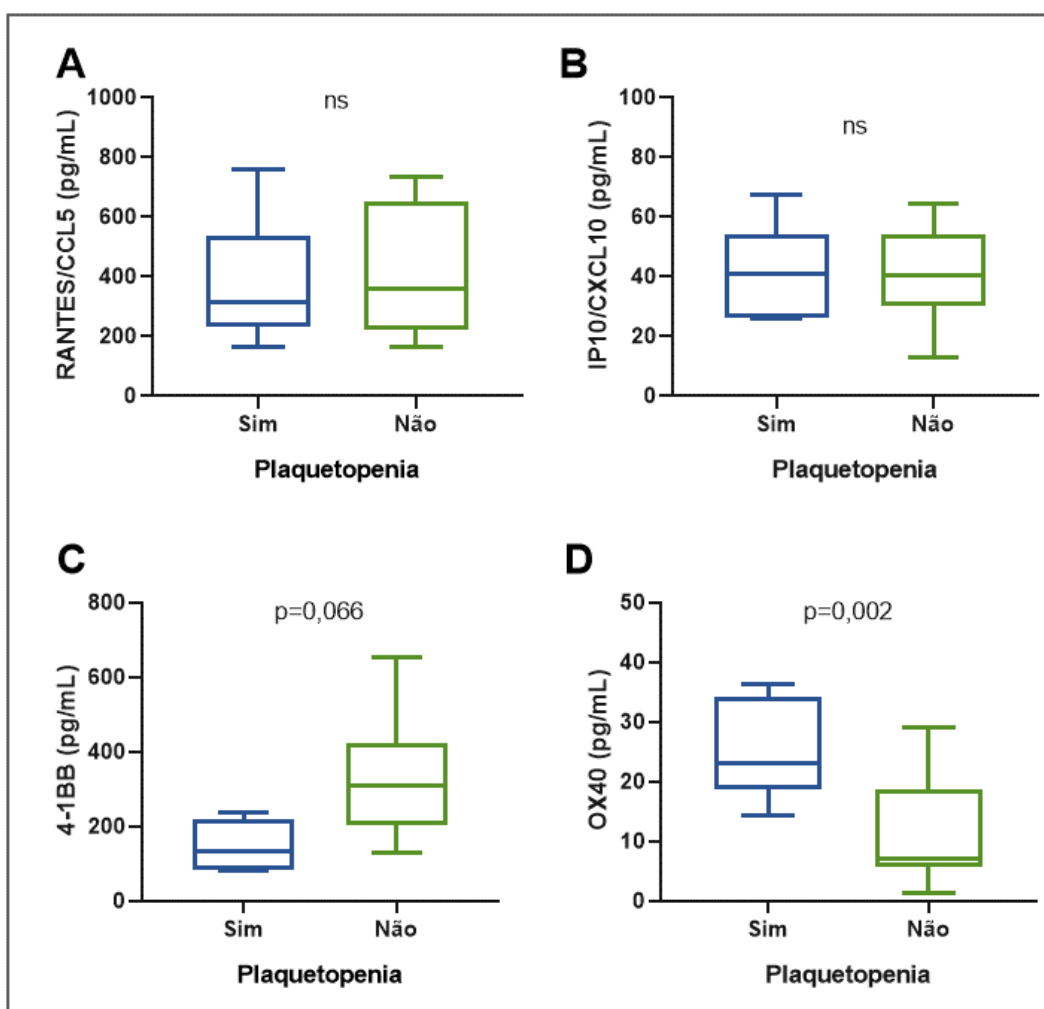


Figura 13. Níveis (pg/mL) de RANTES/CCL5 (A), IP10/CXCL10 (B), 4-1BB (C) e OX40 (D) no sangue periférico dos pacientes com SD22q11.2 com e sem plaquetopenia. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25–75%). Foi considerado significativo $p<0,05$. ns: não significativo.

8.7 ASSOCIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS COM OS NÍVEIS sTREM1, sOX40, s4-1BB, sPD1 E sPD-L1

Para realização da análise, foram utilizados como ponto de corte os valores de mediana dos níveis de sTREM1, sOX40, s4-1BB, sPD1 E sPD-L1.

Foi observada associação de cardiopatia congênita com os níveis séricos de sPD1, onde 100% dos pacientes cardiopatia congênita apresentaram níveis mais elevados de sPD1 (> 1652 pg/mL) (**Tabela 3**). Não foram observadas diferenças estatísticas significativas para todas as demais variáveis analisadas, conforme pode ser observado nas **Tabela 2 e 3**.

Tabela 2. Análises da associação das características clínicas e laboratoriais de acordo as medianas dos valores absolutos de sTREM1, sOX40 e s4-1BB encontrados no sangue periférico dos pacientes com SD22q11.2

	sTREM-1		p*	sOX40		p*	s-4-1BB		p*
	≤ 420	> 420	valor	≤ 13,7	> 13,7	valor	≤ 354	> 354	valor
Concentração sérica (pg/mL) (percentil 50)									
IDADE (anos)	N (%)	N (%)	1,00			0,26			0,28
< 18	4 (50)	3 (60)		3	4		5	4	
≥ 18	5 (50)	2 (40)		5	1		1	5	
SEXO			0,89			0,56			0,56
Feminino	3 (33,3)	1 (20)		2	2		3	1	
Masculino	6 (66,6)	4 (80)		3	8		5	6	
CARDIOPATIA CONGÊNITA			0,98			0,32			1,00
Sim	5 (55,5)	3 (60)		2	7		8	1	
Não	4 (44,4)	2 (40)		3	3		5	1	
INFECÇÕES DE REPETIÇÃO			0,95			0,10			1,00
Sim	6 (66,6)	3 (60)		5	5		3	7	
Não	3 (33,3)	2 (40)		0	5		2	3	
DOENÇA AUTOIMUNE			0,26			0,32			0,97
Sim	2 (22,2)	3 (60)		3	3		3	3	
Não	7 (77,7)	2 (40)		2	7		6	3	
PLAQUETOPENIA			1,00			0,58			0,75
Sim	3 (33,3)	2 (40)		1	5		4	2	
Não	6 (66,6)	3 (60)		4	5		5	4	

*Teste exato de Fischer; Foi considerado significativo valor de $p < 0,05$; Os pacientes sem informações referentes as variáveis relacionadas na tabela foram excluídos destas análises.

Tabela 3. Análises da associação das características clínicas e laboratoriais de acordo as medianas dos valores absolutos de sPD1 e sPD-L1 encontrados no sangue periférico dos pacientes com SD22q11.2

	sPD1		p* valor	sPD-L1		p* valor
	≤ 1652	> 1652		≤ 37	> 37	
Concentração sérica (pg/mL) (percentil 50)						
IDADE (anos)	N (%)	N (%)	0,58			1,00
< 18	2 (40)	6 (66,6)		2	6	
≥ 18	3 (60)	3 (33,3)		2	4	
SEXO			0,23			0,29
Feminino	3 (50)	1 (11,1)		3	1	
Masculino	3 (50)	8 (88,8)		4	7	
CARDIOPATIA CONGÊNITA			0,027			0,11
Sim	3 (33,3)	6 (100)		3	6	
Não	6 (66,6)	0 (0)		5	1	
INFECÇÕES DE REPETIÇÃO			0,58			0,28
Sim	5 (83,3)	5 (55,5)		6	4	
Não	1 (16,6)	4 (44,4)		1	4	
DOENÇA AUTOIMUNE			1,00			1,00
Sim	2 (33,3)	4 (44,4)		3	3	
Não	4 (66,6)	5 (55,5)		4	5	
PLAQUETOPENIA			0,62			1,00
Sim	3 (50)	3 (33,3)		3	3	
Não	3 (50)	6 (66,6)		4	5	

*Teste exato de Fischer; Foi considerado significativo valor de $p < 0,05$; Os pacientes sem informações referentes as variáveis relacionadas na tabela foram excluídos destas análises.

9

DISCUSSÃO

9 DISCUSSÃO

As imunodeficiências primárias compreendem um grupo de doenças decorrentes da falha de um ou mais componentes da resposta imune, sendo as infecções recorrentes e/ou as suas complicações as principais manifestações clínicas. A maioria dos indivíduos acometidos por esse grupo de doenças não apresenta dismorfismos craniofaciais e/ou malformações congênitas em outros órgãos ou sistemas, porém existe um grupo bem definido de síndromes associadas com imunodeficiência, as chamadas imunodeficiências sindrômicas¹⁰⁶. Nessas condições clínicas, existem anormalidades em outros órgãos e/ou sistemas juntamente com as alterações imunológicas, sendo muitas dessas doenças reconhecidas como síndromes genéticas malformativas¹⁰⁷.

De acordo com a classificação proposta pela União Internacional de Sociedades de Imunologia (IUIS, do inglês *International Union of Immunology Societies*), a SD22q11.2 pertence ao grupo das imunodeficiências combinadas com achados associados ou imunodeficiências sindrômicas¹⁰⁶.

As quimiocinas compõem uma grande família de pequenas citocinas que, juntamente com os seus receptores, têm a propriedade de controlar a migração e a residência de todas as células do sistema imune. Um subgrupo tem a sua liberação sob o estímulo de uma resposta imune em um sítio infeccioso, sendo consideradas pró-inflamatórias e outras participam do controle da migração celular durante o desenvolvimento ou a manutenção dos tecidos, sendo consideradas homeostáticas¹⁰⁸.

Nos últimos anos, diversos avanços vêm sendo realizados no sentido de identificar o papel desse grupo de mediadores do sistema imune no desenvolvimento de doenças, havendo relatos do seu envolvimento em diversas doenças inflamatórias e autoimunes, motivo pelo qual tivemos particular interesse em avaliar neste estudo^{70,73,74,108}.

Foram evidenciados níveis elevados de MCP-1 e IL-8 e reduzidos de RANTES nos pacientes quando comparados com os controles. A IL-8 é um potente quimiotático para os neutrófilos e também há relatos de que é quimiotática para um subgrupo de linfócitos T¹⁰⁹. Níveis elevados de IL-8 já foram observados em diversas doenças inflamatórias e/ou autoimunes, a saber: fibrose cística, doença pulmonar obstrutiva crônica, asma, psoríase, artrite reumatoide e doenças inflamatórias intestinais^{110,111}. Elevados níveis de IL-8 também foram observados após a administração sistêmica de endotoxinas ou após choque séptico, inclusive sendo considerado um marcador de prognóstico em pacientes com sepse¹¹².

Além disso, a elevação dos níveis de MCP-1 já foi identificada em algumas doenças, como na aterosclerose, nas reações de hipersensibilidade tardia, no melanoma e em diversas doenças autoimunes, tais como: lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, esclerose sistêmica e uveítes, cujos mecanismos apresentam o envolvimento de fagócitos mononucleares¹¹³⁻¹¹⁵.

A molécula de OX40 é um receptor da família dos receptores do fator de necrose tumoral (TNFR), localizado na superfície de células TCD4⁺ ativadas e sua ativação pode promover sinais coestimuladores para as células que intensificam a sua proliferação e produção de citocinas, e prolongam a

sobrevivência de células T de memória efetora. As formas solúveis de OX40 são produzidas após as interações celulares com a clivagem proteolítica dessa molécula, sendo a perda da membrana um mecanismo de regulação da resposta imune na tentativa de retornar ao estado de homeostase, impedindo as ligações entre OX40 (células T efetoras) e OX40L (presente em APCs) ^{89,91}.

Foi observado que pacientes com a SD22q11.2 apresentam níveis reduzidos de sOX40 quando comparado com os indivíduos controle. Quando avaliados os pacientes com a SD22q11.2 com e sem doença autoimune, observou-se que o grupo com doença autoimune apresenta níveis reduzidos de sOX40 quando comparados com os pacientes sem doença autoimune. Nesse sentido, dois grupos evidenciaram redução nos níveis solúveis de OX40 em pacientes com artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico quando comparado com indivíduos saudáveis^{90,116}.

Contudo, quando avaliamos os níveis de s4-1BB dos pacientes SD22q11.2 com e sem doença autoimune, observamos níveis significativamente mais elevados de s4-1BB em pacientes com doença autoimune. A forma solúvel de 4-1BB é um importante regulador da resposta imune promovida pela linfócitos TCD8+ auto-reativos, pois ocupa a fenda do ligantes de 4-1BB presentes em células nucleadas humanas, como também nas APCs, antagonizando os efeitos deletérios dessas interações⁹⁵.

Estudos realizados com anticorpo anti-4-1BB revelaram melhora na incidência e gravidade da encefalite autoimune experimental, um modelo de rato com esclerose múltipla. O anti-4-1BB também inibiu a recaída que ocorre na encefalite autoimune experimental, característica da doença humana. Desde que

esses resultados foram publicados, muitos outros estudos seguiram e também injetaram anti-4-1BB em vários modelos de doenças autoimunes, com a maioria dos dados demonstrando forte inibição do desenvolvimento e progressão dessas doenças^{117,118}.

Um outro achado interessante neste estudo foi a elevação dos níveis de IP10 entre os pacientes com a SD22q11.2 e doenças autoimunes quando comparados aos pacientes que não tinham doenças autoimunes. O IP10, também conhecido como CXCL10, é uma quimiocina inflamatória que regula as respostas imunes por meio da ativação e recrutamento de leucócitos, tais como células T, eosinófilos, monócitos e células NK. Tanto o INF- γ quanto o TNF, secretados pelos linfócitos recrutados, aumentam a produção de IP10 por vários tipos de células, como células endoteliais, fibroblastos, tireócitos e células pancreáticas⁸². Estudos têm revelado que há um aumento na expressão sérica e/ou tecidual de IP10 em várias doenças autoimunes, tais como artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, esclerose sistêmica, esclerose múltipla, diabetes *mellitus* tipo 1, doença de Addison e tireoidopatias autoimunes¹¹⁹.

Curiosamente, só há um estudo na literatura, realizado por Aresvik e colaboradores¹²⁰ que investigou a expressão de citocinas em pacientes com a SD22q11.2 comparando com indivíduos saudáveis, identificou níveis aumentados de IP10 em pacientes com a SD22q11.2 quando comparados com os controles, porém não observou diferença significativa entre os pacientes com e sem doenças autoimunes. A possível explicação levantada por esses autores é de que o grupo estudado foi predominantemente composto por crianças sem

doenças autoimunes. Os autores reiteram, ainda, que níveis persistentemente elevados de IP10 podem levar ao desenvolvimento de distúrbios autoimunes ou inflamatórios no decorrer da vida. No entanto, estudos prospectivos de acompanhamento são necessários para confirmar esta hipótese.

O RANTES é produzido por linfócitos T, macrófagos, plaquetas, fibroblastos, epitélio e certos tipos de células tumorais. Atua provendo o recrutamento de leucócitos para locais com processo inflamatório¹²¹. Ademais, RANTES tem um papel fundamental na resposta imune contra infecções virais à medida que é liberado por células TCD8⁺ ativadas por vírus específicos, juntamente com perforina e granzima A⁸⁰. Desse modo, os valores reduzidos de RANTES nos pacientes com SD22q11.2 pode ter um papel na maior suscetibilidade a infecções virais observada nesses pacientes.

Além disso, sabe-se que OX40 promove a expressão de RANTES pelas células endoteliais. A observação de que os pacientes com a SD22q11.2 apresentam níveis solúveis reduzidos de OX40 pode contribuir para a expressão reduzida de RANTES observada nos pacientes¹²².

Nos pacientes com SD22q11.2, os níveis elevados de linfócitos TCD3⁺/PD1⁺ encontrados podem sugerir um mecanismo regulatório do sistema imune, tendo em vista que as moléculas PD1 estão expressas nas células T em exaustão, frente a uma contínua e prolongada exposição aos antígenos, quando os linfócitos T efetores iniciam o processo de apoptose celular. Esse mecanismo acontece principalmente em doenças infecciosas de difícil eliminação e nas doenças crônicas, como câncer e autoimunidade⁹⁷.

Ademais, Elder e colaboradores¹²³ observaram que pacientes com cardiopatia congênita que são submetidos a abordagem cirúrgica envolvendo timectomia apresentam uma série de alterações no sistema imune, incluindo um aumento na expressão de PD1. Os autores levantam a hipótese de que a timectomia leva a uma aceleração na maturação de células T e exaustão do sistema imune.

Nesse sentido, sabe-se que um dos achados mais frequentes nos pacientes com a SD22q11.2 é a presença de cardiopatia congênita, especialmente as alterações envolvendo os vasos da base, boa parte delas com necessidade de correção cirúrgica. Além disso, conforme já mencionado anteriormente, os pacientes com a SD22q11.2 apresentam hipoplasia ou aplasia tímica, que poderia ter correlação com as anormalidades envolvendo a expressão de PD1 encontradas no presente estudo. Tais achados são preliminares e necessitam de novos estudos com maior número de pacientes para confirmar essa possível associação.

Considerando os fenótipos de infecções recorrentes e autoimunidade, avaliamos os níveis séricos de TREM-1, mediador expresso predominantemente em neutrófilos e monócitos/macrófagos, sendo caracterizado como um iniciador e amplificador da resposta inflamatória⁸⁴. A utilização de bloqueadores de TREM-1 tem ressaltado a importância deste receptor durante o processo inflamatório, induzindo o aumento da síntese de TNF- α e IL-10 produzidos por monócitos ativados por lipopolissacarídeos, bem como na estimulação da liberação da mieloperoxidase por granulócitos. O bloqueio de TREM1 também

reduz a inflamação e aumenta a sobrevivência de camungondos a infecções bacterianas que causam síndromes hiperinflamatórias sistêmicas⁸³.

Durante a realização do presente estudo, observamos que os pacientes com a SD22q11.2 apresentam níveis significativamente mais elevados de TREM-1 quando comparados com os indivíduos saudáveis. Ademais, quando comparamos os pacientes com a SD22q11.2 com e sem doença autoimune, observamos que os pacientes com doenças autoimunes apresentam níveis séricos significativamente mais elevados do que os pacientes sem doenças autoimunes.

Níveis séricos elevados de TREM-1 tem sido observados não só em processos inflamatórios agudos, mas também em doenças inflamatórias crônicas, incluindo aterosclerose, resistência periférica à insulina e obesidade, além de doenças autoimunes, tais como: artrite reumatoide, doenças inflamatórias intestinais, lúpus eritematoso sistêmico e diabetes *mellitus* tipo 1¹²⁴⁻¹²⁶.

Os pacientes com SD22q11.2 apresentam um *status* “pró-inflamatório” basal, possivelmente decorrente das alterações gênicas características da SD22q11.2, que ocasionam um comprometimento na resposta imune contra patógenos. A persistência antigênica decorrente da ineficácia da resposta imune contribui para o aumento na incidência de doenças autoimunes nesse grupo de pacientes, já que mediadores inflamatórios são produzidos em grandes quantidades e de forma contínua.

Ao longo do desenvolvimento deste estudo, foram realizadas consultas constantes da literatura para atualização do trabalho e garantir o desenvolvimento da presente pesquisa com a qualidade científica que lhe é imperativa. Contudo, até o momento, observamos que não existem trabalhos científicos que caracterizem de forma detalhada a regulação do sistema imune em pacientes com a SD22q11.2. Portanto, temos a oportunidade de apresentar à comunidade científica algo inédito, com resultados significativos, contribuindo para um melhor entendimento da patogênese das alterações imunológicas dos pacientes com SD22q11.2.

Os achados acima expostos mostram que os pacientes apresentam diversas alterações da resposta imune, caracterizadas não apenas pelo comprometimento de algumas populações linfocitárias já descritas previamente, mas também no perfil de expressão de quimiocinas, sugerindo um estado “basal” de desregulação imune, que pode contribuir para o desenvolvimento de autoimunidade, já descrita nessa patologia.

Portanto, os resultados obtidos com este estudo mostram que a quantificação de mediadores envolvidos ativação e supressão da resposta imune celular em um grupo maior de pacientes pode trazer valiosas informações sobre potenciais alvos terapêuticos e possíveis biomarcadores preditivos de doenças autoimunes para SD22q11.2.

10

CONCLUSÕES

10 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo e a análise crítica da literatura permitem concluir que:

- Os pacientes com SD22q11.2 possuem defeitos na produção de mediadores solúveis (proteínas) envolvidos na promoção e supressão da resposta inflamatória, sendo fundamentais para manter a equilíbrio fisiológico do sistema imune, independente de exposição a fatores externos que possam desencadear a ativação da resposta imunológica. Possivelmente, as alterações gênicas estejam envolvidas no *downregulation* ou *upregulation* dessas proteínas, sendo consequência também das alterações tímicas.
- Foram observados níveis séricos aumentados dos mediadores sTREM-1, MCP1, IL8 e IP10 e níveis séricos reduzidos de sOX40 e RANTES nos pacientes com SD22q11.2. Tais moléculas poderão servir como biomarcadores preditivos de autoimunidade nos pacientes com SD22q11.2 e emergir como novas abordagens terapêuticas.

11

ANEXOS

11 ANEXOS

Anexo A – Folha de aprovação do estudo na CAPPesq



1170

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: SÍNDROME DE DELEÇÃO DO 22Q11.2: ASPECTOS IMUNOLÓGICOS E MOLECULARES
Pesquisador Responsável: Chong Ae Kim **Versão:** 1
Pesquisador Executante: Diogo Cordeiro de Queiroz Soares **CAAE:** 37684314.9.0000.0068
Co-autores: Magda Maria Sales Carneiro-Sampaio, Leuridan Cavalcante Torres, Leslie Domenici Kulikoswki
Finalidade Acadêmica: Doutorado
Instituição: HCFMUSP
Departamento: PEDIATRIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 12281
Número do Parecer: 881.694
Data da Relatoria: 19/11/2014

Apresentação do Projeto: Pouco se sabe a respeito do comportamento do sistema imunológico nos pacientes com deleção atípica do cromossomo 22q11.2, que tem repercussão multisistêmica, por vezes com grave comprometimento, levando ao aumento significativo da morbimortalidade dos pacientes, atrelado a falta de estudos que caracterizem o sistema imune dos pacientes com deleções atípicas no 22q11.2. É necessária a caracterização do sistema imune para uma melhor compreensão das alterações imunológicas mais frequentes nestes pacientes. Este estudo irá realizar a fenotipagem das diversas populações celulares envolvidas com a imunidade inata e adaptativa, bem como os mecanismos envolvidos na regulação do sistema imune dos pacientes com diferentes tipos de deleção 22q11.2.

Objetivo da Pesquisa: - Realizar a imunofenotipagem de populações T, B, NK, NKT, T E B reguladoras, e suas subpopulações; - Determinar o número de moléculas TRECs nas populações de células T e Treg; - Quantificar o número de moléculas kappa-deleting recombination excision circle (KRECs) nos linfócitos B e Breg; - Realizar a dosagem de citocinas pró-inflamatórias e imunorreguladoras; - Realizar a avaliação clínica e correlacionar com os achados laboratoriais entres os pacientes com deleções típicas e atípicas na região 22q11.2.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: O procedimento a ser realizado no paciente será uma única coleta de sangue periférico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O estudo é inédito e bem fundamentado. O tipo de estudo a ser realizado não requer aprovação da CONEP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: O termo de consentimento livre e esclarecido está redigido de modo adequado, em linguagem simples de fácil compreensão.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: O projeto apresenta condições de ser aprovado pela CAPPesq

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto conforme delineado; **b)** elaborar e apresentar relatórios parciais e final; **c)** apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; **d)**



Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 24 de Novembro de 2014

PROF. DR. JOEL FAINTUCH
Vice - Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa – CAPPesq

Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (versão Pacientes)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – HC-FMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

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 (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Síndrome de Deleção do 22q11.2: aspectos imunológicos e moleculares**

PESQUISADOR : Prof^a. Dr^a. Chong Ae Kim

CARGO/FUNÇÃO: Médica Assistente da Unidade de Genética do Instituto da Criança do HC-FMUSP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 40054

UNIDADE DO HCFMUSP: Unidade de Genética do Instituto da Criança do HC-FMUSP

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 meses

1. Gostaríamos de convidar seu filho (a) para participar de nossa pesquisa. Existem evidências de que as infecções de repetição apresentadas pelos pacientes com síndrome de deleção do 22q11.2 ocorram devido a alterações no sistema imunológico. É importante investigar se existem alterações no sistema imune dos pacientes, para que possamos adquirir conhecimentos que ajudarão a melhorar a qualidade de vida deles. O objetivo deste trabalho é estudar a imunidade dos doentes e encontrar as alterações que podem levar às repetidas infecções;
2. Os procedimentos realizados serão testes laboratoriais relacionados com a imunidade;
3. Serão feitas coletas de 10 mL de sangue periférico para realização dos testes laboratoriais. Nas crianças com peso inferior a 10 Kg, serão coletadas quantidades menores de sangue (5 mL); Será realizada uma única coleta de sangue;
4. Existe um risco mínimo para o paciente. A coleta poderá provocar hematoma no local da picada da agulha. Os pais dos pacientes serão orientados de como tratar, caso ocorra hematoma no local;
5. O sangue colhido será usado para os exames laboratoriais;
6. A princípio, não existe benefício direto para o paciente. No final do estudo, será possível um melhor entendimento do sistema de defesa do corpo dos pacientes e talvez haja modificações no acompanhamento desses pacientes;
7. Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é a Dra. Chong Ae Kim que pode ser encontrada no Instituto da Criança do HC-FMUSP, localizado na Av. Enéas Carvalho de Aguiar, 647, Telefone (11) 2661.8671. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 2661-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hc.fm.usp.br
8. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
9. Direito de confidencialidade: As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

10. Os pais ou responsáveis legais dos pacientes com a síndrome de deleção do 22q11.2 poderão desistir da participação da pesquisa, sem nenhum prejuízo no atendimento do paciente pelo Instituto da Criança – HC-FMUSP.
11. Os pais ou responsáveis poderão ser informados dos resultados obtidos nos testes laboratoriais.
12. Não haverá despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não haverá compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
13. Os pesquisadores deste trabalho se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa, ou outras que se destinarem a elucidação das causas genéticas da síndrome.
14. Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Síndrome de Deleção do 22q11.2: aspectos imunológicos e moleculares”.

Eu discuti com a Dra. Chong Ae Kim sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

Anexo C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (versão Controles)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE
SÃO PAULO – HC-FMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: :.....

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 (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

4. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Síndrome de Deleção do 22q11.2: aspectos imunológicos e moleculares**

PESQUISADOR : Prof^a. Dr^a. Chong Ae Kim

CARGO/FUNÇÃO: Médica Assistente da Unidade de Genética do Instituto da Criança do HC-FMUSP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 40054

UNIDADE DO HCFMUSP: Unidade de Genética do Instituto da Criança do HC-FMUSP

5. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO RISCO MAIOR

6. DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 meses

7. Gostaríamos de convidar seu filho (a) para participar de nossa pesquisa.

8. O objetivo deste trabalho é estudar a imunidade dos pacientes com a síndrome de deleção do 22q11.2 e encontrar as alterações que podem levar às repetidas infecções;

9. Os procedimentos realizados serão testes laboratoriais, cujos resultados serão utilizados como parâmetros de comparação entre os indivíduos participantes e os pacientes com a síndrome de deleção do 22q11.2;

10. Serão feitas coletas de 10 mL de sangue periférico para realização dos testes laboratoriais. Nas crianças com peso inferior a 10 Kg, serão coletadas quantidades menores de sangue (5 mL); Será realizada uma única coleta de sangue;

11. Existe um risco mínimo para o participante. A coleta poderá provocar hematoma no local da picada da agulha. Os pais dos participantes serão orientados de como tratar, caso ocorra hematoma no local;

12. O sangue colhido será usado para os exames laboratoriais;

13. Não existe benefício direto para o participante. No final do estudo, teremos um melhor conhecimento das causas que provocaram as alterações na imunidade nos pacientes com a síndrome de deleção do 22q11.2;

14. Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é a Dra. Chong Ae Kim que pode ser encontrada no Instituto da Criança do HC-FMUSP, localizado na Av. Enéas Carvalho de Aguiar, 647, Telefone (11) 2661.8671. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 2661-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hc.fm.usp.br

15. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu atendimento na Instituição;

16. Direito de confidencialidade: As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

17. Os pais ou responsáveis legais dos participantes poderão desistir da participação na pesquisa, sem nenhum prejuízo no atendimento do paciente pelo Instituto da Criança – HC-FMUSP.

18. Os pais ou responsáveis poderão ser informados dos resultados obtidos nos testes laboratoriais.
19. Não haverá despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não haverá compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
20. Os pesquisadores deste trabalho se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa, ou outras que se destinarem a elucidação das causas genéticas da síndrome.
21. Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Síndrome de Deleção do 22q11.2: aspectos imunológicos e moleculares”.

Eu discuti com a Dra. Chong Ae Kim sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

12

REFERÊNCIAS

12 REFERÊNCIAS

1. Sedlackova E. The syndrome of the congenitally shortened velum. The dual innervation of the soft palate. *Folia Phoniatr (Basel)*. 1967;19(6):441-450.
2. Sedlackova E. Insufficiency of palatolaryngeal passage as a developmental disorder. *Cas Lek Cesk*. 1955;94(47-48):1304-1307.
3. Strong WB. Familial syndrome of right-sided aortic arch, mental deficiency, and facial dysmorphism. *J Pediatr*. 1968;73(6):882-888.
4. Di George AM, Lischner HW, Dacou C, Arey JB. Absence of the thymus. *Lancet*. 1967;1(7504):1387.
5. Kirkpatrick JA, Jr., DiGeorge AM. Congenital absence of the thymus. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med*. 1968;103(1):32-37.
6. Kinouchi A MK, Ando M, Takao A. Facial appearance of patients with conotruncal anomalies. *Pediatr Jpn*. 1976;17(1):84-87.
7. Shprintzen RJ, Goldberg RB, Lewin ML, et al. A new syndrome involving cleft palate, cardiac anomalies, typical facies, and learning disabilities: velo-cardio-facial syndrome. *Cleft Palate J*. 1978;15(1):56-62.
8. Bawle EV, Conard J, Van Dyke DL, Czarnecki P, Driscoll DA. Seven new cases of Cayler cardiofacial syndrome with chromosome 22q11.2 deletion, including a familial case. *Am J Med Genet*. 1998;79(5):406-410.
9. McDonald-McGinn DM, Driscoll DA, Bason L, et al. Autosomal dominant "Opitz" GBBB syndrome due to a 22q11.2 deletion. *Am J Med Genet*. 1995;59(1):103-113.
10. Sanka M, Tangsinmankong N, Loscalzo M, Sleasman JW, Dorsey MJ. Complete DiGeorge syndrome associated with CHD7 mutation. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(4):952-954.
11. Kobrynski LJ, Sullivan KE. Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *Lancet*. 2007;370(9596):1443-1452.
12. McDonald-McGinn DM, Zackai EH. Genetic counseling for the 22q11.2 deletion. *Dev Disabil Res Rev*. 2008;14(1):69-74.

13. Wapner RJ, Babiarz JE, Levy B, et al. Expanding the scope of noninvasive prenatal testing: detection of fetal microdeletion syndromes. *Am J Obstet Gynecol.* 2015;212(3):332.e331-339.
14. Grati FR, Molina Gomes D, Ferreira JC, et al. Prevalence of recurrent pathogenic microdeletions and microduplications in over 9500 pregnancies. *Prenat Diagn.* 2015;35(8):801-809.
15. Costain G, Chow EW, Silversides CK, Bassett AS. Sex differences in reproductive fitness contribute to preferential maternal transmission of 22q11.2 deletions. *J Med Genet.* 2011;48(12):819-824.
16. Carlson C, Sirotkin H, Pandita R, et al. Molecular definition of 22q11 deletions in 151 velo-cardio-facial syndrome patients. *Am J Hum Genet.* 1997;61(3):620-629.
17. Cuneo BF. 22q11.2 deletion syndrome: DiGeorge, velocardiofacial, and conotruncal anomaly face syndromes. *Curr Opin Pediatr.* 2001;13(5):465-472.
18. Morrow BE, McDonald-McGinn DM, Emanuel BS, Vermeesch JR, Scambler PJ. Molecular genetics of 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet A.* 2018;176(10):2070-2081.
19. McDonald-McGinn DM, Kirschner R, Goldmuntz E, et al. The Philadelphia story: the 22q11.2 deletion: report on 250 patients. *Genet Couns.* 1999;10(1):11-24.
20. McDonald-McGinn DM, LaRossa D, Goldmuntz E, et al. The 22q11.2 deletion: screening, diagnostic workup, and outcome of results; report on 181 patients. *Genet Test.* 1997;1(2):99-108.
21. Shaikh TH, Kurahashi H, Saitta SC, et al. Chromosome 22-specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis. *Hum Mol Genet.* 2000;9(4):489-501.
22. Lindsay EA. Chromosomal microdeletions: dissecting del22q11 syndrome. *Nat Rev Genet.* 2001;2(11):858-868.
23. Kelley RI, Zackai EH, Emanuel BS, Kistenmacher M, Greenberg F, Punnett HH. The association of the DiGeorge anomalad with partial monosomy of chromosome 22. *J Pediatr.* 1982;101(2):197-200.
24. DM M-M, KE S, B M, et al. 22q11.2 deletion syndrome. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1:15072.

25. McDonald-McGinn DM, Sullivan KE, Marino B, et al. 22q11.2 deletion syndrome. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15071.
26. Bassett AS, McDonald-McGinn DM, Devriendt K, et al. Practical guidelines for managing patients with 22q11.2 deletion syndrome. *J Pediatr*. 2011;159(2):332-339.e331.
27. Burnside RD. 22q11.21 Deletion Syndromes: A Review of Proximal, Central, and Distal Deletions and Their Associated Features. *Cytogenet Genome Res*. 2015;146(2):89-99.
28. Amati F, Conti E, Novelli A, et al. Atypical deletions suggest five 22q11.2 critical regions related to the DiGeorge/velo-cardio-facial syndrome. *Eur J Hum Genet*. 1999;7(8):903-909.
29. McDonald-McGinn DM, Sullivan KE. Chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *Medicine (Baltimore)*. 2011;90(1):1-18.
30. Gennery AR. Immunological aspects of 22q11.2 deletion syndrome. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(1):17-27.
31. Niarchou M, Zammit S, van Goozen SHM, et al. Psychopathology and cognition in children with 22q11.2 deletion syndrome. *Br J Psychiatry*. 2014;204(1):46-54.
32. Michaelovsky E, Frisch A, Carmel M, et al. Genotype-phenotype correlation in 22q11.2 deletion syndrome. *BMC Med Genet*. 2012;13:122.
33. McDonald-McGinn DM, Tonnesen MK, Laufer-Cahana A, et al. Phenotype of the 22q11.2 deletion in individuals identified through an affected relative: cast a wide FISHing net! *Genet Med*. 2001;3(1):23-29.
34. Bassett AS, Chow EW, Husted J, et al. Clinical features of 78 adults with 22q11 Deletion Syndrome. *Am J Med Genet A*. 2005;138(4):307-313.
35. 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):715-723.
36. Lischner HW, Huff DS. T-cell deficiency in diGeorge syndrome. *Birth Defects Orig Artic Ser*. 1975;11(1):16-21.
37. Conley ME, Beckwith JB, Mancier JF, Tenckhoff L. The spectrum of the DiGeorge syndrome. *J Pediatr*. 1979;94(6):883-890.

38. Davies EG, Cheung M, Gilmour K, et al. Thymus transplantation for complete DiGeorge syndrome: European experience. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140(6):1660-1670.e1616.
39. Markert ML, Devlin BH, Chinn IK, McCarthy EA, Li YJ. Factors affecting success of thymus transplantation for complete DiGeorge anomaly. *Am J Transplant*. 2008;8(8):1729-1736.
40. Gennery AR, Barge D, O'Sullivan JJ, Flood TJ, Abinun M, Cant AJ. Antibody deficiency and autoimmunity in 22q11.2 deletion syndrome. *Arch Dis Child*. 2002;86(6):422-425.
41. Sullivan KE, Jawad AF, Randall P, et al. Lack of correlation between impaired T cell production, immunodeficiency, and other phenotypic features in chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *Clin Immunol Immunopathol*. 1998;86(2):141-146.
42. Bale PM, Sotelo-Avila C. Maldevelopment of the thymus: 34 necropsy and 10 surgical cases, including 7 thymuses medial to the mandible. *Pediatr Pathol*. 1993;13(2):181-190.
43. Lima K, Abrahamsen TG, Foelling I, Natvig S, Ryder LP, Olausson RW. Low thymic output in the 22q11.2 deletion syndrome measured by CCR9+CD45RA+ T cell counts and T cell receptor rearrangement excision circles. *Clin Exp Immunol*. 2010;161(1):98-107.
44. Gul KA, Overland T, Osnes L, et al. Neonatal Levels of T-cell Receptor Excision Circles (TREC) in Patients with 22q11.2 Deletion Syndrome and Later Disease Features. *J Clin Immunol*. 2015;35(4):408-415.
45. Kanaya Y, Ohga S, Ikeda K, et al. Maturation alterations of peripheral T cell subsets and cytokine gene expression in 22q11.2 deletion syndrome. *Clin Exp Immunol*. 2006;144(1):85-93.
46. Sediva A, Bartunkova J, Zachova R, et al. Early development of immunity in diGeorge syndrome. *Med Sci Monit*. 2005;11(4):Cr182-187.
47. Sullivan KE, McDonald-McGinn D, Driscoll DA, Emanuel BS, Zackai EH, Jawad AF. Longitudinal analysis of lymphocyte function and numbers in the first year of life in chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999;6(6):906-911.
48. Chinen J, Rosenblatt HM, Smith EO, Shearer WT, Noroski LM. Long-term assessment of T-cell populations in DiGeorge syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(3):573-579.

49. Piliro LM, Sanford AN, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Sullivan KE. T-cell homeostasis in humans with thymic hypoplasia due to chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Blood*. 2004;103(3):1020-1025.
50. Finocchi A, Di Cesare S, Romiti ML, et al. Humoral immune responses and CD27+ B cells in children with DiGeorge syndrome (22q11.2 deletion syndrome). *Pediatr Allergy Immunol*. 2006;17(5):382-388.
51. Bjork AH, Oskarsdottir S, Andersson BA, Friman V. Antibody deficiency in adults with 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet A*. 2012;158a(8):1934-1940.
52. Junker AK, Driscoll DA. Humoral immunity in DiGeorge syndrome. *J Pediatr*. 1995;127(2):231-237.
53. Sullivan KE, McDonald-McGinn DM, Driscoll DA, et al. Juvenile rheumatoid arthritis-like polyarthritis in chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge anomalad/velocardiofacial syndrome/conotruncal anomaly face syndrome). *Arthritis Rheum*. 1997;40(3):430-436.
54. Tuvia J, Weisselberg B, Shif I, Keren G. Aplastic anaemia complicating adenovirus infection in DiGeorge syndrome. *Eur J Pediatr*. 1988;147(6):643-644.
55. Choi JH, Shin YL, Kim GH, et al. Endocrine manifestations of chromosome 22q11.2 microdeletion syndrome. *Horm Res*. 2005;63(6):294-299.
56. Kawame H, Adachi M, Tachibana K, et al. Graves' disease in patients with 22q11.2 deletion. *J Pediatr*. 2001;139(6):892-895.
57. Davies JK, Telfer P, Cavenagh JD, Foot N, Neat M. Autoimmune cytopenias in the 22q11.2 deletion syndrome. *Clin Lab Haematol*. 2003;25(3):195-197.
58. Duke SG, McGuirt WF, Jr., Jewett T, Fasano MB. Velocardiofacial syndrome: incidence of immune cytopenias. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2000;126(9):1141-1145.
59. Sullivan KE, McDonald-McGinn D, Zackai EH. CD4(+) CD25(+) T-cell production in healthy humans and in patients with thymic hypoplasia. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9(5):1129-1131.
60. Jawad AF, Prak EL, Boyer J, et al. A prospective study of influenza vaccination and a comparison of immunologic parameters in children and adults with chromosome 22q11.2 deletion syndrome (digeorge

- syndrome/velocardiofacial syndrome). *J Clin Immunol*. 2011;31(6):927-935.
61. Bosse KR, Shukla AR, Pawel B, et al. Malignant rhabdoid tumor of the bladder and ganglioglioma in a 14 year-old male with a germline 22q11.2 deletion. *Cancer Genet*. 2014;207(9):415-419.
 62. McDonald-McGinn DM, Reilly A, Wallgren-Pettersson C, et al. Malignancy in chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *Am J Med Genet A*. 2006;140(8):906-909.
 63. Lambert MP, Arulsevan A, Schott A, et al. The 22q11.2 deletion syndrome: Cancer predisposition, platelet abnormalities and cytopenias. *Am J Med Genet A*. 2018;176(10):2121-2127.
 64. Stevens T, van der Werff Ten Bosch J, De Rademaeker M, Van Den Bogaert A, van den Akker M. Risk of malignancy in 22q11.2 deletion syndrome. *Clin Case Rep*. 2017;5(4):486-490.
 65. Akker M, Stevens T, ten Bosch JV. MALIGNANCY IN THE CHROMOSOME 22Q11.2 DELETION SYNDROME (DIGEORGE SYNDROME/VELO-CARDIO-FACIAL SYNDROME). *Pediatric Blood & Cancer*. 2015;62:S271-S271.
 66. Beddow RA, Smith M, Kidd A, Corbett R, Hunter AG. Diagnosis of distal 22q11.2 deletion syndrome in a patient with a teratoid/rhabdoid tumour. *Eur J Med Genet*. 2011;54(3):295-298.
 67. Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immunity. *N Engl J Med*. 2000;343(5):338-344.
 68. PJ D, IM R. The Immune System. First of Two Parts. *The New England journal of medicine*. 2000;343(1).
 69. Clark R, Kupper T. Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol*. 2005;125(4):629-637.
 70. Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:659-702.
 71. Tang P, Wang JM. Chemokines: the past, the present and the future. In: *Cell Mol Immunol*. Vol 15. China2018:295-298.

-
72. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000;12(2):121-127.
 73. Yoshie O. Immune chemokines and their receptors: the key elements in the genesis, homeostasis and function of the immune system. *Springer Semin Immunopathol*. 2000;22(4):371-391.
 74. O Y, T I, H N. Chemokines in Immunity. *Advances in immunology*. 2001;78.
 75. Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest*. 1989;84(4):1045-1049.
 76. Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol*. 1994;56(5):559-564.
 77. Jiang Y, Beller DI, Frenzl G, Graves DT. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol*. 1992;148(8):2423-2428.
 78. Niu J, Kolattukudy PE. Role of MCP-1 in cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications. *Clin Sci (Lond)*. 2009;117(3):95-109.
 79. Schall TJ. Biology of the RANTES/SIS cytokine family. *Cytokine*. 1991;3(3):165-183.
 80. Appay V, Rowland-Jones SL. RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol*. 2001;22(2):83-87.
 81. Bodaghi B, Jones TR, Zipeto D, et al. Chemokine Sequestration by Viral Chemoreceptors as a Novel Viral Escape Strategy: Withdrawal of Chemokines from the Environment of Cytomegalovirus-infected Cells. *J Exp Med*. 1998;188(5):855-866.
 82. Taub DD, Lloyd AR, Conlon K, et al. Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J Exp Med*. 1993;177(6):1809-1814.
 83. Colonna M, Facchetti F. TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells): a new player in acute inflammatory responses. *J Infect Dis*. 2003;187 Suppl 2:S397-401.

-
84. Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, Colonna M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature*. 2001;410(6832):1103-1107.
 85. Derive M, Boufenzer A, Bouazza Y, et al. Effects of a TREM-like transcript 1-derived peptide during hypodynamic septic shock in pigs. *Shock*. 2013;39(2):176-182.
 86. Gibot S, Massin F, Marcou M, et al. TREM-1 promotes survival during septic shock in mice. *Eur J Immunol*. 2007;37(2):456-466.
 87. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*. 2012;119(3):651-665.
 88. Lasry A, Zinger A, Ben-Neriah Y. Inflammatory networks underlying colorectal cancer. *Nat Immunol*. 2016;17(3):230-240.
 89. Webb GJ, Hirschfield GM, Lane PJ. OX40, OX40L and Autoimmunity: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2016;50(3):312-332.
 90. Laustsen JK, Rasmussen TK, Stengaard-Pedersen K, et al. Soluble OX40L is associated with presence of autoantibodies in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(5):474.
 91. Withers DR, Gaspal FM, Bekiaris V, et al. OX40 and CD30 signals in CD4(+) T-cell effector and memory function: a distinct role for lymphoid tissue inducer cells in maintaining CD4(+) T-cell memory but not effector function. *Immunol Rev*. 2011;244(1):134-148.
 92. Martins MR, Santos RLD, Jatahy KDN, et al. Could OX40 agonist antibody promote activation of the anti-tumor immune response in gastric cancer? *J Surg Oncol*. 2018;117(5):840-844.
 93. Vinay DS, Kwon BS. Role of 4-1BB in immune responses. *Semin Immunol*. 1998;10(6):481-489.
 94. Vinay DS, Kwon BS. 4-1BB signaling beyond T cells. *Cell Mol Immunol*. 2011;8(4):281-284.
 95. Dharmadhikari B, Wu M, Abdullah NS, et al. CD137 and CD137L signals are main drivers of type 1, cell-mediated immune responses. *Oncoimmunology*. 2016;5(4):e1113367.

96. Chinen J, Notarangelo LD, Shearer WT. Advances in basic and clinical immunology in 2014. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;135(5):1132-1141.
97. Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA. The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. *Front Immunol.* 2016;7:550.
98. Huang X, Yang Y. Targeting Co-Stimulatory Pathways in Gene Therapy. *Front Microbiol.* 2011;2.
99. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:677-704.
100. Zhu X, Lang J. Soluble PD-1 and PD-L1: predictive and prognostic significance in cancer. *Oncotarget.* 2017;8(57):97671-97682.
101. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol.* 2001;2(3):261-268.
102. Selenko-Gebauer N, Majdic O, Szekeres A, et al. B7-H1 (programmed death-1 ligand) on dendritic cells is involved in the induction and maintenance of T cell anergy. *J Immunol.* 2003;170(7):3637-3644.
103. Dai S, Jia R, Zhang X, Fang Q, Huang L. The PD-1/PD-Ls pathway and autoimmune diseases. *Cell Immunol.* 2014;290(1):72-79.
104. Nielsen C, Ohm-Laursen L, Barington T, Husby S, Lillevang ST. Alternative splice variants of the human PD-1 gene. *Cell Immunol.* 2005;235(2):109-116.
105. Amancha PK, Hong JJ, Rogers K, Ansari AA, Villinger F. In vivo blockade of the programmed cell death-1 pathway using soluble recombinant PD-1-Fc enhances CD4+ and CD8+ T cell responses but has limited clinical benefit. *J Immunol.* 2013;191(12):6060-6070.
106. Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol.* 2020.
107. Ming JE, Stiehm ER, Graham JM, Jr. Syndromic immunodeficiencies: genetic syndromes associated with immune abnormalities. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2003;40(6):587-642.
108. Palomino DC, Marti LC. Chemokines and immunity. *Einstein (Sao Paulo).* 2015;13(3):469-473.

109. Huber AR, Kunkel SL, Todd RF, 3rd, Weiss SJ. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science*. 1991;254(5028):99-102.
110. Akahane M, Watanabe M, Inoue N, et al. Association of the polymorphisms of chemokine genes (IL8, RANTES, MIG, IP10, MCP1 and IL16) with the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases. *Autoimmunity*. 2016;49(5):312-319.
111. Ha H, Debnath B, Neamati N. Role of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in Cancer and Inflammatory Diseases. *Theranostics*. 2017;7(6):1543-1588.
112. Anderson BJ, Calfee CS, Liu KD, et al. Plasma sTNFR1 and IL8 for prognostic enrichment in sepsis trials: a prospective cohort study. *Crit Care*. 2019;23(1):400.
113. Yoshimura T. The production of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)/CCL2 in tumor microenvironments. *Cytokine*. 2017;98:71-78.
114. Chen YF, Zhou D, Metzger T, et al. Spontaneous Development of Autoimmune Uveitis Is CCR2 Dependent. *Am J Pathol*. 2014;184(6):1695-1705.
115. Lima G, Soto-Vega E, Atisha-Fregoso Y, et al. MCP-1, RANTES, and SDF-1 polymorphisms in Mexican patients with systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol*. 2007;68(12):980-985.
116. Komura K, Yoshizaki A, Kodera M, et al. Increased serum soluble OX40 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2008;35(12):2359-2362.
117. Sun Y, Lin X, Chen HM, et al. Administration of agonistic anti-4-1BB monoclonal antibody leads to the amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2002;168(3):1457-1465.
118. Lee SW, Croft M. 4-1BB as a therapeutic target for human disease. *Adv Exp Med Biol*. 2009;647:120-129.
119. Lee EY, Lee ZH, Song YW. CXCL10 and autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2009;8(5):379-383.
120. Aresvik DM, Lima K, Overland T, Mollnes TE, Abrahamsen TG. Increased Levels of Interferon-Inducible Protein 10 (IP-10) in 22q11.2 Deletion Syndrome. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2016;83(3):188-194.

-
121. Aldinucci D, Colombatti A. The Inflammatory Chemokine CCL5 and Cancer Progression. *Mediators Inflamm.* 2014;2014.
 122. Kotani A, Hori T, Matsumura Y, Uchiyama T. Signaling of gp34 (OX40 ligand) induces vascular endothelial cells to produce a CC chemokine RANTES/CCL5. *Immunol Lett.* 2002;84(1):1-7.
 123. Elder RW, George RP, McCabe NM, et al. Immunologic Aging in Adults With Congenital Heart Disease: Does Infant Sternotomy Matter? *Pediatr Cardiol.* 2015;36(7):1411-1416.
 124. Thorsen SU, Pipper CB, Mortensen HB, et al. Levels of soluble TREM-1 in children with newly diagnosed type 1 diabetes and their siblings without type 1 diabetes: a Danish case-control study. *Pediatr Diabetes.* 2017;18(8):749-754.
 125. Ford JW, McVicar DW. TREM and TREM-like receptors in inflammation and disease. *Curr Opin Immunol.* 2009;21(1):38-46.
 126. Pelham CJ, Agrawal DK. Emerging roles for triggering receptor expressed on myeloid cells receptor family signaling in inflammatory diseases. *Expert Rev Clin Immunol.* 2014;10(2):243-256.

13

APÊNDICES

13 APÊNDICES

Apêndice A. Artigo submetido para publicação

Periódico “*Clinical Immunology*” – Fator de Impacto: 3.548

The screenshot shows the user interface of the journal's submission system. At the top, the journal logo "Clinical Immunology" and the Elsevier logo are visible. The user's name "Diogo Soares" and navigation links "My Journals", "Log Out", and "Help" are in the top right. A navigation bar contains "Home" and "Reports". Below this, the "My Author Tasks" section features a "Start New Submission" button and a link to view submissions with a final decision. The "My Submissions with Journal (1)" section displays a submission card with the following details:

<p>Lymphoproliferative disorder with polyautoimmunity and hypogammaglobulinemia: an unusual presentation of 22q11.2 deletion syndrome</p> <p>Current status: Under Review (27/Jan/2020)</p>	<p>YCLIM_2020_14</p> <p>Article Type: Letter to the Editor</p> <p>Initial submission : 08/Jan/2020</p>
--	--

Apêndice B. Artigos publicados durante o desenvolvimento deste doutorado

Human Genetics
<https://doi.org/10.1007/s00439-018-01967-6>

ORIGINAL INVESTIGATION



Downregulation of genes outside the deleted region in individuals with 22q11.2 deletion syndrome

Anelisa Gollo Dantas¹ · Marcos Leite Santoro² · Natalia Nunes¹ · Claudia Berlim de Mello³ · Larissa Salustiano Evangelista Pimenta⁴ · Vera Ayres Meloni¹ · Diogo Cordeiro Queiroz Soares⁴ · Sintia Nogueira Belangero^{1,2} · Gianna Carvalheira¹ · Chong Ae Kim⁴ · Maria Isabel Melaragno¹

Received: 14 August 2018 / Accepted: 22 December 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

The 22q11.2 deletion syndrome (22q11.2DS) is caused by recurrent hemizygous deletions of chromosome 22q11.2. The phenotype of the syndrome is complex and varies widely among individuals. Little is known about the role of the different genes located in 22q11.2, and we hypothesized that genetic risk factors lying elsewhere in the genome might contribute to the phenotype. Here, we present the whole-genome gene expression data of 11 patients with approximately 3 Mb deletions. Apart from the hemizygous genes mapped to the 22q11.2 region, the *TUBA8* and *GNAZ* genes, neighboring the deleted interval but in normal copy number, showed altered expression. When genes mapped to other chromosomes were considered in the gene expression analysis, a genome-wide dysregulation was observed, with increased or decreased expression levels. The enriched pathways of these genes were related to immune response, a deficiency that is frequently observed in 22q11.2DS patients. We also used the hypothesis-free weighted gene co-expression network analysis (WGCNA), which revealed the co-expression gene network modules with clear connection to mechanisms associated with 22q11.2DS such as immune response and schizophrenia. These findings, combined with the traditional gene expression profile, can be used for the identification of potential pathways and genes not previously considered to be related to the 22q11.2 deletion syndrome.

Introduction

The 22q11.2 deletion syndrome (22q11.2DS) results from hemizygous deletions of chromosome 22q11.2, usually flanked by low copy repeats (LCR), which represent a substrate for aberrant recombination. The LCR sequences that flank the 22q11.2 deletion region define the common

breakpoints, the most frequent ones being the 3 and 1.5 Mb deletions, which affect about 85% and 10–12% of patients, respectively (Edelmann et al. 1999; Shaikh et al. 2000). The prevalence of the syndrome was estimated from 1:3000 individuals (Kobrynski and Sullivan 2007) up to 1:1000 fetuses (Gross et al. 2016), being considered the most common microdeletion syndrome (Burn and Goodship 1996; Mlynarski et al. 2016). 22q11.2DS is a multi-system syndrome with a remarkable variability in severity among individuals (Bassett et al. 2005). About 180 clinical manifestations have been described, including characteristic facial features, congenital cardiac malformations, immune deficiency, hypocalcemia, velopharyngeal insufficiency, developmental delay, cognitive impairment, and psychiatric disorders (Robin and Shprintzen 2005).

It has been hypothesized that one or more genes located in the deleted interval are responsible for the etiology of the syndrome. *TBX1* (T-box transcription factor) and *CRKL* (CRK like proto-oncogene, adaptor protein), for instance, were described as being involved in the development of heart and craniofacial structures (Guris et al. 2001; Jerome and Papaioannou 2001; Merscher et al. 2001; Vitelli et al. 2002),

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00439-018-01967-6>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Maria Isabel Melaragno
melaragno.maria@unifesp.br

- ¹ Genetics Division, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil
- ² Interdisciplinary Laboratory of Clinical Neurosciences (LiNC), Psychiatry Department, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil
- ³ Psychobiology Department, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil
- ⁴ Genetics Department, Instituto da Criança, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Published online: 09 January 2019

Springer

Intellectual performance profile of a sample of children and adolescents from Brazil with 22q11.2 Deletion Syndrome (22q11.2DS) based on the Wechsler Scale

Perfil de desempenho intelectual de uma amostra brasileira de crianças e adolescentes com Síndrome da Deleção 22q11.2 (22q11.2DS) com base na Escala Wechsler

Larissa Salustiano Evangelista **PIMENTA**¹  0000-0001-5235-7851
Cláudia Berlim de **MELLO**²  0000-0003-3953-3966
Diogo Cordeiro de Queiroz SOARES¹  0000-0002-6589-2367
Anelisa Gollo **DANTAS**³  0000-0003-0594-6762
Maria Isabel **MELARAGNO**³  0000-0002-4344-9698
Leslie Domenici **KULIKOWSKI**⁴  0000-0003-2236-3956
Chong Ae **KIM**¹  0000-0002-1754-1300

Abstract

The 22q11.2 Deletion Syndrome (22q11.2DS), the most common human chromosome microdeletion syndrome, is associated with a very heterogeneous neurocognitive phenotype. One of the main characteristics of the syndrome spectrum is the intellectual variability, which encompasses average performance and intellectual disability and discrepancies between Verbal Intelligence Quotient and Performance Verbal Intelligence Quotient, with greater impairment in nonverbal tasks.

▼ ▼ ▼ ▼ ▼

¹ Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Departamento de Pediatria. São Paulo, SP, Brasil.

² Universidade Federal de São Paulo, Faculdade Paulista de Medicina, Departamento de Psicobiologia. R. Botucatu, 862, 1º. Andar, Vila Clementino, 04023-062, São Paulo, SP, Brasil. *Correspondência para/Correspondence to* C.B. MELLO. E-mail: <cberlimmello@gmail.com>.

³ Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Morfologia e Genética, Divisão de Genética. São Paulo, SP, Brasil.

⁴ Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia. São Paulo, SP, Brasil.

Support: This study was financed in part by the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (Process nº 475154/2012-6) and *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*.

Article based on the dissertation of L.S.E. PIMENTA, entitled “*Avaliação neurocognitiva e comportamental da Síndrome da Deleção 22q11.2*”. Universidade de São Paulo, 2018.

▼ ▼ ▼ ▼ ▼

Como citar este artigo/How to cite this article

Pimenta, L. S. E., Mello, C. B., Soares, D. C. Q., Dantas, A. G., Melaragno, M. I., Kulikowski, L. D., & Kim, C. A. (2019). Intellectual performance profile of a sample of children and adolescents from Brazil with 22q11.2 Deletion Syndrome (22q11.2DS) based on the Wechsler Scale. *Estudos de Psicologia* (Campinas), 36, e180101. <http://dx.doi.org/10.1590/1982-0275201936e180101>



The present study aimed at investigating the intellectual performance aspects of a 21 children and adolescents sample from Brazil who had been diagnosed with 22q11.2DS, based on the Wechsler Intelligence Scale for Children - 4th edition. The samples were reviewed considering the differences between indices. The results revealed an Full Scale Intelligence Quotient predominant in the borderline range (42 to 104) and a significant discrepancy between the indices of Verbal Comprehension and Perceptual Reasoning in 42% of the sample. With regard to the performance in the subtests alone, a better performance was found in Similarities, whereas block design, matrix reasoning, digit span and letter-number sequencing subtests were the most challenging. These findings indicate that a comprehensive assessment of intellectual performance aspects covering the different measures of the Wechsler Intelligence Scale may contribute to a broader understanding of the neurocognitive phenotype associated with 22q11.2DS.

Keywords: DiGeorge syndrome; Genetics, behavioral; Neuropsychology; Wechsler Scales.

Resumo

A Síndrome da Deleção 22q11.2 (SD22q11.2), microdeleção cromossômica mais frequente em humanos, é associada a um fenótipo neurocognitivo muito heterogêneo. Uma das principais características do espectro da síndrome é a variabilidade intelectual, que abrange de desempenho médio a deficiência intelectual, bem como discrepâncias entre Quociente de Inteligência Verbal e de Quociente de Inteligência de Execução, com maior prejuízo nas tarefas não verbais. O presente estudo teve por objetivo investigar aspectos do desempenho intelectual de uma amostra brasileira de 21 crianças e adolescentes diagnosticados com SD22q11.2, com base nos indicadores da Wechsler Intelligence Scale for Children – 4th edition. As amostras foram analisadas considerando diferenças entre os índices. Os resultados revelaram predomínio de Quociente de Inteligência Total na faixa limítrofe, entre 42 e 104, assim como discrepância significativa entre os índices de compreensão verbal e organização perceptual em 42% da amostra. No que concerne ao desempenho nos subtestes de forma isolada, um melhor resultado foi verificado em semelhanças, ao passo que cubos, raciocínio matricial, dígitos e sequência de números e letras foram os mais desafiadores. Esses achados indicam que uma avaliação abrangente de aspectos do desempenho intelectual contemplando as diversas medidas da Escala Wechsler de Inteligência pode contribuir para uma compreensão mais ampla do fenótipo neurocognitivo associado à SD22q11.2.

Palavras-chave: Síndrome de DiGeorge; Genética comportamental; Neuropsicologia; Escalas de Wechsler.

The 22q11.2 Deletion Syndrome (22q11.2DS), also known as DiGeorge syndrome or Velo-cardio-facial syndrome, is associated with the deletion of region 11.2 of the long arm of chromosome 22 and involves a spectrum of over 180 clinical, physical and behavioral manifestations (Shprintzen, 2008). It is described as the most common microdeletion syndrome found in the population, with an incidence of approximately 1:2.000 to 1:4.000 live births (McDonald-McGinn et al., 2015; Zhao et al., 2018).

The 22q11.2DS is characterized in particular by the presence of psychiatric disorders. Affected individuals exhibit higher rates of psychiatric comorbidities compared to the general population (Radoeva, 2017; Schneider et al., 2014a). About one third of the adult population with 22q11.2DS develops some kind of psychiatric disorder (Gothelf et al., 2013). Schizophrenia incidence is of particular interest as it is described in over 20% of cases (Tang et al., 2014a). Anxiety disorder, depression and bipolar mood disorder have also been reported (Fabbro, Rizzi, Schneider, Debbane, & Eliez, 2012; Tang et al., 2014a; Tang et al., 2014b; Zarchi et al., 2014). In studies with children, internalizing kind of behaviors such as anxiety symptoms as well as difficulties in social interaction with peers, affective and attention problems have been described (Antshel et al., 2006; Schonherz et al., 2014). There are also reports of high rates of Attention Deficit Hyperactivity Disorder (Hidding et al., 2015) and Autism Spectrum Disorder (Antshel et al., 2007; Bink et al., 2014; McCabe et al., 2013; Schneider et al., 2014b).

As to the neurocognitive phenotype, studies have indicated that intellectual performance varies, in general, between the borderline range and the lower average functioning, that is, Intelligence Quotients (IQ) range between 70 and 85 in the Wechsler Scales (Jacobson et al., 2010). Mild to moderate intellectual disability (IQ 55 to 70) occurs in more than 40% of the cases (De Smedt et al., 2007; Niklasson, Rasmussen, Óskarsdóttir, & Gillberg, 2009). Approximately 75% of patients have a significant discrepancy of approximately

Apêndice C. Capítulos de livros publicados durante o desenvolvimento deste doutorado

1. **SOARES, DCQ**; CARNEIRO-SAMPAIO, MMS. Síndromes com imunodeficiência. *Genética na Prática Pediátrica*. 2ed.Barueri: Editora Manole, 2019, v. 1, p. 494-510.
2. KAWAHIRA, RSH; KIM, CA; ALBANO, LMJ; BERTOLA, DR; **SOARES, DCQ**. Cardiopatias sindrômicas. In: Chong Ae Kim; Lilian M. J. Albano; Débora R. Bertola. (Org.). *Genética na Prática Pediátrica*. 2ed.Barueri: Editora Manole, 2019, v. 1, p. 179-197.
3. **SOARES, DCQ**; SANTOS, CJN; SANTOS, AR. Quando e como utilizar testes genéticos na pesquisa de imunodeficiências primárias. In: Antonio Carlos Pastorino; Ana Paula Beltran Moschione Castro; Magda Carneiro-Sampaio. (Org.). *Alergia e Imunologia para o Pediatra*. 3ed.Barueri: Manole, 2017, v. 1, p. 437-449.
4. CARNEIRO-SAMPAIO, MMS; **SOARES, DCQ**; PASTORINO, AC; GRASSI, MS. Síndrome de Down, de DiGeorge e outras bem definidas associadas com imunodeficiência. In: Antonio Carlos Pastorino; Ana Paula Beltran Moschione Castro; Magda Carneiro-Sampaio. (Org.). *Alergia e Imunologia para o Pediatra*. 3ed.Barueri: Manole, 2017, v. 1, p. 162-185.

Apêndice D. Resumos de trabalhos apresentados em congressos durante o desenvolvimento deste doutorado

1. Nunes, N; Dantas, AG; Souza, MZ; **Soares, DCQ**; Meloni, VA; Kim, CA; Gil-Da-Silva-Lopes, VL; Melaragno, MI. Candidate genes-panel for investigation of pathogenic allelic variants in patients with the 22q11.2 deletion syndrome. In: 12th European Cytogenomics Conference, 2019, Salzburgo. Molecular Cytogenetics, 2019. v. 12. p. 29.
2. Dantas, AG; Santoro, ML; Nunes, N; Souza, MZ; **Soares, DCQ**; Belangero, SI; Kim, CA; Melaragno, MI. Upregulation of mir 155 in a 22q11.2 deletion syndrome cohort. In: 12th European Cytogenomics Conference 2019, 2019, Salzburgo. Molecular Cytogenetics, 2019. v. 12. p. 67.
3. Zamariolli, M; Dantas, AG; Nunes, N; Moysés-Oliveira, M; Spíndola, L; Gil-Da-Silva-Lopes, VL; **Soares, DCQ**; Kim, CA; Melaragno, MI. CNVs as genetic modifiers for congenital heart disease in a Brazilian 22q11.2 deletion syndrome cohort. Abstracts from the American Society of Human Genetics (ASHG) Annual Meeting 2019.
4. **Soares, DCQ**; Matta, D; Dantas, AG; Pastorino, A; Kulikowski, LD; Montenegro, MM; Nunes, N; Melaragno, MI; Kim, CA; Torres, LC; Carneiro-Sampaio, M. Natural killer cell abnormalities in patients with 22q11.2 deletion syndrome. In: 18th Biennial Meeting of The European Society for Immunodeficiencies, 2018, Lisboa. Anais 18th Biennial Meeting of The European Society for Immunodeficiencies.

5. **Soares, DCQ**; Dantas, AG; Kulikowski, LD; Honjo, RS; Bertola, DR; Melaragno, MI; Carneiro-Sampaio, MMS; Kim, CA. Características clínicas e moleculares de 55 pacientes com a síndrome de deleção 22q11.2. In: XXX Congresso Brasileiro de Genética Médica, 2018, Rio de Janeiro. Anais do XXX Congresso Brasileiro de Genética Médica, 2018.
6. Montenegro, MM; Zanardo, EA; Damasceno, J; **Soares, DCQ**; Novo-Filho, GM; Nascimento, A; Liro, L; Gasparini, Y; Dias, AT; Chehimi, SN; Madia, FAR; Akl, OS; Kim, CA. Brazilian experience of 22q11.2 deletion syndrome: clinical variability and immunodeficiency. Abstracts from the American Society of Human Genetics (ASHG) Annual Meeting 2018.
7. Dantas, AG; Nunes, N; Santos, LC; Kim, CA; **Soares, DCQ**; Meloni, VA; Belangero, SI; Carvalheira, GG; Melaragno, MI. Identification of genetic modifiers by next-generation sequencing (NGS) of candidate genes in a 22q11.2 deletion syndrome patient. Abstracts from the American Society of Human Genetics (ASHG) Annual Meeting 2018.
8. Dantas, AG; Nunes, N; Kim, CA; **Soares, DCQ**; Meloni, VA; Belangero, SI; Carvalheira, GG; Melaragno, MI. Next-generation sequencing (NGS) of nine candidate genes with custom AmpliSeq in 22q11.2 deletion syndrome patients. Abstracts from the 51th European Society of Human Genetics Conference: Posters, 2018.

9. **Soares, DCQ**; Nuñez, EC; Santos, CJ; Pastorino, AC; Dantas, AG; Torres, LC; Zanardo, EA; Kulikowski, LD; Melaragno, MI; Carneiro-Sampaio, MMS; Kim, CA. Lymphoproliferative Disorder with Hypogammaglobulinemia: an Unusual Presentation of 22q11.2 Deletion Syndrome. In: LASID Meeting, 2017, São Paulo. J Clin Immunol, 2017. v. 37. p. S74.
10. Dantas, AG; Santoro, ML; Kim, CA; **Soares, DCQ**; Meloni, VA; Belucco, FT; Nunes da Silva, NR; Belangero, SI; Carvalheira, GG; Melaragno, MI. 22q11.2 deletion influences expression levels of hemizygous and normal copy number genes: possible disruption of cis and trans regulation. Abstracts from the 50th European Society of Human Genetics Conference: Posters, 2017. v. 1. p. 1-707.
11. Dantas, AG; Santoro, ML; Kim, CA; **Soares, DCQ**; Meloni, VA; Nunes da Silva, NR; Belangero, SI; Carvalheira, GG; Melaragno, MI. Weighted gene co-expression network analysis using peripheral blood of patients with 22q11.2 deletion syndrome. Abstracts from the American Society of Human Genetics (ASHG) Annual Meeting 2017.
12. Milani, C; Madia, FAR; Costa, TV; Zanardo, EA; Dias, AT; Montenegro, MM; Novo-Filho, GM; Piazzon, FB; Nascimento, A.; **Soares, DC**; Grassi, MS; Bertola, DR; Melaragno, MI; Kim, CA; Carneiro-Sampaio, MMS; Kulikowski, LD. Cytogenomic delineation of Brazilian patients with 22q11.2 deletion syndrome associated autoimmune heterogeneous phenotype. In: The European Human Genetics Conference, 2016, Barcelona. European Journal of Human Genetics, 2016. v. 24. p. 223-223.

Apêndice G. Recomendações para o acompanhamento de pacientes com a SD22q11.2 (adaptado de Bassett *et al.*, 2011²⁶)

Avaliações	Ao diagnóstico	Infância (0-12 meses)	Pré-Escolar (1-5 anos)	Escolar (6-11 anos)	Adolescência (12-18 anos)	Adultos (> 18 anos)
Cálcio iônico, paratormônio (PTH) ¹	•	•	•	•	•	•
Tireotrofina (TSH) ¹	•		•	•	•	•
Hemograma completo (anual)	•	•	•	•	•	•
Avaliação imunológica ²	•	• ³	• ³			
Avaliação oftalmológica	•		•			
Avaliação do palato ⁴	•	•	•			
Avaliação audiológica	•	•	•			•
Radiografia de coluna cervical (>4 anos)			• ⁵			
Avaliação de escoliose	•		•		•	
Avaliação odontológica			•	•	•	•
Ultrassonografia renal	•					
Eletrocardiograma	•					•
Ecocardiograma	•					
Avaliação do desenvolvimento ⁶	•	•	•			
Avaliação do desempenho escolar				•	•	
Socialização	•	•	•	•	•	•
Avaliação psiquiátrica / emocional / comportamental ⁷	•		•	•	•	•
Reavaliação clínica	•	•	•	•	•	•
Estudo de deleção dos pais	•					
Aconselhamento genético	•				•	•
Ginecologia e contracepção					•	•

Cada • refere-se a uma única avaliação

¹ Na primeira infância os níveis de cálcio devem ser testados a cada 3 a 6 meses, em seguida a cada 5 anos na infância, e, a partir de então, cada 1 ou 2 anos, além de verificação no pré-operatório e pós-operatório e regularmente na gravidez. Exames de tireoide anualmente.

² Citometria de fluxo para completar a contagem de células do sangue com diferencial, em recém-nascidos; e citometria de fluxo, imunoglobulinas, a função das células T de 9 a 12 meses (antes de vacinas com vírus vivas) há divergências sobre a necessidade de expansão da avaliação imunológica na ausência de características clínicas.

³ Avaliar a função imune antes da administração de vacinas vivas.

⁴ Na infância, visualizar palato e avaliar os problemas de alimentação, regurgitação nasal, ou ambos; em crianças e adultos, avaliar a qualidade de voz nasal.

⁵ Radiografias da coluna cervical para detectar anomalias: antero-posterior, lateral, em extensão, com boca aberta e vistas base do crânio. Há divergências sobre a necessidade de radiografias de rotina. Sintomas de compressão medular devem ser avaliados por neurologista com urgência.

⁶ Atraso de desenvolvimento motor e de fala / linguagem são comuns; o rápido encaminhamento para intervenção precoce por quaisquer atrasos pode ajudar a otimizar os resultados.

⁷ Atenção para mudanças de comportamento, estado emocional e do pensamento, incluindo alucinações e delírios em adolescentes e adultos.