

Departamento de Patologia

Christiana de Freitas Vinhas Carvalho

**Caracterização topográfica e imunofenotípica das
subpopulações tímicas: um estudo comparativo entre
portadores e não portadores de síndrome de Down**

Orientadora: Profa. Dra. Maria Claudia
Nogueira Zerbini

**Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 de Outubro de 2011
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP.**

**São Paulo
2022**

Christiana de Freitas Vinhas Carvalho

**Caracterização topográfica e imunofenotípica das
subpopulações tímicas: um estudo comparativo entre
portadores e não portadores de síndrome de Down**

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

Programa de Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Claudia
Nogueira Zerbini

Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 de Outubro de 2011

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP.

**São Paulo
2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Carvalho, Christiana de Freitas Vinhas
Caracterização topográfica e imunofenotípica das
subpopulações tímicas : um estudo comparativo entre
portadores e não portadores de síndrome de Down /
Christiana de Freitas Vinhas Carvalho. -- São
Paulo, 2022.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.
Orientadora: Maria Claudia Nogueira Zerbini.

Descritores: 1.Timo 2.Síndrome de Down 3.Imuno-
histoquímica 4.Minipuberdade 5.Sexo

USP/FM/DBD-472/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente à Dra. Maria Cláudia Nogueira Zerbini, pelo exemplo profissional e pessoal, pelo compromisso, competência, ensinamentos, entusiasmo, apoio, empatia e acolhimento durante os anos de residência médica e, principalmente, durante o processo de desenvolvimento deste trabalho. A você, meu respeito, carinho e gratidão inestimáveis.

À Dra. Magda Carneiro-Sampaio, pelo apoio incondicional na execução do trabalho, desde a idealização do projeto, discussão de resultados, críticas e sugestões. Meu respeito e admiração ao seu entusiasmo, dedicação e competência profissional.

Ao Dr. Carlos Alberto Moreira-Filho, pela importante colaboração na execução e discussão dos dados deste trabalho, e por ser um grande entusiasta da ciência.

Aos pesquisadores do Laboratório de Genômica Pediátrica da Faculdade de Medicina da USP, Silvia Yumi Bando e Fernanda Bernardi Bertonha, pelas análises dos dados, discussão dos resultados e sugestões importantes neste trabalho. E a Leandro Rodrigues Ferreira pela coleta, macroscopia e representação das amostras.

Aos pesquisadores do Laboratório de Investigação Médica 14 (LIM-14) da Faculdade de Medicina da USP, em especial Alda Wakamatsu e Aline Assato, pelo apoio técnico na confecção dos TMAs.

Às profissionais do Laboratório de imunoistoquímica do Departamento de Patologia da FMUSP, Angela Batista Gomes dos Santos, Sandra de Moraes Fernezzian e Esmeralda Miristene Eher, pelo apoio técnico nas padronizações e reações imunoistoquímicas, além da paciência, disponibilidade e ajuda ao longo deste processo.

Ao biomédico e amigo Wellington Luiz Ferreira da Silva, pelos ensinamentos e suporte com as análises das imagens (morfometria e imunoistoquímica).

Agradeço aos colegas e amigos da residência em Anatomia Patológica da FMUSP, especialmente Paula Vianna, João Veloso e Andressa Costa, pelo apoio e amizade que ultrapassaram este período e se fazem presentes até hoje.

Aos colegas e amigos do Imagepat – patologistas e área técnica – pelo apoio e paciência, principalmente nestes últimos meses. Especialmente, Juliana

Freitas, pelo apoio diário, profissional e pessoal. E aos queridos Samuel Nobre e Rafael Barreto, pelo suporte com os recursos tecnológicos nesta reta final.

Às minhas amigas-irmãs, Juliana Diament, Marília Santiago, Carla Gordilho, Roberta Balthazar e Roberta Barreto, por serem força, apoio e colo sempre.

Agradeço imensamente à minha família nuclear, pelo amor e apoio incondicionais, estímulo constante e por serem meus alicerces na vida: meu pai (Antonio Carlos), minha mãe (Vera Sílvia), e meus irmãos Thiago Vinhas, Paulo Vinhas e Thaís Vinhas.

E por fim, agradeço a meu esposo, Marcel Carvalho, pelo amor, apoio, força, parceria e acolhimento diários ao longo destes quase 18 anos juntos. Além da paciência e resiliência ao longo dos anos em que desenvolvi este trabalho. E, também, agradeço à pessoa mais importante para nós: nossa filha Letícia, minha razão de ser e buscar meu melhor diariamente.

***“A busca de novos sonhos acontece porque acreditamos que os desafios
são oportunidades de crescimento que a vida oferece”
(autor desconhecido)***

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 abreviaturas e siglas

Resumo

Abstract

1.	INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1.	O timo humano	2
1.2.	Embriogênese do timo	3
1.3.	Histologia e diferenciação das células T no timo	3
1.4.	O processo de involução tímica	8
1.5.	Dimorfismo sexual e minipuberdade	9
1.6.	O timo e a síndrome de Down	12
2.	JUSTIFICATIVA	15
3.	OBJETIVOS	17
3.1.	Geral	18
3.2.	Específicos	18
4.	METODOLOGIA	19
4.1.	Obtenção das amostras e procedimento cirúrgico	20
4.2.	Amostras de tecido	20
4.3.	Confecção das micromatrizes teciduais (TMA) para a análise imunoistoquímica	21
4.3.1.	Análise morfológica	25
4.3.2.	Caracterização das subpopulações através da técnica de imunoistoquímica	26
4.4.	Análise das imagens	27
4.5.	Técnica imunoistoquímica	27
4.6.	Análise estatística	28
5.	RESULTADOS	29
5.1.	Estudo morfométrico	30
5.1.1.	Caracterização demográfica das amostras por sexo e idade	30
5.1.2.	Distribuição etária das amostras	32

5.1.3.	Resultados da análise morfométrica.....	33
5.1.4.	Avaliação comparativa entre os grupos DS e NDS	33
5.1.5.	Avaliação entre os subgrupos DS e NDS por idade (MPxPMP).....	34
5.1.6.	Avaliação entre os subgrupos DS e NDS por sexo (MxF)	35
5.2.	Estudo das subpopulações celulares pela técnica de imunoistoquímica das amostras dispostas no TMA	37
5.2.1.	Caracterização demográfica das amostras por sexo e idade	37
5.2.2.	Representação da distribuição dos casos dos grupos DS e NDS nos blocos de TMA.....	39
5.2.3.	Análise das subpopulações através das reações imunoistoquímicas .	40
5.2.4.	Avaliação da subpopulação de células B	42
5.2.5.	Avaliação da população de células T	46
5.2.6.	Avaliação da população de células NK.....	53
5.2.7.	Avaliação das células que compõem o microambiente tímico.....	56
5.2.7.1.	Células epiteliais.....	56
5.2.7.2.	Macrófagos	57
5.2.7.3	Células dendríticas	60
6.	DISCUSSÃO	65
6.1.	Morfometria	66
6.2.	As subpopulações tímicas avaliadas por imunoistoquímica	69
7.	CONCLUSÕES	77
8.	REFERÊNCIAS	80

APÊNDICES

Lista de Figuras

Figura 1 - Principais estágios no desenvolvimento das células T no timo.....	5
Figura 2 - Modelo esquemático de montagem dos blocos de TMA.....	22
Figura 3 - Representação das amostras tímicas nos 3 blocos de TMA do grupo NDS.....	23
Figura 4 - Representação das amostras tímicas nos 3 blocos de TMA do grupo DS	24
Figura 5 - Processo de seleção e determinação do número de amostras para análise morfométrica	25
Figura 6 - Distribuição de todas as amostras, por idade (mês a mês).....	32
Figura 7 - Representação dos compartimentos fotografados e avaliados morfológicamente do grupo DS e do grupo NDS	33
Figura 8 - Análise morfométrica comparativa entre os grupos DS e NDS.....	34
Figura 9 - Análise morfométrica comparativa entre os grupos DS e NDS nos grupos de idade correspondente a minipuberdade, e pós-minipuberdade.....	35
Figura 10 - Análise morfométrica comparativa entre os grupos DS e NDS em relação aos subgrupos por sexo	36
Figura 11 - Representação de lâminas de TMA coradas com H&E	39
Figura 12 - Representação histológica de três amostras do grupo DS (H&E) .	40
Figura 13 - Representação de reações imunoistoquímicas realizadas nos blocos de TMA do grupo NDS	41
Figura 14 - Representação de reações imunoistoquímicas realizadas nos blocos de TMA do grupo DS.....	41
Figura 15 - Análise comparativa da expressão de CD20 entre os grupos DS e NDS.....	43
Figura 16 - Análise comparativa da expressão de PAX5 entre os grupos DS e NDS.....	44
Figura 17 - Análise comparativa da expressão de CD23 entre os grupos DS e NDS.....	45

Figura 18 - Análise comparativa da expressão de CD5 entre os grupos DS e NDS.....	46
Figura 19 - Análise comparativa da expressão de CD2 entre os grupos DS e NDS.....	48
Figura 20 - Análise comparativa da expressão de CD4 entre os grupos DS e NDS.....	49
Figura 21 - Análise comparativa da expressão de CD8 entre os grupos DS e NDS.....	50
Figura 22 - Análise comparativa da expressão de FoxP3 entre os grupos DS e NDS.....	52
Figura 23 - Análise comparativa da expressão de CD1a entre os grupos DS e NDS.....	53
Figura 24 - Análise comparativa da expressão de CD56 entre os grupos DS e NDS.....	54
Figura 25 - Análise comparativa da expressão de CD4 entre os grupos DS e NDS.....	57
Figura 26 - Análise comparativa da expressão AE1/AE3 entre os grupos DS e NDS.....	58
Figura 27 - Análise comparativa da expressão de CD163 entre os grupos DS e NDS.....	60
Figura 28 - Análise comparativa da expressão de S100 entre os grupos DS e NDS.....	62

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Relação de anticorpos utilizados, com os respectivos fabricantes, clones e diluições utilizadas	27
Tabela 2 - Relação de casos NDS selecionados	30
Tabela 3 - Relação de casos DS selecionados	31
Tabela 4 - Caracterização demográfica das amostras por sexo e idade dos casos de pacientes NDS	38
Tabela 5 - Caracterização demográfica das amostras por sexo e idade dos casos de pacientes DS.....	39
Tabela 6 - Resumo dos resultados da distribuição das linhagens celulares em córtex e medula, nos grupos DS e NDS.....	63
Tabela 7 - Resumo dos resultados das análises das linhagens celulares comparando os grupos DS e NDS segundo a faixa etária, em córtex e medula.....	63
Tabela 8 - Resumo dos resultados das análises das linhagens celulares comparando os grupos DS e NDS segundo o sexo, em córtex e medula	64
Tabela 9 - Trabalhos previamente publicados que utilizam amostras de timo humano para análise morfométrica e imunoistoquímica em pacientes com síndrome de Down	67

Lista de Abreviaturas e Siglas

AIRE	do inglês <i>autoimmune regulator</i> – gene regulador da autoimunidade
C	topografia de córtex
cTEC	do inglês <i>cortical thymic epithelial cells</i> – células epiteliais tímicas corticais
DS	do inglês <i>Down syndrome</i> – síndrome de Down
FSH	do inglês <i>follicle-stimulating hormone</i> – folículo hormônio estimulante
GnRH	do inglês <i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i>
Ig	imunoglobulina
M	topografia de medula
MP	minipuberdade
MHC:	do inglês <i>major histocompatibility complex</i> – complexo de histocompatibilidade principal
mTEC	do inglês <i>medullary thymic epithelial cells</i> – célula epiteliais tímicas medulares
NDS	do inglês <i>non Down syndrome</i> – sem síndrome de Down
PV	espaço perivascular
PMP	pós-minipuberdade
sjTREC	do inglês <i>signal joint TCR excision circles</i>
T _{REG}	células T regulatórias
TREC	do inglês <i>TCR excision circles</i>
TCR	do inglês <i>T-cell receptor</i> – receptor de célula T
Th1	do inglês <i>T helper 1</i>
Th2	do inglês <i>T helper 2</i>
TMA	do inglês <i>tissue microarray</i> – micromatrizes teciduais

RESUMO

Carvalho CFV. *Caracterização topográfica e imunofenotípica das subpopulações tímicas*: um estudo comparativo entre portadores e não portadores de síndrome de Down [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

INTRODUÇÃO: O timo humano é um órgão complexo e dinâmico, que sofre alterações por estímulos exógenos negativos e involui com a idade. É o sítio de maturação e seleção dos linfócitos T, determinando função crítica no desenvolvimento do sistema imune dependente de linfócitos T. Benda e Strassmann (1965) foram os primeiros a descrever anormalidades no timo de pacientes com síndrome de Down (DS). Essa população apresenta aumento na frequência de neoplasias hematológicas, doenças autoimunes órgão-específicas e quadros infecciosos. Em função das peculiaridades genéticas e hormonais que ocorrem no período da minipuberdade (correspondentes aos 6 primeiros meses de vida) nosso grupo, utilizando técnicas sofisticadas de redes integradas de expressão gênica, confirmaram a participação do timo nesse processo do “dimorfismo sexual” nessa faixa de idade. A disponibilidade desse valioso material e um grupo de pesquisadores dedicados ao estudo do timo em nossa instituição, nos estimulou a uma revisão mais global das subpopulações tímicas, estabelecendo-se um possível substrato para futuras análises moleculares, e interpretação das peculiaridades do sistema imune nos portadores de síndrome de Down. **OBJETIVO:** Este trabalho teve como objetivo principal a caracterização morfológica e imunofenotípica das diversas regiões do timo e suas subpopulações identificadas através da técnica imunoistoquímica, comparando espécimes de pacientes portadores de Síndrome de Down e não portadores de cromossomopatias (NDS). **CASUÍSTICA E MÉTODOS:** Para isso, foram obtidos produtos de timectomia total, durante cirurgias cardíacas realizadas em recém-nascidos e crianças até 5 anos de idade, para correção de diferentes malformações congênitas. As análises foram complementadas com a estratificação por sexo e por faixas etárias, correspondentes a minipuberdade (<7m, MP) e pós-minipuberdade (≥7m, MP). Os critérios morfométricos avaliados foram: espessura média do córtex; diâmetro médio da região medular; área total do lóbulo; área das regiões medulares; e proporção entre a área medular / área total do lóbulo. Para a avaliação imunofenotípica das subpopulações de células tímicas em regiões de córtex e medula, foram utilizados 14 anticorpos (células B: CD20, CD23, PAX-5; células T: CD2, CD5, CD4, CD8, CD56, FoxP3, CD1a; estroma: AE1/AE3, S100, CD68, CD163), sendo as amostras dispostas em uma micromatriz tecidual (TMA). Nessas amostras, no TMA foi realizada avaliação quantitativa das subpopulações tímicas em córtex e medula, através da análise computadorizada de imagens digitalizadas. Para a comparação entre os grupos

foi utilizada a técnica de Mann-Whitney sendo os resultados expressos em gráficos de ponto. **RESULTADOS / DISCUSSÃO:** Os portadores de DS apresentam áreas medulares maiores e espessura do córtex menor do que as mesmas regiões do timo dos não portadores desta síndrome, a despeito das áreas totais dos lóbulos não terem diferença estatística. Esses achados se tornam particularmente evidentes na fase inicial da MP e no sexo feminino. Em relação às linhagens celulares, o grupo DS apresenta **distribuição topográfica** semelhante nas regiões do córtex e medula, quando comparados aos grupos NDS: células B, células T_{REG}, células NK e células interdigitantes predominam na medula, enquanto linfócitos imaturos CD1a+, macrófagos CD163+, células T citotóxicas e células epiteliais, apresentam maior contingente em córtex. Em relação aos **resultados mais expressivos das análises quantitativas:** o grupo DS apresenta **redução** de linfócitos T-CD5+ no córtex em ambos os sexos, e de macrófagos CD163+ em medula precocemente na fase MP e no sexo M; o grupo DS apresenta **aumento** de linfócitos NK em córtex e medula, mais evidente no período PMP, em ambos os sexos, aumento de células T_{REG} em medula, que se intensifica no PMP, aumento dos macrófagos CD68+ em córtex e medula em ambos os sexos, mais expressivo no período tardio da PMP, e aumento de células interdigitantes em córtex e medula, que se mantêm apenas no sexo feminino. As células epiteliais (cTECs) apresentam aumento menos expressivo em córtex tardiamente (PMP), apenas no sexo feminino. **CONCLUSÕES:** Os dados, em conjunto, podem fornecer substrato para a maior compreensão do sistema imune na DS e reforça a proposição de que esta população apresenta uma imunodeficiência primária, já a partir das primeiras fases do desenvolvimento tímico durante a fase da MP. Nossos achados confirmam também a participação do timo no processo de dimorfismo sexual.

Descritores: Timo; Síndrome de Down; Imuno-histoquímica; Minipuberdade; Sexo.

ABSTRACT

Carvalho CFV. *Topographic and immunophenotypic characterization of thymic subpopulations: a comparative study between people with and without Down syndrome* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2022.

INTRODUCTION: The human thymus is a complex and dynamic organ, which undergoes changes by negative exogenous stimuli and involutes with age. It is the site of maturation and selection of T lymphocytes, determining a critical role in the development of the T lymphocyte-dependent immune system. Benda and Strassmann (1965) were the first to describe abnormalities in the thymus of patients with Down Syndrome (DS). This population presents an increase in the frequency of hematological neoplasms, organ-specific autoimmune diseases, and infectious conditions. Due to the genetic and hormonal peculiarities that occur in the minipuberty period (corresponding to the first 6 of life), our group, using sophisticated techniques of integrated gene expression networks, confirmed the participation of the thymus in this process of "sexual dimorphism" in this age group. The availability of this valuable material and a group of researchers dedicated to the study of the thymus in our institution, stimulated us to a more global review of thymic subpopulations, establishing a possible substrate for future molecular analysis, and interpretation of the peculiarities of the immune system in patients with DS. **OBJECTIVE:** The main objective of this work was the morphological and immunophenotypic characterization of the different regions of the thymus and its subpopulations identified through the immunohistochemical technique, comparing specimens from patients with DS with a group of patients without chromosomal disorders (NDS). **MATERIAL AND METHODS:** For this purpose, total thymectomy products were obtained during cardiac surgeries performed in newborns and children up to 5 years of age, for the correction of variable congenital malformations. The analyzes were complemented with the stratification by sex and age groups, corresponding to minipuberty (<7m, MP) and post-minipuberty (≥7m, PMP). The morphometric criteria evaluated were: average thickness of the cortex, average diameter of the medullary region; total lobe area; area of medullary regions; and ratio of medullary area / total lobe area. For the immunophenotypic evaluation of subpopulations of thymic cells in the regions of cortex and medulla, 14 antibodies were used (B cells: CD20, CD23, PAX-5; T cells: CD2, CD5, CD4, CD8, CD56, FoxP3, CD1a; stroma: AE1/AE3, S100, CD68, CD163), and the samples were arranged in a tissue microarray (TMA). A quantitative evaluation of the thymic subpopulations in each region was carried out, through methods of digitized images analysis. The Mann-Whitney technique was used to compare the groups, and the results were expressed in graphs of points. **RESULTS / DISCUSSION:** Patients with Down syndrome have larger medullary areas and smaller cortex

thickness than the same thymus regions of those without this syndrome, even though the total areas of the lobes do not have a statistical difference. These findings become particularly evident in the initial phase of PM and in females. Regarding cell lines, the DS group has a similar topographic distribution in the regions of the cortex and medulla, when compared to the NDS groups: B cells, Treg cells, NK cells and integrant cells predominate in the medulla, while CD1a+ immature lymphocytes, CD163+ macrophages, cells cytotoxic T cells and epithelial cells, present greater contingent in cortex. Regarding the most expressive results of the quantitative analyses: the DS group shows a reduction in T-CD5+ lymphocytes in the cortex in both sexes, and in CD163+ macrophages in the marrow early in the MP phase and in the males; the DS group shows an increase in NK lymphocytes in the cortex and medulla, more evident in the PMP period, in both sexes, an increase in T_{REG} cells in the medulla, which is intensified in the PMP, an increase in CD68+ macrophages in the cortex and medulla in both sexes, more expressive in the late period of PMP, and an increase in interdigitating cells in cortex and medulla, which is maintained only in females. Epithelial cells (cTECs) show a less expressive increase in late cortex (PMP), only in females. **CONCLUSIONS:** The data presented in this study, can provide a substrate for a better understanding of the immune system in DS and reinforce the proposition that this population has a primary immunodeficiency, from the first stages of thymic development during the MP phase. Our findings also confirm the participation of the thymus in the process of sexual dimorphism.

Descriptors: Thymus; Down syndrome; Immunohistochemistry; Minipuberty; Sex.

1. INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

Embora o timo humano sempre tenha despertado grande interesse nos pesquisadores de diversas áreas das ciências biológicas, a maior parte do conhecimento que se tem sobre este complexo órgão advém de trabalhos experimentais, principalmente em murinos. O presente trabalho apresenta um estudo *in situ* em timos humanos, que pode trazer informações relevantes para dar suporte a outras pesquisas nessa área.

1.1. O timo humano

O timo humano é um órgão linfoide primário, e consiste em uma estrutura bilobada derivada a partir das 3ª e 4ª bolsas faríngeas. Está localizado no mediastino anterior e envolve parcialmente o pericárdio.¹ É considerado um órgão linfoepitelial – formado por células epiteliais organizadas nas áreas cortical e medular, que são permeadas por células linfoides (timócitos), além de outras células importantes para o funcionamento do órgão. É o local de maturação e seleção dos linfócitos T, determinando função crítica no desenvolvimento do sistema imune dependente de linfócitos T.² É um órgão dinâmico, que sofre alterações rapidamente por estímulos exógenos negativos e involui com a idade. A imunosenescência é caracterizada pelo aumento da susceptibilidade a infecções, uma resposta imune inadequada às vacinas e uma maior propensão ao desenvolvimento de doenças autoimunes e neoplasias, observadas com o avançar da idade. Acredita-se que a prevalência destas condições está primariamente relacionada a alterações qualitativas e quantitativas das células T. É descrito que, no idoso, há uma redução na produção de células T *naive* e um aumento proporcional das células T de memória.³ O timo apresenta o seu pico de atividade durante os períodos fetal e pós-natal precoce (até os seis meses de idade). O processo de involução tímica tem início no primeiro ano de vida, e continua em uma proporção de 3% ao ano. Durante este processo, observa-se uma perda da demarcação medular e cortical e uma desorganização da junção cortico-medular.³ Apesar da atrofia, a timopoiese não cessa completamente, e o timo continua provendo certo número de linfócitos T na vida adulta.⁴

1.2. Embriogênese do timo

Durante a quinta semana do desenvolvimento embrionário, a partir do terceiro par de bolsas faríngeas, tem origem o componente epitelial tímico. Após penetrar no mesoderma, é cercado por células mesenquimais derivadas da crista neural. Na oitava semana, o órgão já adquire a forma bilobada. Na décima semana, com a vascularização já formada, ocorre a colonização por células tronco hematopoiéticas oriundas do saco vitelínico e fígado fetal. Na décima segunda semana os lóbulos já estão formados e é possível identificar as regiões cortical e medular. Ao nascimento, o timo pesa cerca de 15-20 gramas.

1.3. Histologia e diferenciação da célula T no timo

O timo é usualmente dividido em dois compartimentos: um linfoide central, composto pelo córtex e medula; e um periférico, que consiste no espaço perivascular.² A região do córtex é ricamente povoada por linfócitos T imaturos (timócitos), além células epiteliais corticais (cTECs), macrófagos e células dendríticas. A região medular apresenta menor densidade linfocitária, composta por linfócitos T maduros e alguns linfócitos B, além de células epiteliais medulares (mTECs), macrófagos, células dendríticas, fibroblastos e estruturas chamadas corpúsculos de Hassall – constituídas por estruturas concêntricas de células epiteliais, que podem sofrer queratinização e calcificação central. A função ou significado destas estruturas não são bem estabelecidos.

As subpopulações podem ser divididas em linfoides B, T e NK e células do microambiente tímico.

O timo apresenta um papel importante, por fornecer um microambiente para proliferação, diferenciação, rearranjo do gene do receptor de células T (TCR) e seleção positiva e negativa de linfócitos T.⁴ A timopoiese é um processo complexo e altamente dinâmico, dependente da interação entre linfócitos imaturos e células do estroma tímico, ilustrado na figura 1. As células tronco hematopoiéticas, oriundas da medula óssea são transportadas para a região cortico-medular pela corrente sanguínea, dirigem-se centrifugamente para a região subcapsular, deslocando-se a seguir centripetamente através do córtex até a região medular como células *naïve* duplo positivas (CD4/CD8+), de onde

deixam o timo pela corrente sanguínea como células T maduras *naive* uni positivas (CD4 ou CD8 positivas). Durante esse percurso, que dura cerca de 3 semanas, tem lugar o processo de maturação dos linfócitos T, o qual ocorre em etapas sequenciais que envolvem: a recombinação somática e expressão do TCR, proliferação celular e expressão dos co-receptores CD4 e CD8, e seleção positiva e negativa induzida por apresentação de peptídeos de antígenos próprios ligados a moléculas do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) por células do estroma tímico, particularmente às cTECs (seleção positiva) e células dendríticas da junção cortico-medular (seleção negativa). A natureza dos sinais intracelulares e a identificação das células não linfoides envolvidas nos diferentes estágios da seleção, são áreas de intensa atividade de pesquisa. Postula-se que as mTECs expressariam determinadas moléculas normalmente sintetizadas fora do timo, incluindo a insulina, tireoglobulina e a proteína básica da mielina. Estudos sugerem que o produto do gene AIRE (gene regulador da autoimunidade), constitutivamente expresso por essas células, codifica uma proteína que controla, pelo menos parcialmente, a expressão de moléculas próprias nas células epiteliais da medula. Na ausência do produto do gene AIRE, a deleção dos linfócitos autorreativos não ocorre e as repostas autoimunes se desenvolvem.⁵

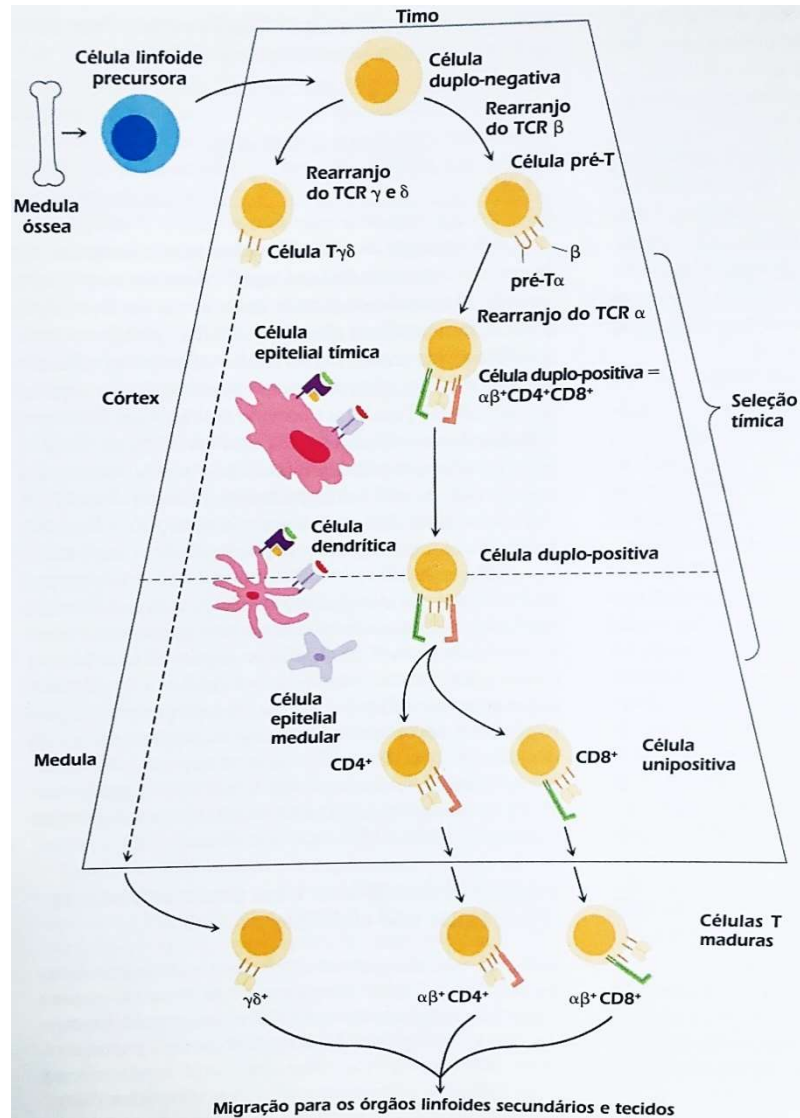


Figura 1 - Principais estágios no desenvolvimento das células T $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ no timo, mostrando os rearranjos genéticos do TCR e a expressão do TCR e correceptores CD4 e CD8⁵

As células B compõem cerca de 33% das células da região medular do timo, e foram primeiramente descritas por Isaacson e colaboradores, em 1987.⁶ Spencer e colaboradores (1992)⁷ estudaram as propriedades das células B tímicas utilizando a técnica de imunocitoquímica. Foi demonstrado que essas células apresentam morfologia variável, por vezes formam rosetas com tímócitos, e apresentam expressão de imunoglobulinas citoplasmáticas em diferentes proporções (IgG, IgM, IgD, IgA). As células B tímicas apresentam fenótipo de células B ativadas, com índice proliferativo em torno de 10%. Howe e colaboradores (1994)⁸ realizaram o estudo imunistoquímico das células B encontradas ao redor dos corpúsculos de Hassall em timos murinos e humanos.

Para isso, utilizaram 5 marcadores: CD20 / CD40 / CD80 – para células B, CD2 – para células T/NK, e MNF116 – para células epiteliais. Eles evidenciaram que as células CD20+ estavam confinadas à medula, sendo que, em neonatos e jovens, havia uma concentração em torno dos corpúsculos de Hassall, enquanto em fetos, apresentavam-se na junção cortico-medular.

Hofmann e colaboradores⁹ (1988) haviam sugerido que existiam duas populações de células B no timo, morfológica e imunofenotipicamente. Pela microscopia ele havia evidenciado que a maioria era caracterizada por células pequenas e redondas, e uma pequena parcela seria constituída por células maiores. As células pequenas expressavam CD19, CD20, CD22 e CD37. Já as maiores expressavam CD20 e proporções variáveis dos demais marcadores. Bornemann e colaboradores¹⁰ (1996) evidenciaram, através de estudo por microscopia eletrônica, que todas as células B tímicas são, morfológica e imunofenotipicamente, células asteroide. Que, apesar da variação de tamanho, apresentam processos citoplasmáticos característicos, concluindo que a descrição prévia da existência de duas subpopulações B seria, na verdade, um erro de interpretação dos achados devido às limitações da microscopia ótica.^{6, 10}

O estroma tímico tem sido alvo de muitos estudos, na tentativa de compreender seu papel no desenvolvimento e proliferação dos timócitos. As células estromais são responsáveis pela produção de citocinas pró-tímicas necessárias para o desenvolvimento dos timócitos.³ O microambiente tímico é composto por células epiteliais, fibroblastos, células mióides, macrófagos e células dendríticas.

As células epiteliais tímicas localizadas na região cortical (cTECs) e na região medular (mTECs), além das células dendríticas dispostas na junção cortico-medular, apresentam extrema importância na seleção tímica. A interação entre as células T CD3 duplo positivas (CD4+/CD8+) com as cTECs determinam a seleção positiva que ocorre na região cortical. A **seleção positiva** resulta na eliminação de mais de 90% dos timócitos por apoptose – aquelas células sem afinidade ou com afinidade muito baixa pela combinação do MHC e peptídeo próprio. As células duplo-positivas que reagem com afinidade muito alta pela combinação do MHC e peptídeo próprio também serão eliminadas por apoptose – **seleção negativa**. As células que interagem com os linfócitos T nesta etapa

são as mTECs e as células dendríticas dispostas na junção cortico-medular. A seleção negativa impede a reatividade de células T aos componentes próprios – característica importante para o desenvolvimento da tolerância central nas células T.

As células duplo-positivas regulam negativamente a expressão de um dos seus co-receptores (CD4 ou CD8), resultando em células T CD4⁺ ou TCD8⁺ (unipositivas), que são encontradas na medula tímica. As células unipositivas constituem o ponto final da complexa via de diferenciação do TCR $\alpha\beta$ no timo. Elas saem do timo *naïve* e circulam pela corrente sanguínea expressando um padrão de moléculas de adesão e receptores de quimiocinas, onde uma célula com receptor apropriado pode encontrar e responder ao antígeno. Essas células T onipotentes tem duas características importantes: são restritas pelo MHC próprio e são auto tolerantes.⁵

Jablonska-Mestanova e colaboradores,⁴ analisaram amostras de timos de 14 recém-nascidos submetidos a cirurgias realizadas para correção de malformações cardíacas. Utilizaram sete anticorpos monoclonais para localização exata de diferentes células que criam o microambiente tímico (citoqueratina AE1/AE3, desmina, actina, proteína S100, CD68, CD20 e CD45RO), bem como três anticorpos monoclonais contra proteínas que regulam o processo de apoptose (oncoproteína bcl2, proteína p53 e survivina). Com isso, evidenciaram a presença de células epiteliais em região subcapsular e medular; células dendríticas, mióides e células B na medula; e células T e macrófagos principalmente em região cortical.

A programação inicial do funcionamento do timo é crucial, pois determinará efeitos a longo prazo no desenvolvimento das células T. Esta programação depende de fatores genéticos e ambientais. Algumas síndromes genéticas específicas, como a Síndrome de Down e a Síndrome de DiGeorge, resultam em uma série de deficiências imunológicas devido a alterações do desenvolvimento do timo.³

1.4. O processo de involução tímica

Em humanos, assim como em todas as espécies, ocorre um declínio funcional progressivo com a idade em todos os sistemas, devido à perda e

instabilidade do material genético. O sistema imune é essencial para detecção e eliminação de patógenos e, deste modo, para a prevenção de danos e degeneração do organismo.¹¹

Indivíduos mais idosos são mais suscetíveis à infecções, neoplasias e fenômenos autoimunes, devido à falha da vigilância imune – secundária à imunosenescência.

O processo natural de envelhecimento é concomitante com a imunosenescência – degeneração progressiva do sistema imune. De acordo com a *U.S. Center for Disease (CDC)*³, aproximadamente 80% dos indivíduos mais idosos apresentam, pelo menos, uma doença crônica como resultado do declínio do sistema imune. A prevalência dessas condições relacionadas à idade é atribuída primariamente a alterações qualitativas e quantitativas das células T.³

O timo é o órgão primariamente responsável pela geração “de novo” de células T imunocompetentes, com vasto repertório de reconhecimento de antígeno. Entretanto, é um órgão que diminui significativamente de tamanho com o avançar da idade. Este processo, chamado “involução tímica relacionada a idade”, é evolutiva e conservadoramente mantida em vertebrados.

Ocorre a redução da população epitelial e linfocitária, paralelamente à proeminência e substituição adiposa do espaço perivascular, além da desorganização da transição cortico-medular.

As alterações que ocorrem no timo humano com o avançar da idade podem ser a chave para entender o declínio relacionado às células T envolvidos na imunosenescência. Após o nascimento, o timo ainda cresce (aumento de massa e volume) no primeiro ano de vida, especialmente nos primeiros meses. O processo de involução tem início ainda neste período. Apesar da atrofia lipomatosa ser a alteração relacionada à idade mais evidente, representa o estágio final de involução, a qual é precedido por uma série de eventos morfológicos que têm implicação imunológica.¹²

Diferenças observadas entre os sexos no tamanho do timo, na timopoiese e no processo de involução têm papel fundamental na determinação do nível da função imunológica.

O processo de involução está relacionado à idades e correlaciona diretamente com o declínio da timopoiese, como mostrado pelos níveis de

sjTREC – *signal joint TCR excision circles* – em ratos, humanos e outros primatas. O sjTREC é um indicador de células recém-saídas do timo. Todos os linfócitos T recém-saídos do timo carregam *T-cell receptor rearrangement excision circles* (TREC) como um subproduto de processos de recombinação de DNA. TRECs não são replicados e, portanto, diluídos na progênie que é formada após a divisão celular. O conteúdo TREC pode, portanto, ser usado para estimar a produção tímica e também – indiretamente – a involução tímica com o envelhecimento.

Em humanos, mulheres tem níveis significativamente mais altos de sjTREC do que homens da mesma idade, até os 60 anos. A partir desta idade as diferenças persistem, porém menos significativas.³

Muitos trabalhos mostram que o percentual de células TREC positivas é um marcador de atividade tímica. Que elas estão presentes no subconjunto de linfócitos T virgens, e que, a quantidade destas células diminui, concomitantemente, com a idade.¹³

A recuperação da timopoiese após terapias mieloablativas (como transplante de medula óssea e quimioterapia) também tem se mostrado inversamente proporcional à idade. Entretanto, diferenças entre os sexos ainda não foram evidenciados. Se todos os achados envolvendo diferenças no processo de involução tímica e timopoiese entre homens e mulheres resultam de variações genéticas, hormonais ou ambas, permanece um mistério.³

1.5. Dimorfismo sexual e minipuberdade

Durante muito tempo foram observadas diferenças na função do sistema imune entre os sexos. Mulheres geralmente apresentam menor incidência e severidade nas doenças parasitárias e infecciosas (virais/fúngicas/bacterianas), em relação aos homens. Entretanto, têm risco aumentado para uma variedade de doenças autoimunes, como a artrite reumatoide, a esclerose múltipla e o lúpus.

A genética é um dos principais determinantes da função imune, justificada pelo fato de que muitos genes envolvidos nesta função estão localizados no cromossomo X. Além das disparidades genéticas, acredita-se que a distribuição de receptores e níveis hormonais também modulam diferenças nas respostas

imunes observadas entre os sexos. O efeito dos hormônios sexuais na resposta imune pode ser exemplificado pelas mudanças no perfil de citocinas Th1 e Th2 durante a menopausa e a gestação, quando os níveis de estrogênio e progesterona variam, além da redução da atividade de doenças como a esclerose múltipla e a artrite reumatoide durante a gravidez.^{14,15}

O tamanho do timo é influenciado por diversos hormônios. Tem sido mostrado que tanto timócitos quanto células epiteliais tímicas (TECs) expressam receptores hormonais. Alguns trabalhos mostram que a castração de roedores resulta num aumento significativo do timo. Outros mostram que o volume do timo também varia durante a gravidez. A involução tímica é, notavelmente, observada durante a puberdade, quando a produção de hormônios esteroides aumenta. Infelizmente, há pouca literatura disponível que documenta diferenças na involução tímica entre homens e mulheres.³

Em ratos, já foi mostrada importante redução no peso do timo cerca de 18-26 dias após o nascimento. Após esse período, o peso volta a aumentar (até 46 dias nas fêmeas e até 35 dias nos machos), seguido, novamente, de uma redução – involução progressiva – em torno da puberdade, com declínio mais proeminente nos machos do que nas fêmeas.³

Estas diferenças em roedores – em relação ao sexo e idade – têm sido avaliadas em poucos estudos em humanos. Enquanto a diferenciação fetal precoce seguida por um processo de maturação progressiva é a regra para a maioria dos tecidos e sistemas; a maturação funcional incompleta intra-útero e na vida pós-natal precoce seguida da regressão funcional e quiescência parcial durante a infância, e a subsequente maturação final completa durante a puberdade, caracterizam o desenvolvimento das gônadas.

O fenômeno conhecido como minipuberdade – refere-se à ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário neonatal, fazendo com que as concentrações séricas de gonadotrofinas e testosterona se aproximem dos níveis masculinos adultos – têm sido alvo de pesquisas com o timo e sua relação com a função imune.¹⁶

O eixo hipotálamo-hipófise-gonadal está ativo na metade da gestação, mas silenciado no final do período devido aos efeitos de feedback negativo mediados pelos hormônios placentários. Esta restrição é removida ao

nascimento, levando à reativação do eixo e ao aumento dos níveis de gonadotrofinas.¹⁴ A fase exata em que a secreção de gonadotrofina pela pituitária se torna dependente do controle do GnRH (*Gonadotropin-Releasing Hormone*) hipotalâmico não é totalmente estabelecido. Porém, achados relacionados ao desenvolvimento de fetos anencéfalos sugerem que este controle é requerido do meio da gestação em diante.¹⁴

Após o parto, o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal é ativado quando o estrogênio é eliminado e um perfil hormonal que atinge os níveis puberais é estabelecido. Os níveis de gonadotrofina são altos nos 3 primeiros meses de vida, mas diminuem até os 6 meses – exceto os níveis de FSH em meninas, que se mantêm elevados até os 3-4 anos.¹⁴ Essas mudanças são chamadas de minipuberdade. Nos meninos, as funções testiculares a longo prazo e a produção de espermatozoides são reguladas com a minipuberdade, a qual contribui para a masculinização do cérebro. O papel da minipuberdade em recém-nascidos do sexo feminino não é conhecido.¹⁷

Depois desse período (0-6 meses de vida), o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal permanece quiescente até a puberdade.

Mecanismos genômicos governam de forma diferente processos celular e molecular envolvidos no funcionamento do timo neonato e, mais tarde, no processo de involução tímica.^{18, 19}

Moreira-Filho e colaboradores,¹⁹ em 2018, mostraram que alguns genes são diferentemente expressos entre meninos e meninas nos primeiros meses devida (minipuberdade); os autores sugerem que mecanismos genômicos e influências hormonais pós-natais possivelmente atuam de forma sinérgica moldando o dimorfismo sexual tímico nos 6 primeiros meses de vida.

É extensamente conhecido que mulheres são mais suscetíveis a doenças autoimunes que homens. Alguns estudos indicam possível associação a níveis hormonais (estrogênio e testosterona) e expressão diminuída do AIRE no sexo feminino. O papel crítico do AIRE na prevenção da autoimunidade é evidenciado pelo desenvolvimento de doenças autoimunes em humanos e camundongos deficientes em AIRE. Enquanto a perda completa da função do AIRE resulta em doença, a redução quantitativa predispõe à autoimunidade.^{15, 20, 21} Este fenômeno justifica a expressão deste marcador ser alvo de muitos estudos.

Outros autores²⁰ sugerem que as diferenças resultam de efeitos diretos e indiretos dos hormônios sexuais nas respostas imunes inatas e adaptativas. No entanto, ainda não está claro, até que ponto, o impacto dos hormônios sexuais na celularidade tímica pode refletir a influência de hormônios nas células epiteliais do timo (TECs) e em outros tipos de células (timócitos, células mesenquimais).

Dumont-Lagacé e colaboradores²⁰ (2015), observaram que os homens acumulam mais TECs que as mulheres; entretanto, estas células nos homens proliferam mais, mas apresentam deficiência funcional.

O significado biológico e as possíveis consequências a longo prazo da minipuberdade permanecem incertos, assim como os mecanismos que silenciam o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal até a puberdade. Os primeiros meses de vida fornecem uma janela de oportunidades para estudos funcionais do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal antes do desenvolvimento puberal.¹⁴

1.6. O timo e a síndrome de Down

A síndrome de Down, determinada pela trissomia do cromossomo 21, é a causa mais frequente de retardo mental. A incidência oscila em torno de 1/750 nascidos vivos. Essa população apresenta aumento na frequência de neoplasias hematológicas, doenças autoimunes órgão-específicas e quadros infecciosos. Estes dados, levaram alguns pesquisadores a estudar e levantar a hipótese de que a síndrome de Down estaria associada a anormalidades do sistema imune.²²

Benda e Strassmann²³ (1965) foram os primeiros a descrever anormalidades no timo de pacientes com síndrome de Down. Eles notaram o aumento dos corpúsculos de Hassall nos timos avaliados. Levin e colaboradores²⁴ (1979), a partir do estudo de 12 pacientes portadores desta síndrome, evidenciaram maior incidência de infecção dos tratos respiratório e gastrointestinal, quando comparados com pacientes não portadores. A análise histológica do timo, evidenciou redução do tamanho e depleção linfocitária do córtex, corpúsculos de Hassall gigantes com alterações císticas e aumento da celularidade em torno dos corpúsculos de Hassall. Concluiu-se que os achados histopatológicos poderiam ser correlacionados com as alterações do sistema

imune timo-dependentes, evidenciados pela redução do número de células T periféricas e algumas alterações na função dessas células.²⁵

Alguns autores descrevem o timo do portador de síndrome de Down como hipotrófico e hipofuncional. A hipofunção tímica é, pelo menos em parte, a explicação para os valores menores de linfócitos T observados em sangue periférico de pacientes Down em todas as faixas etárias – especialmente da linhagem CD4+.²⁶ Estudos sobre expressão gênica global e redes de interação transcricional mostraram uma hipoexpressão global do timo DS, com 406 genes significativamente hipoexpressos e nenhum hiperexpresso em comparação aos controles. Nenhum dos genes hipoexpressos com possível papel na resposta imune foi codificado no cromossomo 21.²⁷

Pellegrini e colaboradores²⁵ (2012) evidenciaram redução no número de células T CD4+ circulantes, aumento no número de células T CD8+ circulantes, aumento nas células T regulatórias (T_{REG}) circulantes e deficiência na sua função. As células T_{REG} são produzidas no timo e estão envolvidas em mecanismos de supressão, como modulação de citocinas do microambiente tímico, alterações metabólicas de células alvo e alteração na capacidade de ativação de células dendríticas.

À primeira vista, o perfil clínico do portador de síndrome de Down parece ser semelhante à imunosenescência precoce, com involução tímica e desregulação dos linfócitos T, resultando em altas taxas de infecção, neoplasias e doenças autoimunes. Entretanto, isso pode ser enganoso.¹¹ A redução da produção de linfócitos B e T desde o nascimento, combinada à falta de expansão e proliferação de células de memória compensatória, não suporta a teoria de imunosenescência precoce na síndrome de Down. Esses dados são mais consistentes com a imunodeficiência intrínseca na síndrome de Down. Além disso, a hipergamaglobulinemia em combinação com respostas anticorpo-específico diminuídas apoia a teoria de que os pacientes com síndrome de Down possuem uma imunodeficiência combinada de linfócitos B e T com mecanismos envolvidos diferentes daqueles que ocorrem no envelhecimento normal.¹¹

A produção científica de trabalhos com tema central em síndrome de Down, alterações do sistema imune, incidência de doenças e análise de componentes celulares do sistema imune em sangue periférico – principalmente

pela análise por citometria de fluxo – é vasta. Entretanto, os trabalhos que incluem avaliação histológica do timo humano em portadores de síndrome de Down são escassos. Dentre as referências deste trabalho, apenas 9 abordam dados obtidos por avaliação histológica do timo humano – oriundos de autópsia e cirurgia para correção de malformações cardíacas^{23, 28-34} – dentre os quais, 7 adicionam informações obtidas por análise imunoistoquímica, sendo que, a mais recente, data de 2021.³¹

2. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista o valioso material representativo do timo humano, um grupo de pesquisa multidisciplinar em TIMO, sob a liderança de dois pesquisadores com vasta experiência em imunologia pediátrica e técnicas genômicas avançadas (MSC e CAM), e a recente disponibilidade de anticorpos para a caracterização imunoistoquímica das diversas linhagens celulares hematopoiéticas, justifica-se uma revisão global das subpopulações tímicas, estabelecendo-se um possível substrato para a interpretação das peculiaridades do sistema imune nos portadores de síndrome de Down, quando comparado a pacientes não portadores de cromossomopatias. Este trabalho faz parte de um temático em timo humano, composto por diversos especialistas e constitui a parte da patologia, somando conhecimento e discutindo de forma interdisciplinar os resultados aqui obtidos.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Comparar espécimes de timo humano em portadores (DS) e não-portadores (NDS) de síndrome de Down em relação a aspectos morfológicos e de suas subpopulações celulares identificadas pela técnica imunistoquímica.

3.2. Específicos

- 3.2.1. Quantificar morfológicamente as diferentes regiões do timo de pacientes entre 11 dias e 5 anos de vida, comparando DS e NDS, estratificados por sexo e faixa etária (minipuberdade e pós-minipuberdade).
- 3.2.2. Topografar e quantificar as subpopulações de células tímicas identificadas imunofenotipicamente, comparando espécimes de DS e NDS.
- 3.2.3. Topografar e quantificar as subpopulações celulares nos grupos DS e NDS em relação ao sexo e faixa etária (minipuberdade e pós-minipuberdade) nas regiões cortical e medular.

4. METODOLOGIA

4.1. Obtenção das amostras e procedimento cirúrgico

Todas as amostras utilizadas neste estudo correspondem a produto de timectomia total, realizada durante cirurgias cardíacas para correção de diferentes malformações congênitas em pacientes recém-nascidos e crianças até 5 anos, no Instituto Dante Pazzanese e no Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor), no período de 2011 a 2017. Estes pacientes são regularmente acompanhados nestas instituições. As cirurgias cardíacas para correção de malformações congênitas requerem a remoção do pericárdio, ocorrendo, por consequência, a remoção parcial ou total do timo. Pelo fato deste procedimento acontecer nos primeiros instantes do ato operatório, infere-se que não haja consequências relacionadas a alterações devidas ao ato cirúrgico e a manipulação da peça.

Imediatamente após o procedimento, os espécimes foram fixados em formalidade tamponada a 10% e, após 24 horas, processadas e incluídas em parafina. Foram realizados cortes de 4 μ m de espessura, que foram utilizados para coloração padrão (hematoxilina e eosina).

4.2. Amostras de tecido

As amostras utilizadas neste trabalho foram obtidas em duas etapas: uma retrospectiva – coletada inicialmente para fins moleculares; e uma prospectiva – coletada em condições ideais objetivando o presente trabalho.

Coleta 1: Foram avaliados inicialmente 153 amostras de timo, coletados retrospectivamente. Destes, 119 amostras pertenciam a pacientes sem cromossomopatias e 34 a pacientes com diagnóstico de síndrome de Down. Em avaliação inicial dos blocos pré-existentes, foi constatado que o material incluído em parafina não serviria para análise proposta neste trabalho, devido ao tamanho dos fragmentos amostrados. Diante desta constatação, 37 amostras desta coleta inicial que ainda estavam conservadas em formol foram amostradas em fragmentos de 1,0 x 1,0 cm, e novos blocos de parafina foram montados, visando representação adequada para análise histológica, avaliação dos critérios morfométricos e seleção de áreas para montagem do TMA do presente trabalho.

Das 37 amostras, foram representados **16 casos DS e 21 NDS**, de forma a haver, pelo menos, 1 representante por mês até o primeiro ano de vida. Estas 37 amostras foram utilizadas para análise morfométrica inicial e montagem dos blocos de TMA – utilizados para análise das subpopulações tínicas por imunoistoquímica.

Coleta 2: Após a análise inicial dos dados morfométricos, discussão como grupo temático de pesquisa e correlação dos achados com dados de colaboradores sobre diferenças de expressão gênica importantes entre os sexos, foram incluídas mais **38 amostras**, sendo **8 do grupo DS e 30 do grupo NDS**. Totalizando 75 amostras, que foram analisadas em sua totalidade do ponto de vista morfométrico. Estas 38 amostras excedentes não foram adicionadas aos blocos de TMA previamente preparados.

4.3. Confeção das micromatrizes teciduais (TMA) para a análise imunoistoquímica

Para a construção de TMA deste trabalho, foram utilizados os 37 casos inicialmente selecionados. Foram realizados cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina para seleção das regiões de interesse (córtex, medula e espaço perivascular) para representação nos blocos de TMA, totalizando a montagem de 6 blocos assim discriminados:

- Bloco T0399: região cortical do grupo não-Down
- Bloco T0400: região medular do grupo não-Down
- Bloco T0401: região perivascular do grupo não-Down
- Bloco T0396: região cortical do grupo Down
- Bloco T0397: região medular do grupo Down
- Bloco T0398: região perivascular do grupo Down.

Foram adquiridos núcleos cilíndricos com agulhas de 1 milímetro de diâmetro de áreas morfologicamente representativas selecionadas das amostras de tecido dos blocos doadores e dispostas em um bloco de parafina receptor com distância de 0,3 milímetros entre cada tecido. Para confecção foi utilizado equipamento MTA1 (*Manual Tissue Microarray, Beecher Instruments, EUA*). Este

procedimento foi realizado no LIM-14, Patologia Hepática, FMUSP. Figura ilustrativa da técnica de TMA (figura 2).

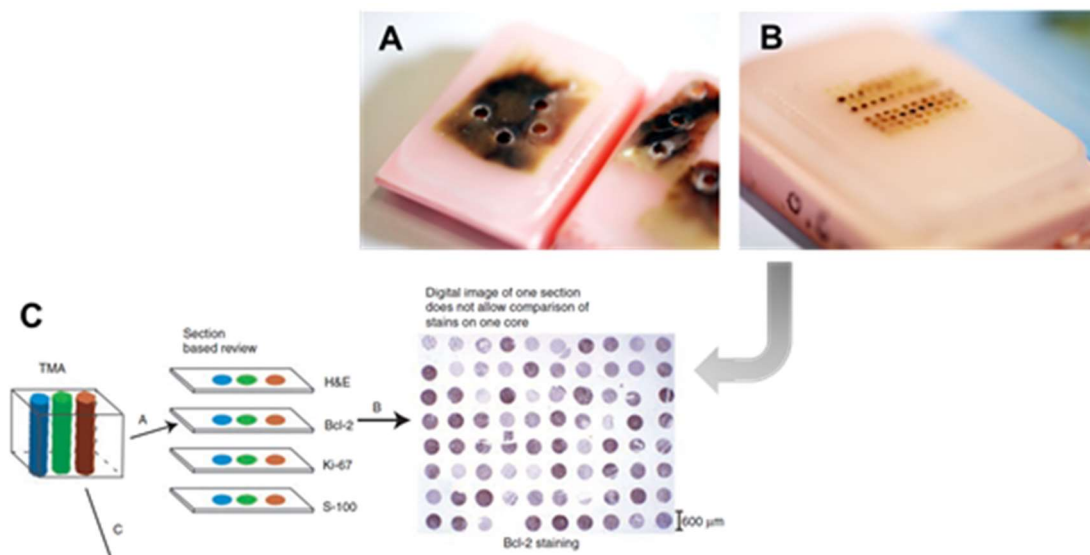


Figura 2 - Modelo esquemático de montagem dos blocos de TMA. A montagem dos blocos de parafina receptores permite a representação de todas as amostras num mesmo bloco que, ao final do processamento, permitirá a análise de todos os casos numa mesma lâmina. (A) Bloco doador; (B) Bloco receptor;³⁵ (C) Lâmina ³⁶

Para determinar orientação de posição, os três primeiros cilindros horizontais de cada bloco, foram utilizados tecidos renais controles obtidos de necropsia, seguindo a planilha previamente confeccionada em Excel (*Microsoft Office 2016* – figuras 3 e 4).

T0399								
C	C	C	TC035	TC035	TC035	TC029	TC029	TC029
TC039	TC039	TC039	TC045	TC045	TC045	TC046	TC046	TC046
TC038	TC038	TC038	TC017	TC017	TC017	TC056	TC056	TC056
TC001	TC001	TC001	TC011	TC011	TC011	TC016	TC016	TC016
TC007	TC007	TC007	TC031	TC031	TC031	TC043	TC043	TC043
TC047	TC047	TC047	TC014	TC014	TC014	TC044	TC044	TC044
TC040	TC040	TC040	TC033	TC033	TC033	TC032	TC032	TC032
TC015	TC015	TC015						
T0400								
C	C	C	TC035	TC035	TC035	TC029	TC029	TC029
TC039	TC039	TC039	TC045	TC045	TC045	TC046	TC046	TC046
TC038	TC038	TC038	TC017	TC017	TC017	TC056	TC056	TC056
TC001	TC001	TC001	TC011	TC011	TC011	TC016	TC016	TC016
TC007	TC007	TC007	TC031	TC031	TC031	TC043	TC043	TC043
TC047	TC047	TC047	TC014	TC014	TC014	TC044	TC044	TC044
TC040	TC040	TC040	TC033	TC033	TC033	TC032	TC032	TC032
TC015	TC015	TC015						
T0401								
C	C	C	TC035	TC035	TC035	TC029	TC029	TC029
TC039	TC039	TC039	TC045	TC045	TC045	TC046	TC046	TC046
TC038	TC038	TC038	TC017	TC017	TC017	TC056	TC056	TC056
TC001	TC001	TC001	TC011	TC011	TC011	TC016	TC016	TC016
TC007	TC007	TC007	TC031	TC031	TC031	TC043	TC043	TC043
TC047	TC047	TC047	TC014	TC014	TC014	TC044	TC044	TC044
TC040	TC040	TC040	TC033	TC033	TC033	TC032	TC032	TC032
TC015	TC015	TC015						

Figura 3 - Representação das amostras típicas nos 3 blocos de TMA: T0399 (vermelho), região cortical do grupo NDS; T0400 (preto), região medular do grupo NDS; T0401 (azul), região perivascular do grupo NDS

T0396					
C	C	C	TD002	TD002	TD002
TD012	TD012	TD012	TD007	TD007	TD007
TD001	TD001	TD001	TD005	TD005	TD005
TD004	TD004	TD004	TD008	TD008	TD008
TD017	TD017	TD017	TD009	TD009	TD009
TD010	TD010	TD010	TD013	TD013	TD013
TD024	TD024	TD024	TD003	TD003	TD003
TD006	TD006	TD006	TD014	TD014	TD014
TD016	TD016	TD016			
T0397					
C	C	C	TD002	TD002	TD002
TD012	TD012	TD012	TD007	TD007	TD007
TD001	TD001	TD001	TD005	TD005	TD005
TD004	TD004	TD004	TD008	TD008	TD008
TD017	TD017	TD017	TD009	TD009	TD009
TD010	TD010	TD010	TD013	TD013	TD013
TD024	TD024	TD024	TD003	TD003	TD003
TD006	TD006	TD006	TD014	TD014	TD014
TD016	TD016	TD016			
T0398					
C	C	C	TD002	TD002	TD002
TD012	TD012	TD012	TD007	TD007	TD007
TD001	TD001	TD001	TD005	TD005	TD005
TD004	TD004	TD004	TD008	TD008	TD008
TD017	TD017	TD017	TD009	TD009	TD009
TD010	TD010	TD010	TD013	TD013	TD013
TD024	TD024	TD024	TD003	TD003	TD003
TD006	TD006	TD006	TD014	TD014	TD014
TD016	TD016	TD016			

Figura 4 - Representação das amostras tímicas nos 3 blocos de TMA: T0396 (vermelho), região cortical do grupo DS; T0397 (preto), região medular do grupo DS; T0398 (azul), região perivascular do grupo DS

Após a confecção dos 6 blocos previamente desenhados (T0399, T0400, T0401, T0396, T0397 e T0398), cada bloco foi submetido a 50 secções, em cortes de 3µm, dispostos em lâminas silanizadas, submetidas a banho de parafina e armazenadas em freezer -20°C, para posterior reação imunoistoquímica.

4.3.1. Análise morfológica – 75 amostras (Coletas 1+2)

Foram incluídos para análise histológica, utilizando-se a coloração de hematoxilina e eosina, 75 amostras de timo humano assim discriminadas: 51 casos NDS e 24 casos DS (figura 5).

51 casos NDS	24 casos DS
- faixa etária: 11 dias a 40 m . 15 < 7m (MP) . 36 ≥ 7m (PMP)	- faixa etária: 4 m e 1 d a 60 m . 6 < 7m (MP) . 18 ≥ 7m (PMP)
- em relação ao sexo: . 32 sexo masculino . 19 sexo feminino	- em relação ao sexo: . 7 sexo masculino . 17 sexo feminino

Figura 5 - Processo de seleção e determinação do número de amostras para análise morfométrica foram analisados 75 casos, sendo 51 NDS e 24 DS

Todas as lâminas foram fotografadas com as objetivas de 40x para análise morfométrica no microscópio Olympus CX31 e câmera Canon EOS Redel SL1. Atentando para captura de imagens de áreas histologicamente bem incluídas, com corte e coloração bem preservados e que mantinham as proporções habituais entre os três compartimentos tímicos: córtex (C), medula e espaço perivascular (PV).

A partir da análise de 3 lóbulos de cada amostra foram avaliados os seguintes critérios morfométricos:

- Espessura média do córtex
- Diâmetro médio da região medular
- Cálculo da área total do lóbulo
- Cálculo da área das regiões medulares
- Proporção entre a área medular / área total do lóbulo

Para isso, os casos tiveram três lóbulos fotografados no aumento de 40x e, em seguida, cada foto foi analisada em relação aos critérios pré-definidos. Ao final da análise de cada critério, foi realizada uma média aritmética dos valores encontrados nas três fotos, a fim de obter-se um valor para cada caso.

Para o cálculo da espessura média do córtex, foram mensuradas 10 medidas aleatórias por lóbulo de cada foto, totalizando 30 medidas lineares por caso. Em seguida, foi realizada uma média aritmética entre as 30 medidas dos 3 lóbulos mensurados, e obtido uma medida para cada caso.

Para o cálculo do diâmetro médio da região medular, foram obtidos os diâmetros das regiões medulares de todas as regiões medulares de cada foto e, em seguida, realizada uma média aritmética para obtenção do valor final.

Para o cálculo das áreas dos lóbulos e regiões medulares, foi realizada a demarcação da área de interesse, de todas as áreas medulares de cada uma das três fotos, realizada uma média aritmética de cada foto de cada caso e, em seguida, realizada uma média aritmética entre as três fotos de cada caso, chegando a um valor final para cada caso.

4.3.2. Caracterização das subpopulações através da técnica de imunoistoquímica em blocos de TMA – 37 amostras (Coleta 1)

Foram selecionados 14 anticorpos para avaliar as subpopulações de interesse. Foram eles: CD20, PAX-5 e CD23 (população B); CD2, CD5, CD4, CD8, CD1a e FOXP3 (população T); CD56 (células T/NK); CD68 e CD163 (macrófagos); S-100 (células dendríticas, células de Langerhans, macrófagos e células mioepiteliais); AE1/AE3 (células epiteliais – coquetel de citoqueratina que inclui CK1 - 8, 10, 14 - 16 e 19). Os anticorpos são apresentados de forma detalhada na tabela 1.

Tabela 1 - Relação de anticorpos utilizados, com os respectivos fabricantes, clones e diluições utilizadas

Anticorpo	Fabricante	Código	Clone	Título	Rec. Ag
CD20	DAKO	M0755	L26	1:2500	CITRATO pH 6
PAX5	LEICA NOVOCASTRA	NCL-L-PAX-5	1EW	1:50	CITRATO pH 6
CD23	LEICA-NOVOCASTRA	NCL-L-CD23	1B12	1:50	CITRATO pH 6
CD2	LEICA-NOVOCASTRA	NCL-L-CD2	AB75	1:100	EDTA pH 8
CD5	LEICA-NOVOCASTRA	NCL-L-CD5	4C7	1:100	CITRATO pH 6
CD4	LEICA NOVOCASTRA	NCL-LCD4-368	4B12	1:50	TRIS-EDTA pH9
CD8	DAKO	M7103	C8/144B	1:400	EDTA pH 8
CD1a	DAKO	M3571	010	1:100	TRIS-EDTA pH9
FOXP3	Abcam	Ab20034	236A/E7	1:400	TRIS-EDTA pH9
CD56	LEICA-NOVOCASTRA	NCL-L-CD56	CD564	1:200	CITRATO pH 6
CD68	DAKO	M0876	PG-M1	1:2500	CITRATO pH 6
CD163	LEICA-NOVOCASTRA	NCL-L-CD163	10D6	1:300	CITRATO pH 6
S100	DAKO	Z0311	POLICLONAL	1:200	TRIPSINA
AE1AE3	DAKO	M3515	AE1/AE3	1:800	CITRATO pH 6

4.4. Análise das imagens

Foi utilizado para análise das imagens obtidas das lâminas inicialmente coradas com hematoxilina e eosina (coleta1+2), e das lâminas de TMA – HE e reações imunoistoquímicas (coleta 1) – o *software Image-Pro Plus, V.5 Media Cybernetics, Inc.* Este *software* apresenta, dentre as suas funções: aquisição de imagens; processamento de imagens; calibração morfométrica, densiométrica e de perspectiva; contagem de objetos; mensuração de parâmetros (incluindo área, perímetro e densidade de preenchimento); ferramentas de seguimento (para realizar comparações); e co-localização. Este *software* dispõe também de ferramentas que permitem apresentar a análise dos dados em gráficos com histogramas e diagramas bi-variantes.

4.5. Técnica imunoistoquímica

Os anticorpos utilizados para este estudo estão descritos na tabela 1 utilizando-se a técnica manual. Cortes de 4µm de espessura foram colocados em lâminas silanizadas (*3-Aminopropil-trietoxi-silano-Sigma Chemical Co.; St.Louis, Missouri, EUA*) em suporte adequado. O processo de desparafinização foi feito ao colocar as lâminas em xilol quente, em estufa a 60° – 65° C, durante

5 minutos e passadas rapidamente em 3 banhos de xilol frio. Para desidratação dos cortes as lâminas foram colocadas em dois banhos de álcool absoluto, um banho de álcool 95° e um banho de álcool 70°, mergulhada em ácido fórmico por 3 minutos. Em seguida, foram lavadas em água corrente, água deionizada e deixadas em tampão fosfato (PBS) pH 7,4. O próximo passo foi a recuperação dos sítios antigênicos realizada em alta temperatura em solução de ácido cítrico 10 mM PH 6, EDTA pH8 ou Tris-citrato pH9, de acordo com a padronização de cada anticorpo, de acordo com cada marcador. O bloqueio da peroxidase endógena, presente nas hemácias, foi feito com água oxigenada 10v (3%). As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários diluídos em diluente de anticorpo (*Universal - marca EasyPath Diagnósticos*), por 12 a 18 horas a 4°C e, posteriormente, incubadas com o *kit* de amplificação *NovolinkMax*. Foi utilizado como cromógeno Diaminobenzidina (DAB) (*Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha*). Posteriormente ocorreu a contra coloração com hematoxilina de Harris (*Merck, Darmstadt, Alemanha*) para todos os casos.

4.6. Análise estatística

O teste Mann-Whitney foi realizado utilizando *GraphPad Prism* versão 7.0 e para as análises comparativas entre os grupos das medidas morfométricas e das subpopulações tímicas, sendo utilizado índice de significância $p < 0,05$. Todos os dados utilizados para as diversas análises comparativas e os respectivos valores de p são apresentados em tabelas no apêndice 9.

5. RESULTADOS

5.1. Estudo morfométrico (N: 75 amostras)

5.1.1. Caracterização demográfica das amostras por sexo e idade

Dos 51 casos controle (NDS), a faixa etária dos pacientes varia entre 11 dias a 40m (Média: 17m12d), sendo 15 < 7m(MP) e 36 ≥ 7m (PMP).

Em relação ao sexo, 32 amostras de timos são de crianças do sexo masculino e 19 são de crianças do sexo feminino (tabela 2).

Tabela 2 - Relação de casos sem síndrome de Down (NDS) selecionados

	ID Lab	Sexo	Idade
1	TC001	M	7m17d
2	TC002	F	6m10d
3	TC004	F	2a5m
4	TC005	F	1a5m
5	TC007	M	9m2d
6	TC008	F	1a2m
7	TC009	M	1a6m10d
8	TC011	M	8m 11d
9	TC012	M	2a1m
10	TC014	F	1a3m
11	TC015	F	3a4m
12	TC016	M	8m19d
13	TC017	F	6m24d
14	TC018	M	6m6d
15	TC019	F	6m9d
16	TC024	M	6m3d
17	TC026	M	2m11d
18	TC027	F	9m1d
19	TC029	M	2m1d
20	TC030	M	11d
21	TC031	F	9m26d
22	TC032	F	2a6m10d
23	TC033	M	2a16d
24	TC035	M	29d
25	TC037	M	3m19d
26	TC038	M	6m1d
27	TC039	F	3m18d
28	TC040	M	1a8m
29	TC042	F	1a2m19d

continua...

...continuação

Tabela 2 - Relação de casos sem síndrome de Down (NDS) selecionados

	ID Lab	Sexo	Idade
30	TC043	F	11m15d
31	TC044	M	1a6m10d
32	TC045	F	4m11d
33	TC046	F	5m10d
34	TC047	M	1a1m
35	TC048	M	1a7m
36	TC049	M	1a5m
37	TC050	M	1a1m10d
38	TC051	M	2a1m
39	TC052	M	14d
40	TC053	M	2a1m
41	TC054	M	1a4m
42	TC055	F	8m9d
43	TC056	M	7m8d
44	TC057	F	2a1m
45	TC058	F	1a2m
46	TC059	M	2a7m
47	TC060	M	1a10m10d
48	TC061	M	1a2m
49	TC62	M	2a6m3d
50	TC63	M	2a6m
51	TC65	M	1a11m

Dos 24 casos com DS, a faixa etária varia entre 4 meses e 1 dia a 60 meses (média: 20m2d), sendo $6 < 7m$ (MP) e $18 \geq 7m$ (PMP). Em relação ao sexo, 7 timos são de crianças do sexo masculino e 17 são de crianças do sexo feminino (tabela 3).

Tabela 3 - Relação de casos com síndrome de Down selecionados

	ID La22b	Sexo	Idade
1	TD001	F	6m27d
2	TD002	M	4m1d
3	TD003	F	1a3m11d
4	TD004	F	7m24d
5	TD005	F	7m10d
6	TD006	F	1a6m15d

continua...

...continuação

Tabela 3 - Relação de casos com síndrome de Down selecionados

	ID La22b	Sexo	Idade
7	TD007	M	5m21d
8	TD008	F	8m10d
9	TD009	F	9m14d
10	TD010	M	11m12d
11	TD011	M	1a6m
12	TD012	M	5m1d
13	TD013	F	1a23d
14	TD014	M	1a7m25d
15	TD015	F	4m24d
16	TD016	F	3a11m
17	TD017	F	8m23d
18	TD018	M	9m14d
19	TD020	F	7m11d
20	TD021	F	8m
21	TD022	F	8m16d
22	TD023	F	6m20d
23	TD024	F	1a2m24d
24	TD025	F	5a

5.1.2. Distribuição etária das amostras

Na figura abaixo está ilustrada a distribuição etária das amostras.

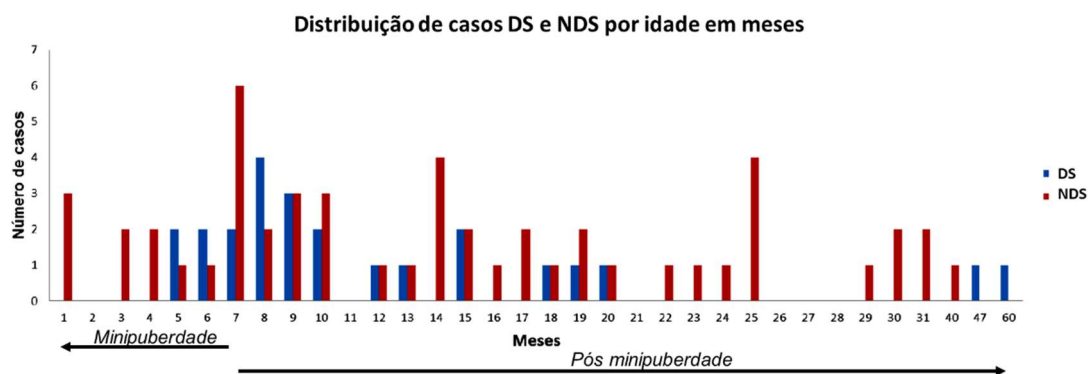


Figura 6 - Distribuição de todas as amostras, por idade (mês a mês)
DS: síndrome de Down; NDS: não síndrome de Down

5.1.3. Resultados da análise morfométrica (N total: 75 amostras)

A análise morfométrica foi feita em um fragmento de timo, buscando fragmentos que contivessem representados os 3 compartimentos tímicos: córtex (C), medula (M) e espaço perivascular (PV) (figura 7).

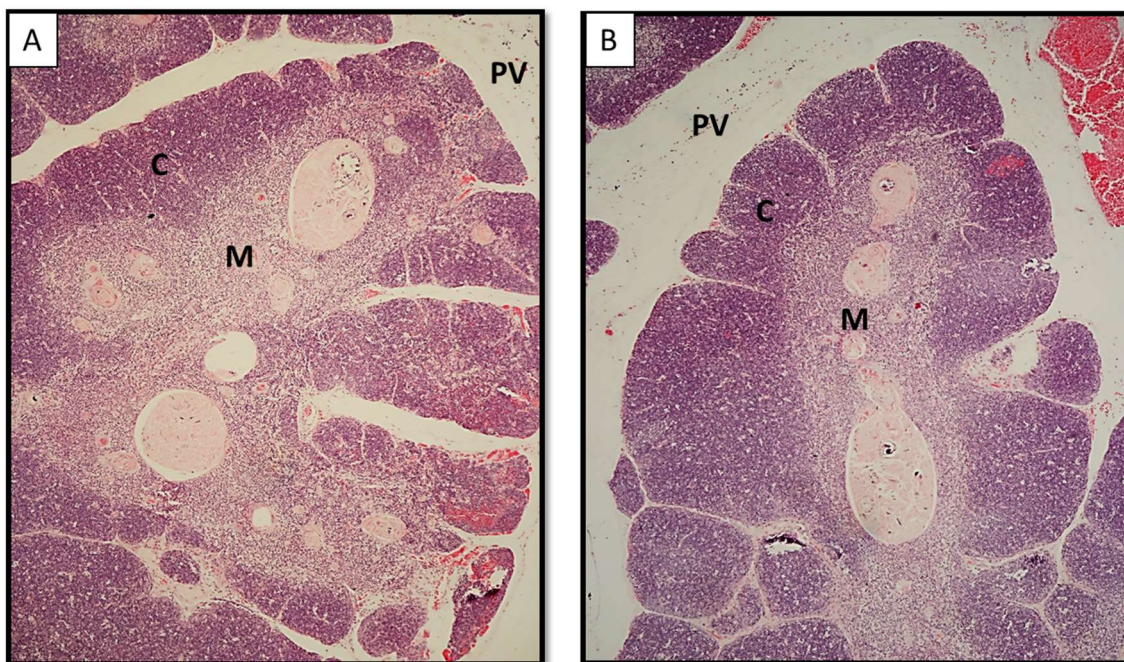


Figura 7 - Representação dos compartimentos fotografados e avaliados morfológicamente do grupo DS – Figura 4A e do grupo NDS – Figura 4B. Imagens obtidas no aumento de 40x. (C) para região do córtex; (M) para a região da medula; e (PV) para o espaço perivascular

5.1.4. Avaliação comparativa entre os grupos DS e NDS

Os resultados das análises morfométricas comparativas de acordo com as regiões topográficas, faixas etárias e sexo, estão apresentados nas figuras 8 a 10 e resumidos no texto abaixo. Além disso, todos os valores absolutos e proporcionais utilizados para análise estatística encontram-se nos apêndices 1 e 2.

A primeira avaliação morfométrica realizada comparou todas as amostras do grupo DS em relação ao grupo NDS (figura 8A-E). Nesta análise inicial, observa-se que o grupo DS apresenta menor espessura do córtex ($p=0,0316$) e maior razão entre área medular / área total do lóbulo ($p=0,0162$), sem diferença da área total do lóbulo.

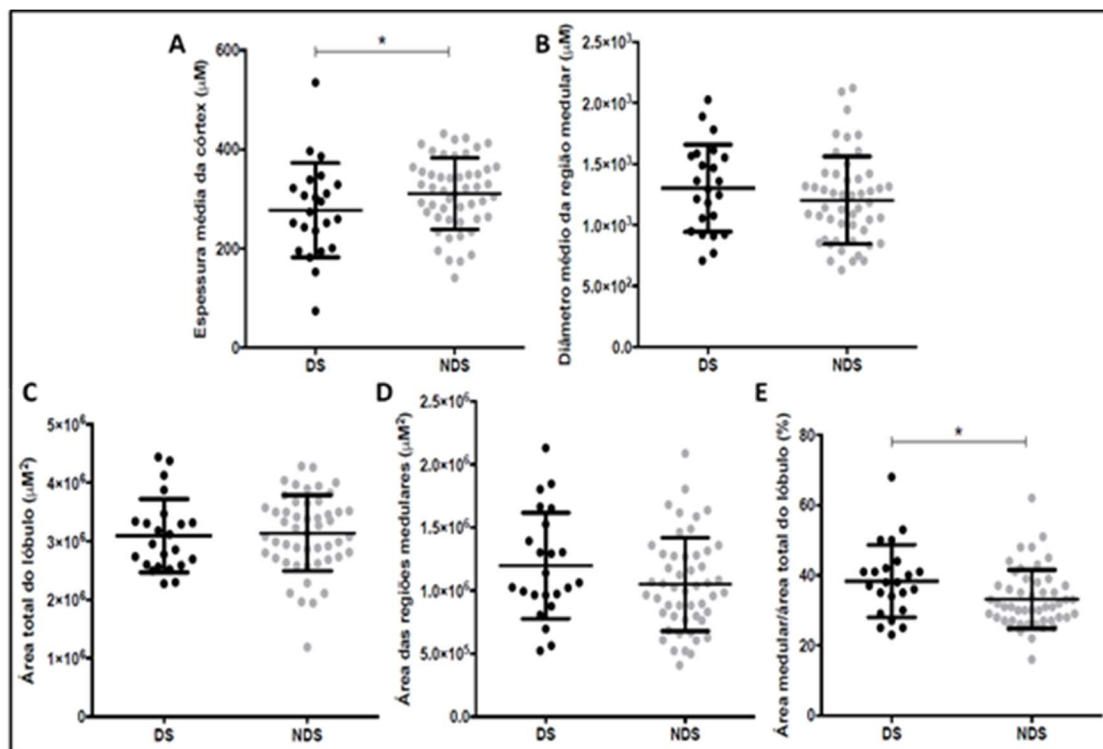


Figura 8 - Análise morfométrica comparativa entre os grupos DS e NDS. A: em relação à espessura média do córtex; B: em relação ao diâmetro médio da região medular; C: em relação à área total do lóbulo; D: em relação à área das regiões medulares; e E: razão entre área medular e área total do lóbulo. DS: grupo Down; NDS: grupo não-Down

5.1.5. Avaliação entre os subgrupos DS e NDS no período de idade correspondente ao minipuberdade (MP) e pós-minipuberdade (PMP)

Amostra avaliada nesta análise:

MP DS: N = 6 MP NDS: N = 15

NMP DS: N=18 NMP NDS: N=36

Ao realizar a subdivisão em grupos etários previamente determinados (*cut-off* de 7 meses), observou-se que o subgrupo MP DS apresenta espessura média do córtex menor que o mesmo subgrupo MP NDS ($p=0,0474$) (figura 9A).

Também foi observada diferença estatisticamente significativa entre esses subgrupos quando avaliada a relação entre as áreas da região medular e total do lóbulo ($p=0,0312$) (figura 9E).

A despeito destas diferenças observadas, as áreas totais dos lobulos e as áreas das regiões medulares, quando avaliadas individualmente, não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (figuras

9C e D). Também não foi observada diferença na medida linear do diâmetro médio da região medular (figura 9B).

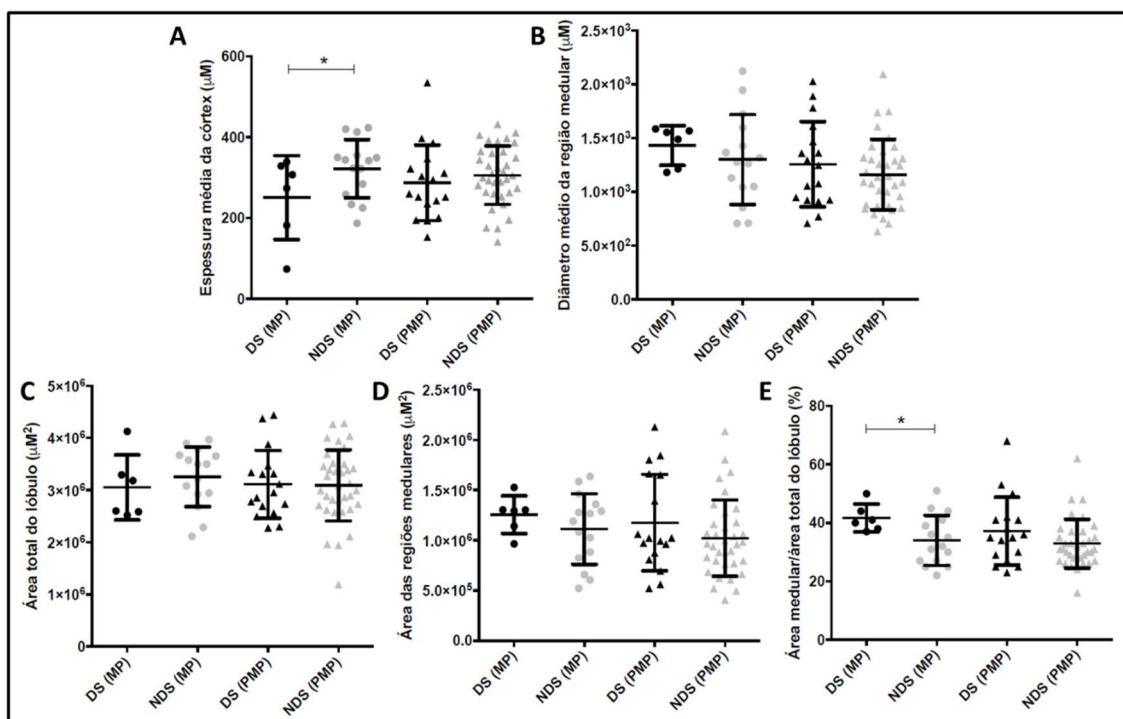


Figura 9 - Análise morfométrica comparativa entre os grupos DS e NDS nos subgrupos de idade correspondente a minipuberdade, e não-minipuberdade. A: em relação à espessura média do córtex; B: em relação ao diâmetro médio da região medular; C: em relação à área total do lóbulo; D: em relação à área das regiões medulares; E: a relação à razão entre área medular e área total do lóbulo. DS (MP): minipuberdade grupo Down; NDS (MP): minipuberdade grupo não-Down; DS (PMP): não-minipuberdade grupo DS; NDS (PMP): não-minipuberdade grupo NDS

5.1.6. Avaliação entre os subgrupos DS e NDS em relação aos sexos (MxF)

Amostra avaliada nesta análise:

DS M: N = 7, DS F: N = 17 NDS M: N = 32; NDS F: N = 19

Ao analisar, comparativamente, os subgrupos masculino e feminino do grupo Down, foram identificadas algumas diferenças.

As meninas não portadoras de síndrome de Down apresentam maior espessura média do córtex do que as meninas com síndrome de Down ($p=0,0277$) (figura 10A). Esta diferença não foi observada entre os meninos.

Além disso, a razão entre área medular e área total do lóbulo, foi maior nas meninas DS quando comparadas com as meninas NDS ($p=0,002$) (figura

10E). Porém, não foram observadas diferenças nas áreas medulares e total dos lóbulos, quando avaliadas individualmente (figuras 10 C e D).

Não foram observadas diferenças entre meninos e meninas (DS x NDS) em nenhum dos critérios avaliados (figura 10 A-E).

A única diferença estatisticamente significativa entre os sexos foi observada dentro do grupo NDS, onde as meninas, apresentaram maior diâmetro médio da região medular em relação aos meninos ($p=0,0226$) (figura 10B). Os demais critérios (espessura média do córtex e áreas medular e total do lóbulo) apresentaram uma tendência em serem maiores nas meninas do que nos meninos, neste mesmo grupo (NDS), porém sem significância estatística (figuras 10A-D).

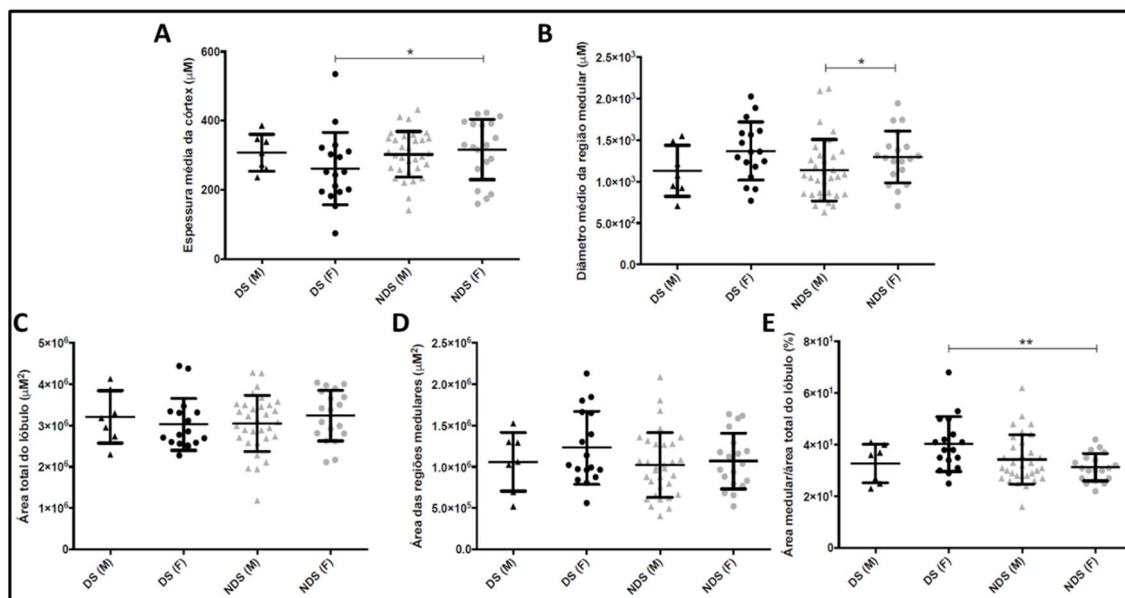


Figura 10 - Análise morfométrica comparativa entre os grupos DS e NDS em relação aos subgrupos por sexo. A: em relação à espessura média do córtex; B: em relação ao diâmetro médio da região medular; C: em relação à área total do lóbulo; D: em relação à área das regiões medulares; E: em relação à razão entre as áreas medular e total do lóbulo. DS(M): meninos Down (triângulo preto); DS(F): meninas Down (círculo preto); NDS(M): meninos não-Down (triângulo cinza); NDS(F): meninas não-Down (círculo cinza).

Em resumo:

O grupo DS mostrou comportamento mais variável dos parâmetros morfométricos avaliados em função das faixas etárias e sexo, do que o grupo NDS, a despeito da ausência de significância estatística.

- As diferenças morfométricas entre os grupos DS e NDS parecem se manifestar especialmente nos primeiros 7m de vida, época da minipuberdade, com redução do córtex e tendência em expansão da medula no grupo DS. Embora essa mesma tendência seja observada no período seguinte (>7m), não foi acompanhada de significância estatística.
- No grupo DS, as meninas apresentam uma significativa redução da espessura média da região cortical, e um aumento da razão entre as áreas medular e total do lóbulo quando comparadas com as meninas NDS.
- Na avaliação do grupo NDS, observou-se que os meninos apresentam um diâmetro médio da região medular menor do que as meninas. Não foram observadas diferenças entre os sexos (M x F) entre os grupos DS e NDS.

5.2. Estudo das subpopulações celulares pela técnica imunoistoquímica das amostras dispostas no TMA (N: 37 amostras)

5.2.1. Caracterização demográfica das amostras por sexo e idade

Dos 21 casos de NDS, 9 pacientes eram do sexo feminino e 12 do sexo masculino, sendo 7 do grupo MP e 14 do grupo NMP. Neste grupo, a idade variou de 29 dias a 40 meses de vida (Média de idade: 11m 9d) (tabela 4).

Tabela 4 - Caracterização demográfica das amostras por sexo e idade dos casos de pacientes NDS (Coleta 1, 21 casos)

	CASOS NDS	IDADE	SEXO
1	TC035	29d	M
2	TC029	2m1d	M
3	TC039	3m18d	F
4	TC045	4m11d	F
5	TC046	5m10d	F
6	TC038	6m1d	M
7	TC017	6m24d	F
8	TC056	7m8d	M
9	TC001	7m17d	M
10	TC011	8m11d	M
11	TC016	8m19d	M
12	TC007	9m2d	M
13	TC031	9m26d	F
14	TC043	11m15d	F
15	TC047	1a1m	M
16	TC014	1a3m	F
17	TC044	1a6m	M
18	TC040	1a8m	M
19	TC033	2a16d	M
20	TC032	2a6m10d	F
21	TC015	3a4m	F

Dos 16 casos com DS, 11 pacientes eram do sexo feminino e 5 do sexo masculino, sendo 4 do grupo MP e 12 do grupo NMP. Neste grupo, a idade variou de 4 meses e 1 dia de vida até 35 meses de vida (média = 16 m) (tabela 5).

Tabela 5 - Caracterização demográfica das amostras por sexo e idade dos casos de pacientes DS (Coleta 1, 16 casos)

	CASOS DS	IDADE	SEXO
--	-----------------	--------------	-------------

1	TD002	4m1d	M
2	TD012	5m1d	M
3	TD007	5m21d	M
4	TD001	6m27d	F
5	TD005	7m10d	F
6	TD004	7m24d	F
7	TD008	8m10d	F
8	TD017	8m23d	F
9	TD009	9m14d	F
10	TD010	11m12d	M
11	TD013	1a23d	F
12	TD024	1a2m24d	F
13	TD003	1a3m11d	F
14	TD006	1a6m15d	F
15	TD014	1a7m25d	M
16	TD016	3a11m	F

5.2.2. Representação da distribuição dos casos dos grupos DS e NSD nos blocos de TMA

A figura 11 ilustra um bloco de TMA de cada subgrupo avaliado no estudo, corada com hematoxilina e eosina.

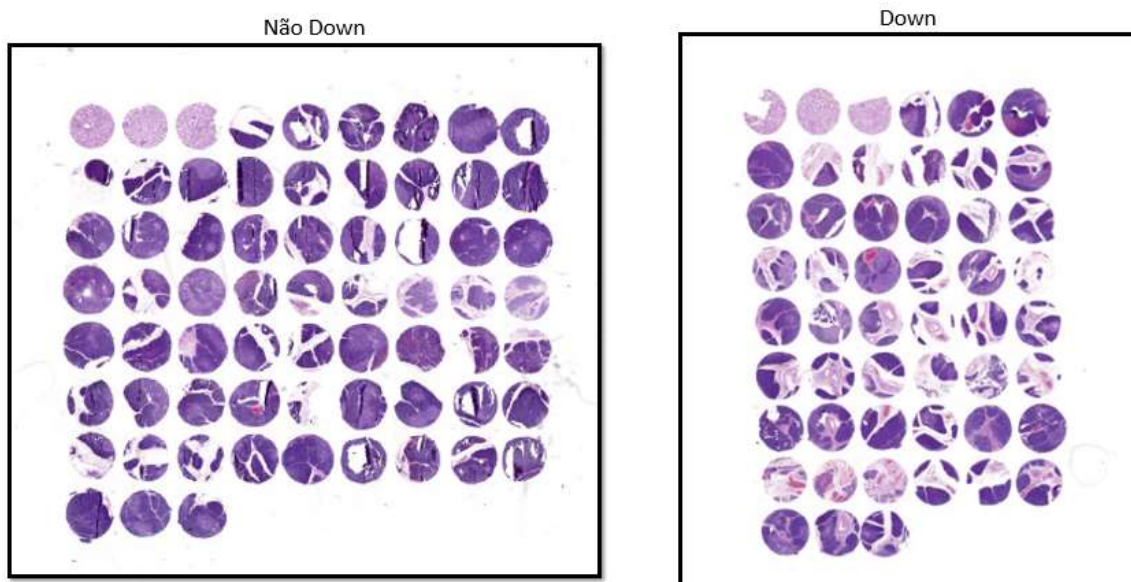


Figura 11 - Representação de lâminas de TMA coradas com H&E escaneadas para avaliação da qualidade e integridade das amostras, para posteriores reações imunohistoquímicas

A figura 12 ilustra as imagens de 3 amostras do TMA do grupo DS, coradas pela H&E, representando as 3 áreas do lóbulo tímico: cortical, medular e perivascular.

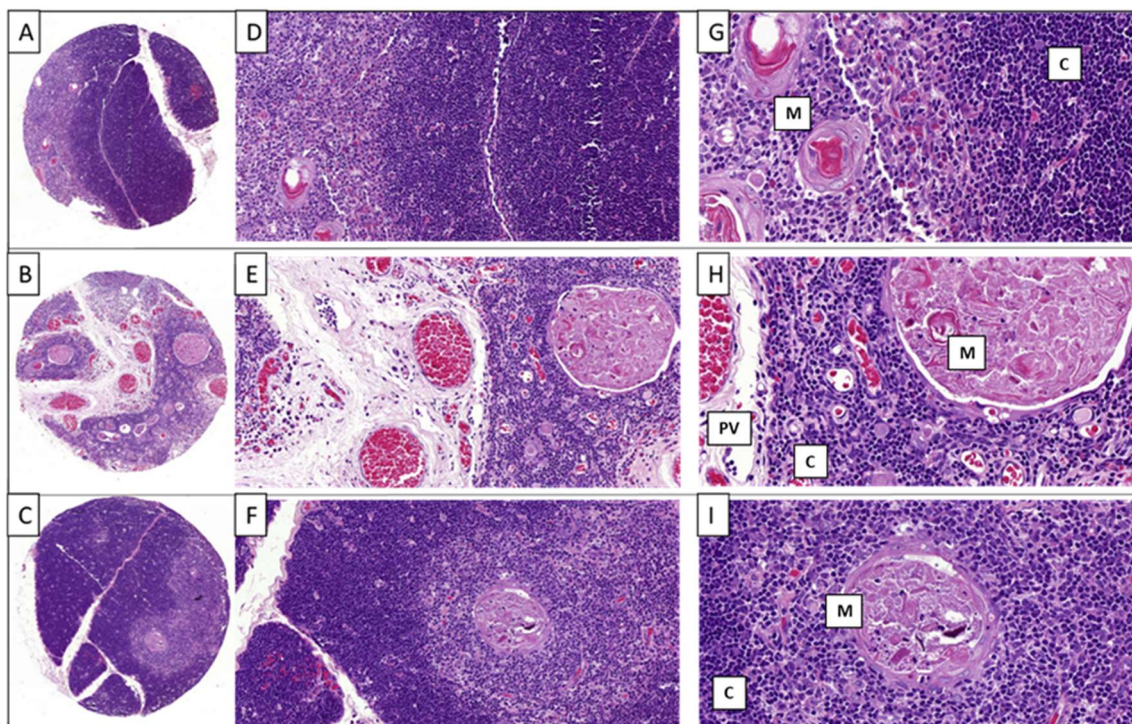


Figura 12 - Representação histológica de três amostras do grupo DS (H&E), representando as 3 áreas do lóbulo tímico: cortical (C), Medular (M) e perivascular (PV): TD002 (A – 5x; D – 20x; G – 40x) / TD006 (B – 5x; E – 20x; H – 40x) / TD016 (C – 5x; F – 20x; I – 40x)

5.2.3. Análise das subpopulações através das reações de imunohistoquímica

Para cada caso, foram obtidas 3 imagens da região medular e 3 imagens da região cortical. Totalizando, nesta primeira etapa, a análise de 3552 imagens, incluindo os 37 casos – DS e NDS (figuras 13 e 14).

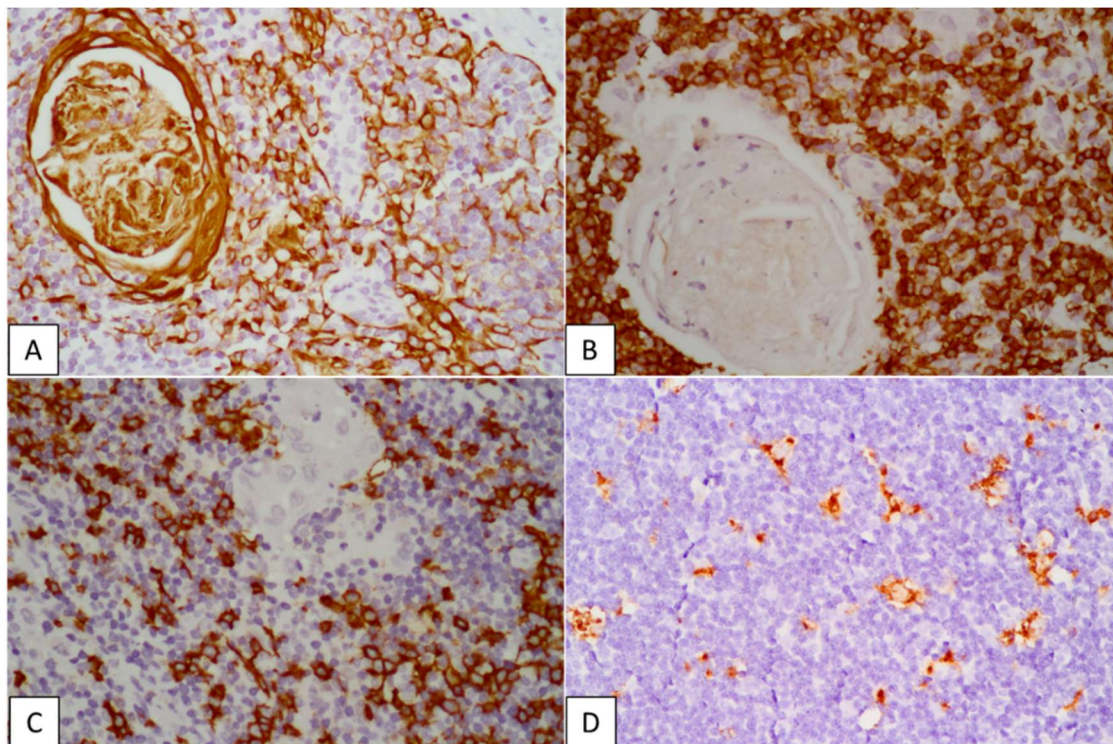


Figura 13 - Representação de reações imunoistoquímicas realizadas nos blocos de TMA do grupo NDS. A. AE1/AE3_TC001 região medular; B. CD5_TC001 região medular; C. CD20_TC015 região medular; D. CD68_TC029 região cortical. Imagens obtidas no aumento de 400x

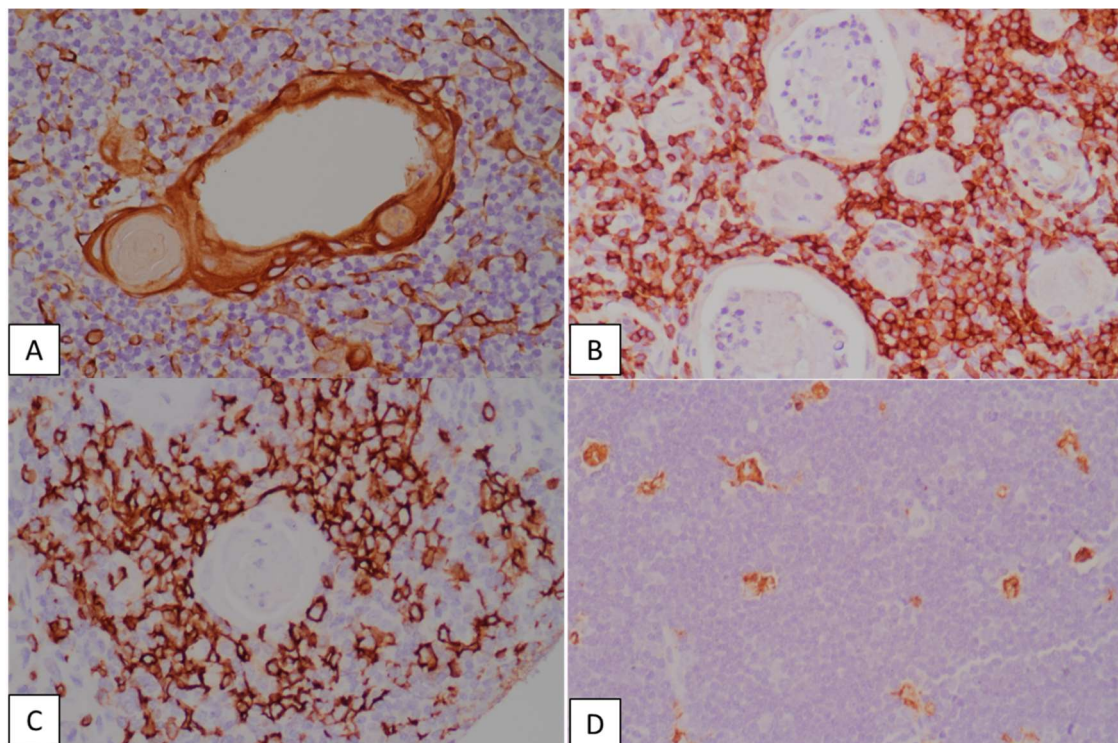


Figura 14 - Representação de reações imunoistoquímicas realizadas nos blocos de TMA do grupo DS. A. AE1/AE3_TD03 região medular; B. CD5_TD09 região medular; C. CD20_TD06 região medular; D. CD68_TC010 região cortical. Imagens obtidas no aumento de 400x

Os resultados das análises comparativas das subpopulações celulares nos grupos DS e NDS de acordo com as regiões topográficas, faixas etárias e sexo, estão apresentadas nas figuras 15 a 28 e resumidos no texto abaixo. Os valores percentuais de imunoeexpressão submetidos à análise estatísticas encontram-se nos apêndices 3 a 8. O resumo de todos os resultados destas análises encontram-se organizados nas Tabelas 6 a 8, ao final deste tópico.

5.2.4. Avaliação da população de células B

A partir da expressão de **CD20** (antígeno pan-B), foi avaliada a distribuição dos linfócitos B nas amostras de timo. Os linfócitos B foram encontrados principalmente na região da medula em ambos os grupos, e respondem por até 26,63% da população celular desta região do grupo DS (média na medula: 16,8%; média no córtex: 0,39%; $p < 0,0001$) e até 29,62% no grupo NDS (média na medula: 17,05%; média no córtex: 0,58%; $p < 0,0001$) (figura 15A). Apesar da escassa presença de células B na região do córtex, a diferença entre DS e NDS foi estatisticamente significativa ($p = 0,0014$) (figura 15A).

Apesar da população B ser encontrada em maior proporção na região medular, não foi observada diferença estatística quando comparados por subgrupos etários e por sexo nesta região entre DS e NDS (figuras 15C e 15E).

Entretanto, na região do córtex, observou-se que o grupo DS (minipuberdade e pós-minipuberdade) tem menos células B quando comparados os subgrupos equivalentes do NDS – DS (MP): 0,15% vs NDS (MP): 0,59%; $p = 0,0242$; DS (PMP): 0,31% vs NDS (PMP): 0,52%; $p = 0,026$ (figura 15B).

Nesta mesma região (córtex), os meninos DS também apresentam menos células B do que os meninos NDS – DS(M): 0,2% vs NDS(M): 0,59%; $p = 0,0003$. Não foi observada diferença estatística entre os subgrupos no sexo feminino (figura 15D).

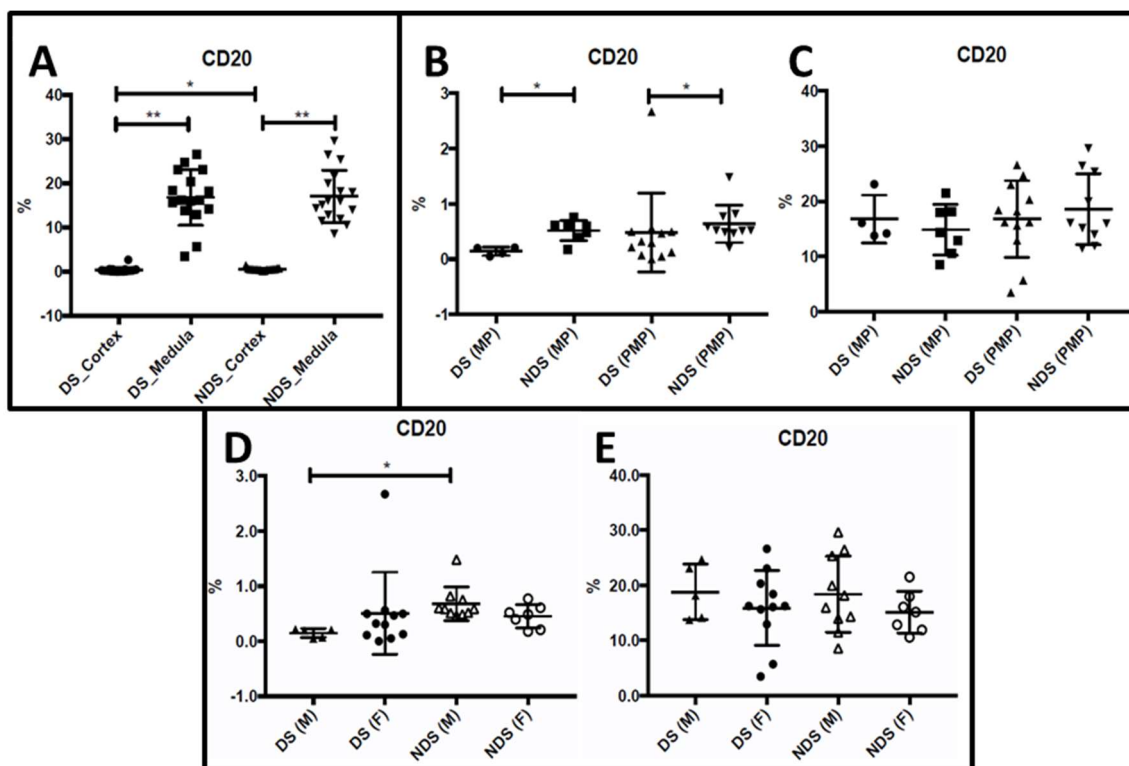


Figura 15 - Análise comparativa da expressão de CD20 entre os grupos Down (DS) e não-Down (NDS). A: em relação à distribuição topográfica (córtex x medula); B: em relação aos grupos etários no córtex; C: em relação aos subgrupos etários na medula (MP x PMP); D: subgrupos por sexo (M x F) no córtex; E: subgrupos por sexo (M x F) na medula. DS (MP): minipuberdade grupo Down (círculo preto); NDS(MP): minipuberdade grupo não-Down (quadrado preto); DS (PMP): não-minipuberdade grupo DS (triângulo para cima preto); NDS (PMP): não-minipuberdade grupo NDS (triângulo para baixo preto); DS(M): meninos Down (triângulo preto); DS(F): meninas Down (círculo preto); NDS(M): meninos não-Down (triângulo cinza); NDS(F): meninas não-Down (círculo cinza). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$

Além do CD20, também foram utilizados para avaliar a população de células B o PAX-5 (fator de transcrição crucial no processo de diferenciação de células B – figura 16A-E) e o CD23 (glicoproteína de membrana envolvida na regulação da síntese de IgE, expressa em um subgrupo de células B – figura 17A-E). Os resultados da análise destes marcadores estão apresentados nas figuras 16 (PAX5) e 17 (CD23).

Em relação ao **PAX5**, observamos diferenças estatisticamente significativas apenas na comparação topográfica entre córtex e medula em ambos os grupos, DS (média da medula: 2,82%; média do córtex: 0,06%; $p < 0,0001$) e NDS (média da medula: 2,82%; média do córtex: 0,04%; $p < 0,0001$) (figura 16A), com evidente predomínio da população B/PAX5+ na medula em relação ao córtex. A análise de ambos os grupos, DS e NDS estratificados em

subgrupos etários (minipuberdade vs pós-minipuberdade) (figura 16B e 16C) e subgrupos de sexos (masculino vs feminino) (figura 16D e 16E) não mostraram diferenças estatisticamente significantes.

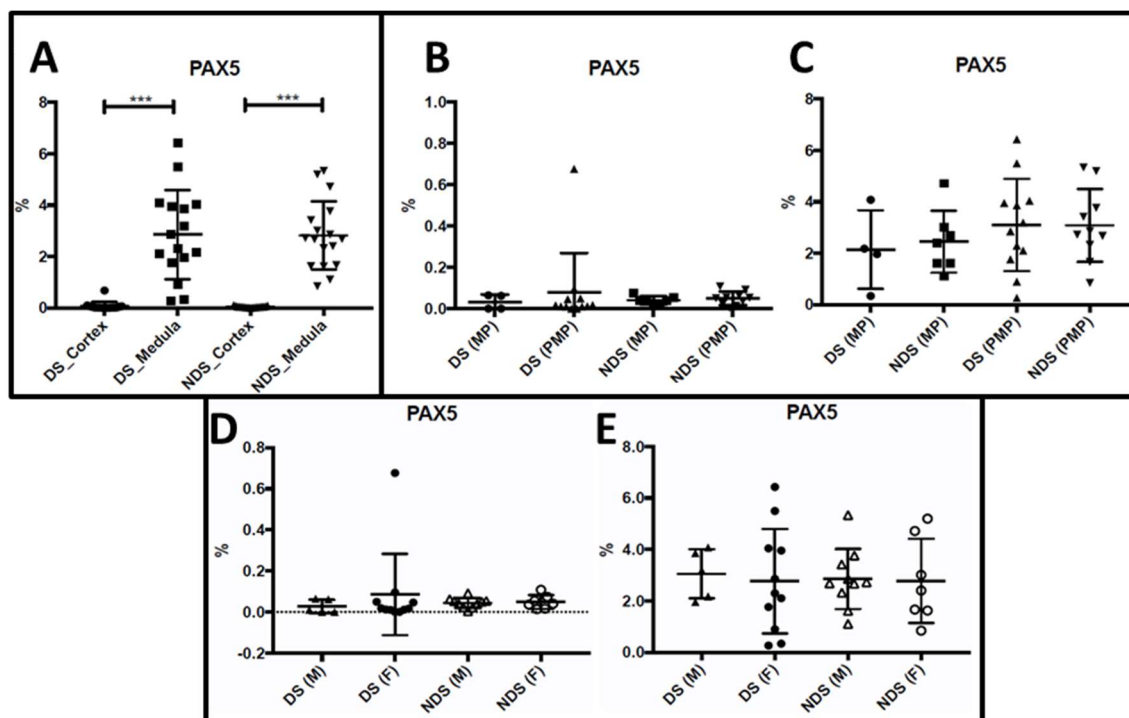


Figura 16 - Análise comparativa da expressão de PAX5 entre os grupos Down (DS) e não-Down (NDS). A: em relação à distribuição topográfica (córtex x medula); B: em relação aos grupos etários no córtex C: em relação aos subgrupos etários na medula (MP x PMP); D: subgrupos por sexo (M x F) no córtex; E: subgrupos por sexo (M x F) na medula. DS (MP): minipuberdade grupo Down (círculo preto); NDS(MP): minipuberdade grupo não-Down (quadrado preto); DS (PMP): não-minipuberdade grupo DS (triângulo para cima preto); NDS(PMP): não-minipuberdade grupo NDS (triângulo para baixo preto); DS(M): meninos Down (triângulo preto); DS(F): meninas Down (círculo preto); NDS(M): meninos não-Down (triângulo cinza); NDS(F): meninas não-Down (círculo cinza). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$

Em relação ao **CD23**, os resultados foram similares aos observados no PAX5: diferenças estatisticamente significantes apenas na comparação topográfica entre córtex e medula em ambos os grupos, DS (média da medula: 3,95%; média do córtex: 0,03%; $p < 0,0001$) e NDS (média da medula: 4,04%; média do córtex: 0,01 %; $p < 0,0002$) (figura 17A), com evidente predomínio da população B/CD23+ na medula em relação ao córtex. A análise de ambos os grupos, DS e NDS estratificados em subgrupos etários (minipuberdade vs pós-minipuberdade) (figuras 17B e C) e subgrupos de sexos (masculino vs feminino) (figura 17D e 17E) não mostraram diferenças estatisticamente significantes.

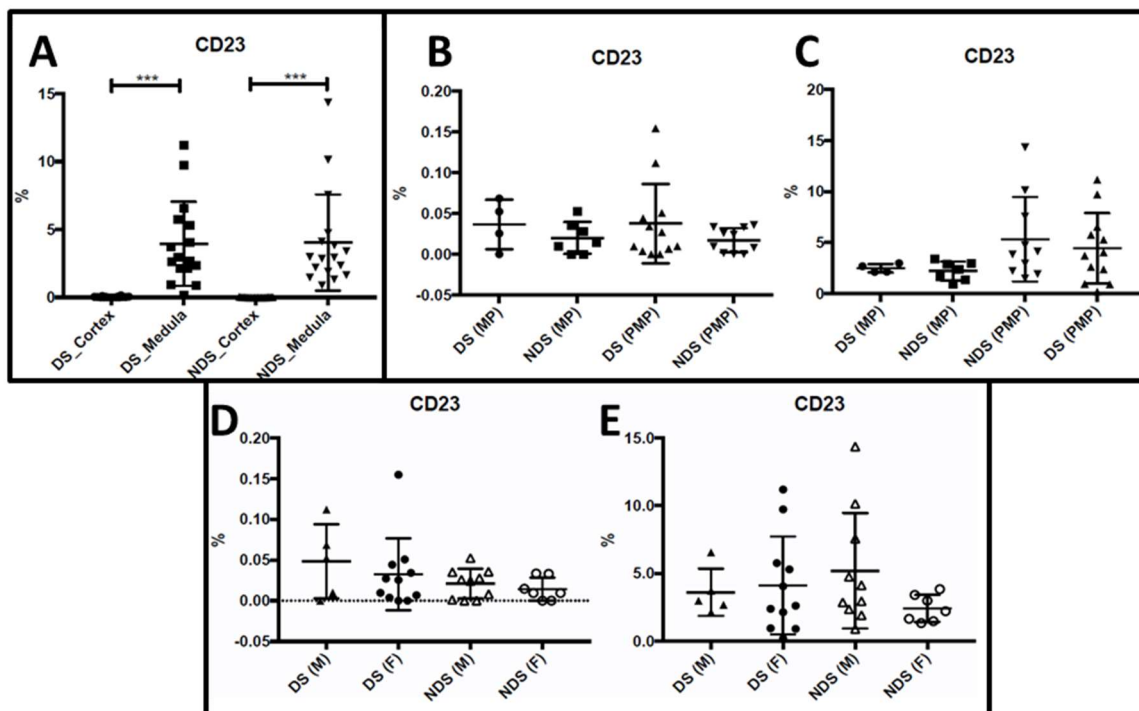


Figura 17 - Análise comparativa da expressão de CD23 entre os grupos Down (DS) e não-Down (NDS). A: em relação à distribuição topográfica (córtex x medula); B: em relação aos grupos etários no córtex C: em relação aos subgrupos etários na medula (MP x PMP); D: subgrupos por sexo (M x F) no córtex; E: subgrupos por sexo (M x F) na medula. DS (MP): minipuberdade grupo Down (círculo preto); NDS(MP): minipuberdade grupo não-Down (quadrado preto); DS (PMP): não-minipuberdade grupo DS (triângulo para cima preto); NDS(PMP): não-minipuberdade grupo NDS (triângulo para baixo preto); DS (M): meninos Down (triângulo preto); DS(F): meninas Down (círculo preto); NDS(M): meninos não-Down (triângulo cinza); NDS(F): meninas não-Down (círculo cinza). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$

Em resumo:

- As células B (CD20+, PAX+ e CD23+) predominam na medula em relação ao córtex em todas as análises avaliadas.
- O grupo com DS mostrou redução no contingente de células B-CD20+ do córtex, em relação ao grupo NDS. Esta diferença se mantém ao longo das duas faixas etárias.
- Quando estratificados por sexo, essa diferença foi observada apenas no sexo masculino.

5.2.5. Avaliação da população de células T

Para análise desta população, foram utilizados os seguintes marcadores: CD5, CD2, CD4, CD8, FOXP3 e CD1a. Os resultados da análise do **CD5** (pan-T) estão apresentados na figura 18.

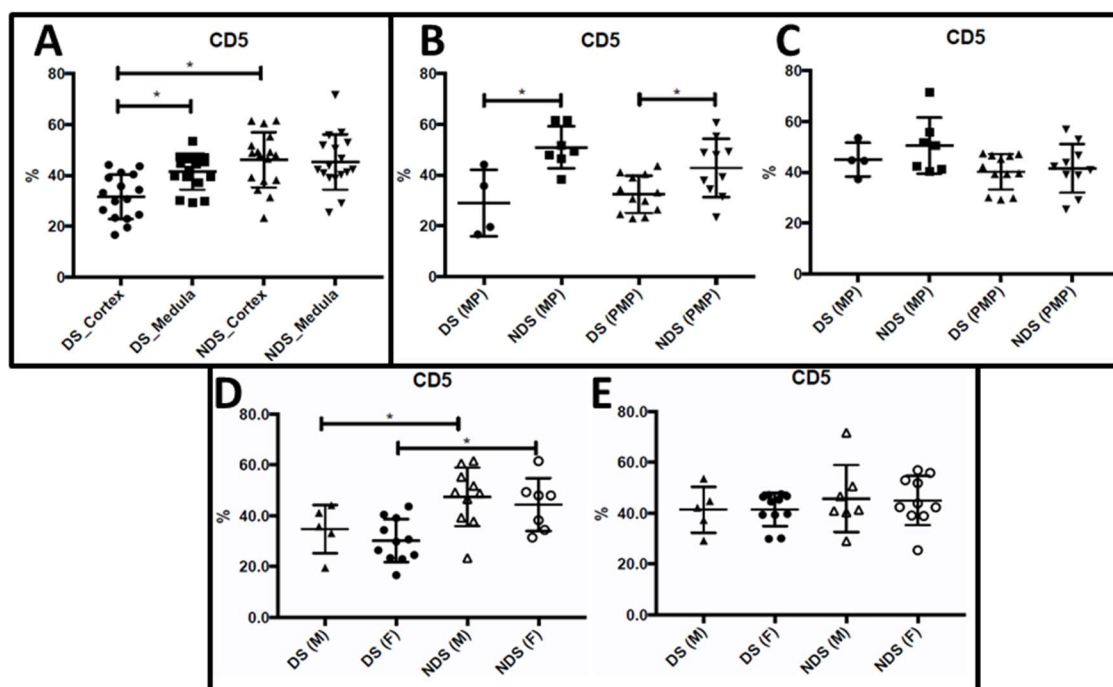


Figura 18 - Análise comparativa da expressão de CD5 entre os grupos Down (DS) e não-Down (NDS). A: em relação à distribuição topográfica (córtex x medula); B: em relação aos grupos etários no córtex; C: em relação aos subgrupos etários na medula (MP x PMP); D: subgrupos por sexo (M x F) no córtex; E: subgrupos por sexo (M x F) na medula. DS (MP): minimipuberdade grupo Down (círculo preto); NDS(MP): minimipuberdade grupo não-Down (quadrado preto); DS (PMP): não-minipuberdade grupo DS (triângulo para cima preto); NDS(PMP): não-minipuberdade grupo NDS (triângulo para abaixo preto); DS(M): meninos Down (triângulo preto); DS(F): meninas Down (círculo preto); NDS(M): meninos não-Down (triângulo cinza); NDS(F): meninas não-Down (círculo cinza). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$

A análise comparativa da distribuição topográfica de linfócitos T-CD5+ entre as regiões medular e cortical do timo mostrou diferença apenas no grupo DS, com maior expressão na região da medula em relação ao córtex ($p=0,0015$). Quando comparados córtex e medula entre os grupos DS e NDS, o grupo DS apresentou menor número de células T CD5+ (média: 31,94%) do que o grupo NDS no córtex (média: 47,96%; $p=0,0003$) (figura 18A). Esta diferença se mantém em topografia de córtex ao analisar, separadamente, os subgrupos etários (minipuberdade DSxNDS ($p=0,0121$); pós-minipuberdade DSxNDS, ($p=0,030$) (figura 18B) e subgrupos de sexo: meninos DSxNDS, ($p=0,04$); meninas DSxNDS ($p=0,0083$) (figura 18D).

Em resumo:

- No grupo DS, o contingente de linfócitos TCD5+ foi maior na medula do que no córtex, sendo que no grupo NDS esse contingente foi similar em

córtex e medula.

- O grupo de pacientes portadores de DS apresentou depleção de células T CD5+ no córtex quando comparado ao grupo NDS. Esta diferença se mantém após estratificação por idade e sexo.
- Essa diferença não foi observada na região medular em nenhuma das análises comparativas realizadas (figuras 18A, 18C e 18E).

Os resultados da análise do **CD2** (pan-T) estão apresentados na figura 20.

A análise topográfica comparativa da expressão de CD2 entre as regiões cortical e medular do timo mostrou diferença em ambos os grupos, com um maior contingente de células T CD2+ no córtex, tanto no grupo DS (média medula: 50,04% x média córtex: 64,59%; $p < 0,0001$) quanto no grupo NDS (média medula: 47,42% x média córtex: 63,73%; $p < 0,0001$) (figura 19A).

Em relação à expressão de CD2 no córtex, não foi encontrada diferença estatística comparando-se os grupos DS x NDS, nem seus subgrupos (figura 19A, B e D). A única diferença observada foi na análise comparativa da expressão deste marcador na região da medula do subgrupo sexo feminino (DSxNDS – figura 19E). Onde as meninas portadoras de síndrome de Down apresentam maior expressão de CD2 na medula (média: 53,69%), do que as meninas não portadoras (média: 46,04%; $p = 0,0258$).

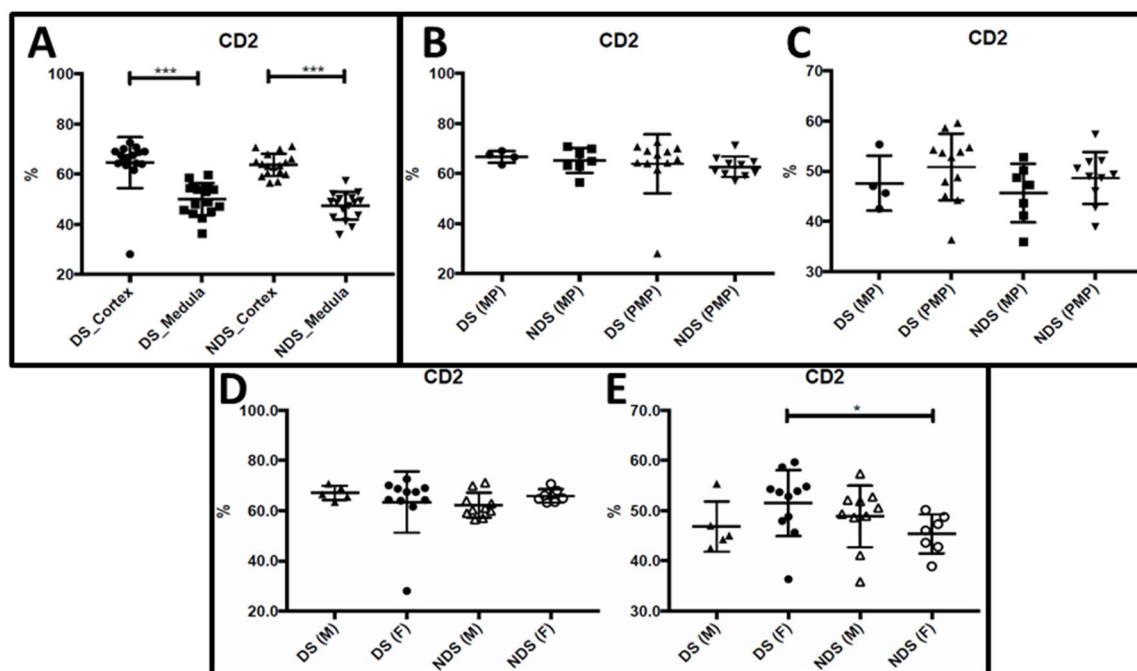


Figura 19 - Análise comparativa da expressão de CD2 entre os grupos Down (DS) e não-Down (NDS). A: em relação à distribuição topográfica (cortex x medula); B: em relação aos grupos etários no cortex; C: em relação aos subgrupos etários na medula (MP x NMP); D: subgrupos por sexo (M x F) no cortex; E: subgrupos por sexo (M x F) na medula. DS (MP): minimipuberdade grupo Down (círculo preto); NDS(MP): minimipuberdade grupo não-Down (quadrado preto); DS (PMP): não-minimipuberdade grupo DS (triângulo para cima preto); NDS(PMP): não-minimipuberdade grupo NDS (triângulo para baixo preto); DS(M): meninos Down (triângulo preto); DS(F): meninas Down (círculo preto); NDS(M): meninos não-Down (triângulo cinza); NDS(F): meninas não-Down (círculo cinza). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$

Em resumo:

- A população de linfócitos T-CD2+ apresentou resultado inverso ao CD5, com maior contingente de linfócitos na área cortical do que na medular em ambos os grupos de pacientes, DS e NDS, sem diferença significativa entre eles.
- Os grupos DS e NDS não diferem em relação ao contingente de células CD2+ em ambas as regiões do timo ao longo das duas faixas etárias.
- Na medula, a população de linfócitos T CD2+ é maior no grupo DS do que no grupo NDS, apenas no sexo feminino, quando estratificados por sexo.

A análise comparativa da expressão de **CD4** entre as regiões medular e cortical do timo mostrou tendência de maior expressão na região do cortex, tanto no grupo DS quanto no grupo NDS, porém sem significância estatística (figura 20A). Não foi observada diferença na expressão deste marcador quando

comparados os grupos DS vs NDS em nenhuma topografia (córte x medula - figura 20A).

Quando estratificados por idade, o subgrupo NDS (PMP) apresentou maior expressão de CD4 na região da medula (média: 22,76%) quando comparado com o mesmo subgrupo etário DS (média: 16,21%; $p=0,0358$ - figura 20C). Não foram observadas diferenças entre DS e NDS no subgrupo MP, nem nas análises por sexo, entre meninos e meninas.

Entretanto, observamos que em topografia de córtex do grupo NDS, os meninos apresentam maior expressão de CD4 (média: 27,37%) do que as meninas (média: 23,32%) deste mesmo grupo ($p=0,0431$) (figura 20D).

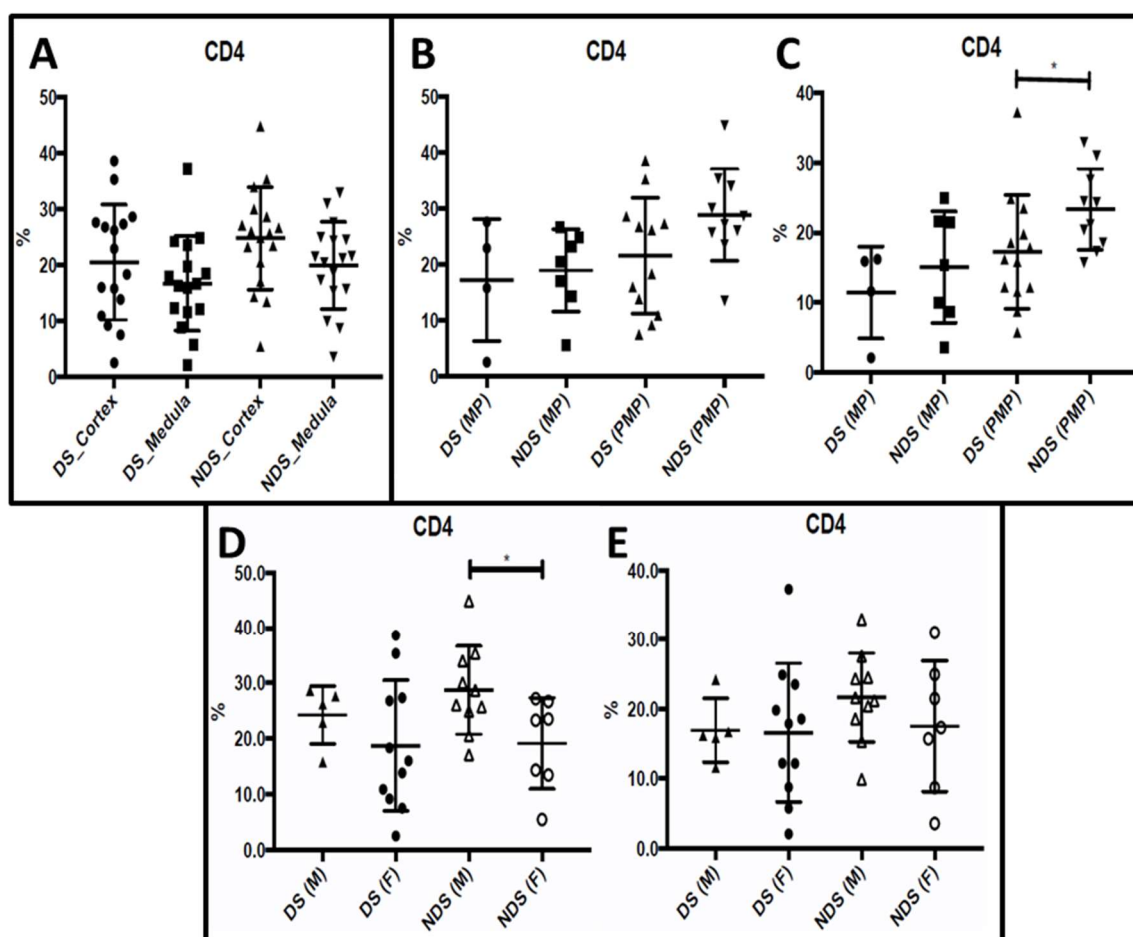
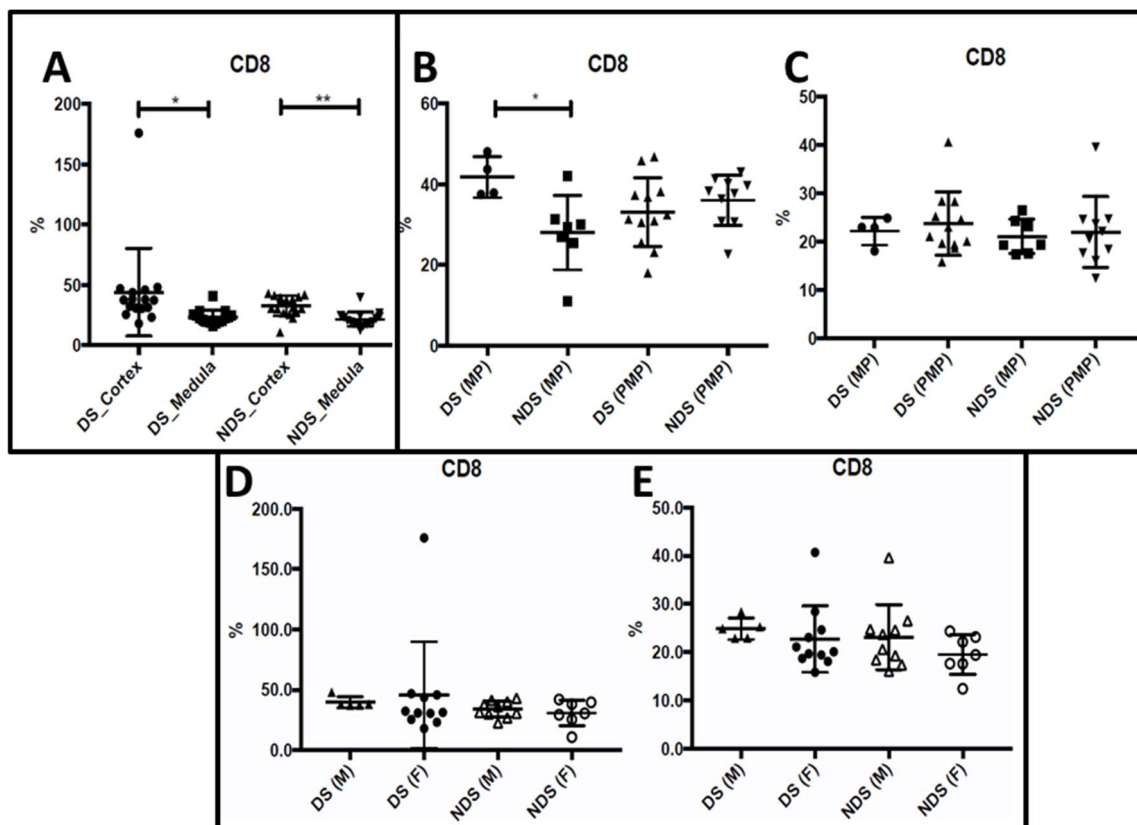


Figura 20 - Análise comparativa da expressão de CD4 entre os grupos Down (DS) e não-Down (NDS). A: em relação à distribuição topográfica (córte x medula); B: em relação aos grupos etários no córtex C: em relação aos subgrupos etários na medula (MP x PMP); D: subgrupos por sexo (M x F) no córtex; E: subgrupos por sexo (M x F) na medula. DS (MP): minipuberdade grupo Down (círculo preto); NDS(MP): minipuberdade grupo não-Down (quadrado preto); DS (PMP): não-minipuberdade grupo DS (triângulo para cima preto); NDS(PMP): não-minipuberdade grupo NDS (triângulo para abaixo preto); DS(M): meninos Down (triângulo preto); DS(F): meninas Down (círculo preto); NDS(M): meninos não-Down (triângulo cinza); NDS(F): meninas não-Down (círculo cinza). * $p<0,05$; ** $p<0,005$; *** $p<0,0001$

Já a análise comparativa da expressão de **CD8** entre as regiões medular e cortical do timo mostrou maior expressão deste marcador na região do córtex, tanto no grupo DS (média córtex: 43,98% x média medula: 23,39%; $p=0,0393$) quanto no grupo NDS (média córtex: 32,79% x média medula: 21,64%; $p=0,0001$) (figura 21A).

Na avaliação por subgrupos etários, a análise da expressão de **CD8** mostrou maior expressão em região do córtex no subgrupo DS(MP) em relação ao NDS(MP) (média DS: 40,8% vs média NDS: 29,36%; $p=0,0242$ – figura 21B). Na região da medula não foi evidenciada diferença entre os grupos (figura 21C).

No critério da diferença de expressão entre os sexos masculino e feminino, não foram observadas diferenças em nenhuma topografia quando comparados os grupos NDS e DS (figura 21D-E).



Em resumo:

- A análise comparativa da expressão de **CD4** entre as regiões medular e cortical do timo mostrou tendência de maior expressão na região do córtex, tanto no grupo DS quanto no grupo NDS, porém sem significância estatística.
- Não foi observada diferença na expressão de CD4 entre as regiões cortical e medular na análise comparativa entre os grupos DS e NDS.
- Quando estratificados pela idade, o grupo DS mostrou menor contingente de células CD4+ do que o grupo NDS na região da medula, na faixa etária tardia (PMP).
- Quando estratificados por sexo, o sexo masculino mostrou maior contingente de células CD4+ na região do córtex do que o sexo feminino, no subgrupo NDS apenas.
- A análise comparativa da expressão de **CD8** entre as regiões medular e cortical do timo mostrou maior expressão na região do córtex, tanto no grupo DS quanto no grupo NDS.
- E maior expressão de células TCD8+ no subgrupo etário DS (MP) em relação ao mesmo subgrupo NDS na região do córtex.
- Não foram observadas diferenças entre DS e NDS nas análises por sexo deste marcador.

A análise da distribuição das células com expressão de **Foxp3** (marcador de célula T regulatória), mostrou que elas se concentram, essencialmente na região da medula, em ambos os grupos estudados (DS: média medula: 4,22% x média córtex: 0,31%; e NDS: média medula: 2,74% x média córtex: 0,13%; $p < 0,0001$). Além disso, foi observado que o grupo DS apresenta maior expressão deste marcador em região da medula do que o grupo NDS ($p = 0,0132$) (figura 22A).

Nos subgrupos etários também o subgrupo DS mantém maior expressão de Foxp3 na região medular do que com o subgrupo NDS, que se manifesta mais tardiamente, no grupo PMP ($p = 0,0019$) (figura 22C). Não houve diferença na expressão deste marcador em córtex na comparação etária (figura 22B), nem nas análises referentes aos subgrupos masculino e feminino (figuras 22D e 22E).

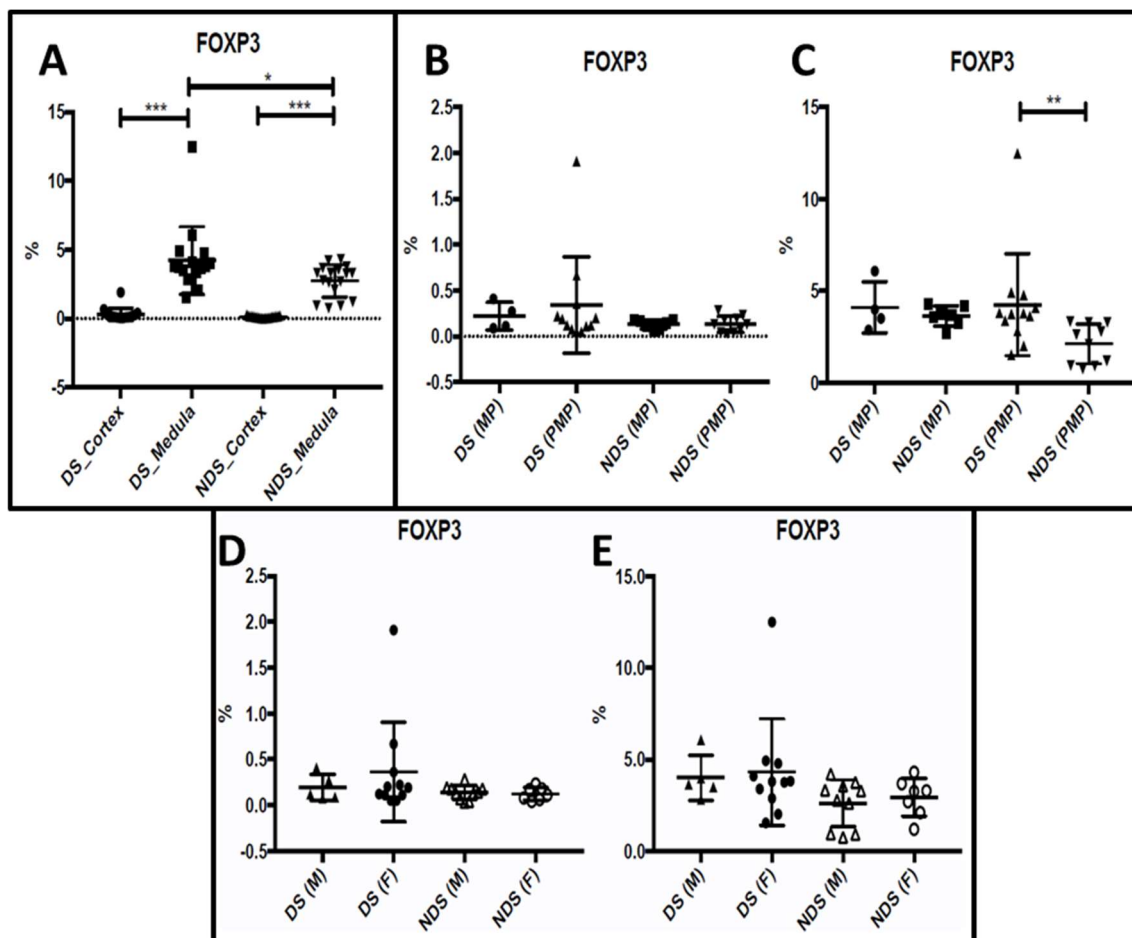


Figura 22 - Análise comparativa da expressão de FoxP3 entre os grupos Down (DS) e não-Down (NDS). A: em relação à distribuição topográfica (córte x medula); B: em relação aos grupos etários no córtex C: em relação aos subgrupos etários na medula (MP x PMP); D: subgrupos por sexo (M x F) no córtex; E: subgrupos por sexo (M x F) na medula. DS (MP): manipuberdade grupo Down (círculo preto); NDS(MP): manipuberdade grupo não-Down (quadrado preto); DS (PMP): não-manipuberdade grupo DS (triângulo para cima preto); NDS(PMP): não-manipuberdade grupo NDS (triângulo para abaixo preto); DS (M): meninos Down (triângulo preto); DS(F): meninas Down (círculo preto); NDS(M): meninos não-Down (triângulo cinza); NDS(F): meninas não-Down (círculo cinza). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$

Em relação à expressão de **CD1a** (precursor T), observou-se que há uma maior expressão na região do córtex do que na região da medula tanto no grupo DS (média córtex: 33,76% x média medula: 12,35%) quanto no grupo NDS (média córtex: 29,76% x média medula: 13,23%; $p < 0,0001$) (figura 23A).

A avaliação da expressão de CD1a na região do córtex evidenciou maior expressão nos DS em relação ao NDS em dois subgrupos: MP (média DS: 40,33% vs média NDS: 27,23%; $p = 0,0242$) (figura 23B) e meninos (média DS: 37,46% vs média NDS: 28,56%; $p = 0,0047$) (figura 23D). Nos subgrupos PMP e meninas, na mesma topografia (córte x medula), não foram observadas diferenças

significantes. A análise da região medular não mostrou diferença entre os subgrupos etário e sexo (figuras 23C e 23E).

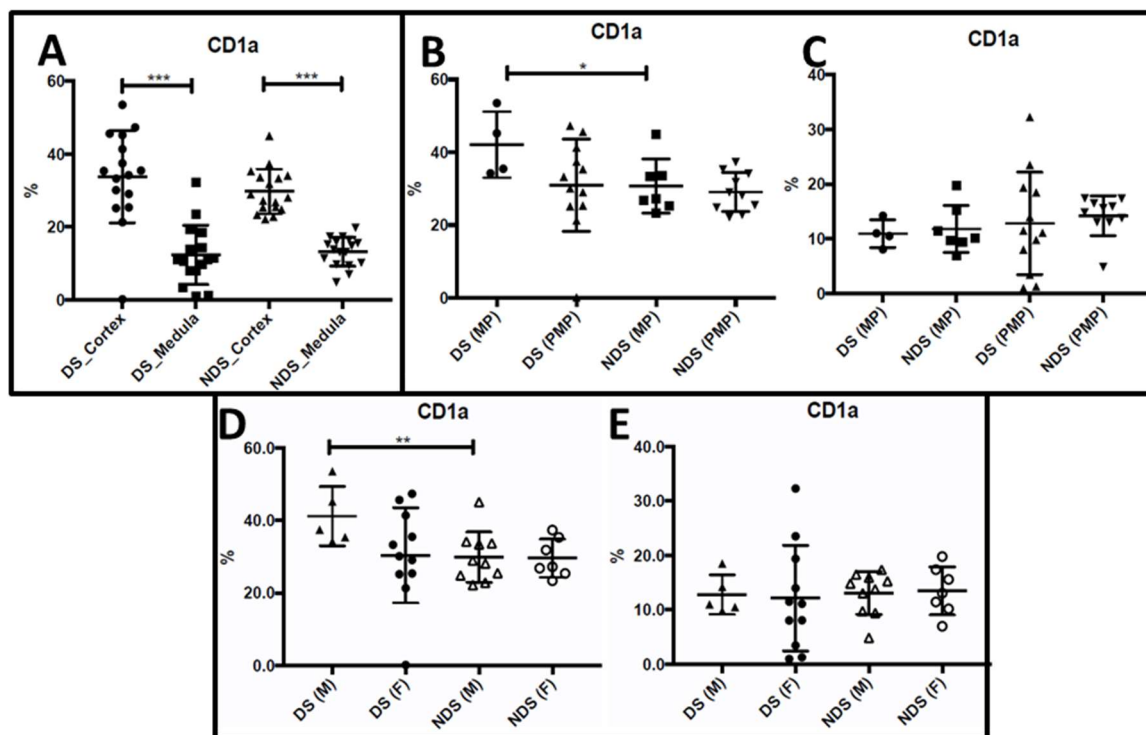


Figura 23 - Análise comparativa da expressão de CD1a entre os grupos Down (DS) e não-Down (NDS). A: em relação à distribuição topográfica (córtex x medula); B: em relação aos grupos etários no córtex C: em relação aos subgrupos etários na medula (MP x PMP); D: subgrupos por sexo (M x F) no córtex; E: subgrupos por sexo (M x F) na medula. DS (MP): manipuberdade grupo Down (círculo preto); NDS(MP): manipuberdade grupo não-Down (quadrado preto); DS (PMP): não-manipuberdade grupo DS (triângulo para cima preto); NDS(PMP): não-manipuberdade grupo NDS (triângulo para baixo preto); DS (M): meninos Down (triângulo preto); DS(F): meninas Down (círculo preto); NDS(M): meninos não-Down (triângulo cinza); NDS(F): meninas não-Down (círculo cinza). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$

5.2.6. Avaliação da população de células NK (CD56)

A análise do CD56 mostrou maior expressão na região da medula em relação ao córtex nos dois grupos (DS: média medula: 3,50% x média córtex: 1,31%; $p = 0,0005$ e NDS: média medula: 0,98% x média córtex: 0,35%; $p = 0,0001$). O grupo DS apresentou maior expressão deste marcador nas duas topografias, quando comparado com o grupo NDS (córtex DS x NDS, $p = 0,0453$ e medula DS x NDS, $p < 0,0001$) (figura 24A).

Estas diferenças se mantêm na comparação dos grupos etários: tanto o DS(MP) quanto o DS(PMP) apresentaram maior expressão de CD56 do que os mesmos subgrupos NDS na região medular (medula MP DSxNDS, $p = 0,0061$).

Medula PMP DSxNDS, $p < 0,0001$ – figura 24C). Essa maior expressão também foi observada na região do córtex do subgrupo PMP DS ($p = 0,0047$ – figura 24B). Essa diferença não foi observada nesta mesma topografia do subgrupo MP (figura 24B).

Quando analisados os subgrupos por sexo, tanto os meninos ($p = 0,0007$) quanto as meninas ($p = 0,0008$) DS apresentaram maior expressão deste marcador em topografia de medula (figura 24E). Não foi observada diferença entre os sexos (meninos vs meninas) em topografia de córtex e medula (figura 24D e E).

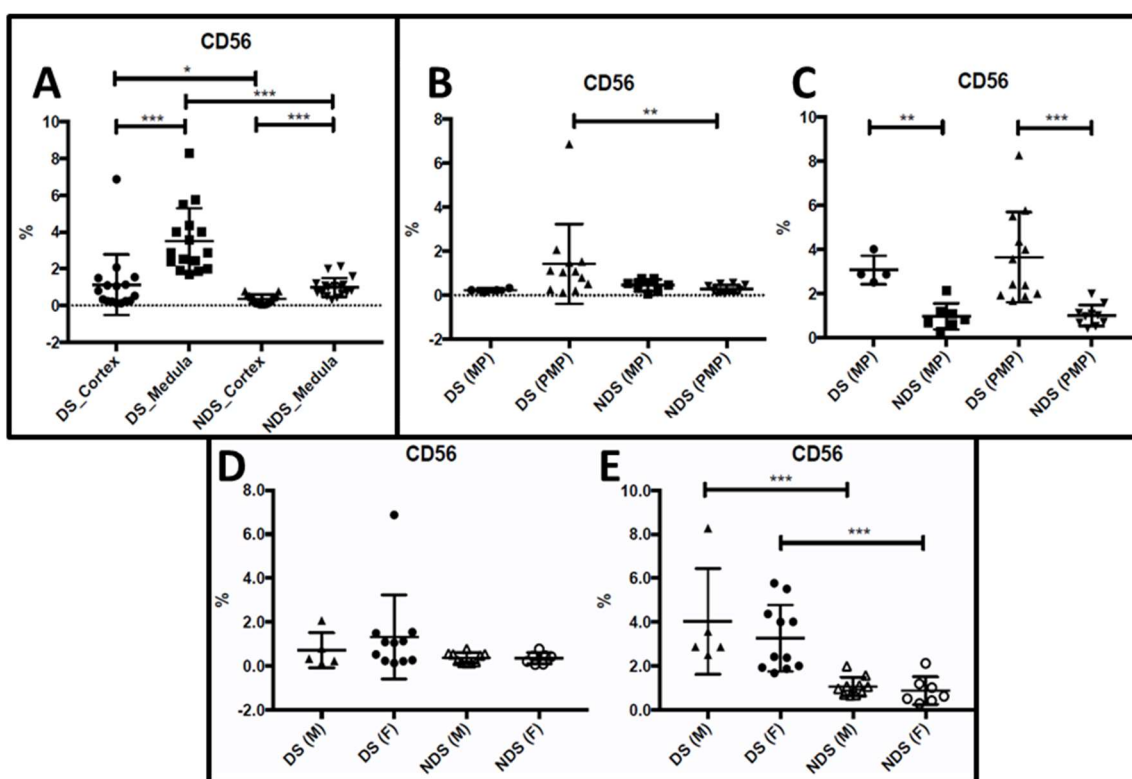


Figura 24 - Análise comparativa da expressão de CD56 entre os grupos Down (DS) e não-Down (NDS). A: em relação à distribuição topográfica (córtex x medula); B: em relação aos grupos etários no córtex C: em relação aos subgrupos etários na medula (MP x PMP); D: subgrupos por sexo (M x F) no córtex; E: subgrupos por sexo (M x F) na medula. DS (MP): minipuberdade grupo Down (círculo preto); NDS (MP): minipuberdade grupo não-Down (quadrado preto); DS (PMP): não-minipuberdade grupo DS (triângulo para cima preto); NDS(PMP): não-minipuberdade grupo NDS (triângulo para baixo preto); DS (M): meninos Down (triângulo preto); DS(F): meninas Down (círculo preto); NDS(M): meninos não-Down (triângulo cinza); NDS(F): meninas não-Down (círculo cinza). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$

Em resumo:

- As células T regulatórias, que expressam **Foxp3**, estão presentes, essencialmente em região medular em ambos os grupos (DS e NDS).

- O grupo DS apresenta maior expressão deste marcador na medula quando comparado ao grupo NDS.
- Esta diferença se manifesta mais tardiamente quando estratificados por faixa etária, no subgrupo não PMP (região medular).
- Em relação à expressão de **CD1a** (precursor T), observou-se que há uma maior expressão na região do córtex do que na região da medula tanto no grupo DS quanto no grupo NDS.
- Não foi observada diferença quanto a essa população, na análise global em ambas as regiões, entre os grupos DS e NDS.
- Os subgrupos minipuberdade DS e meninos DS apresentaram maior contingente de células CD1a positivas no córtex quando comparados aos mesmos subgrupos NDS.
- Já as células NK, aqui identificadas pela expressão de CD56, concentra-se em região da medula em ambos os grupos (DS e NDS).
- Nas duas topografias o grupo DS apresenta maior expressão que o NDS, especialmente na medula.
- Essa diferença se repete na medula dos subgrupos etários (MP e PMP) e no córtex do subgrupo PMP.
- A avaliação por sexo também mantém esta diferença (DS>NDS): tanto meninos quanto meninas DS apresentam maior expressão de células CD56 positivas na medula, quando comparadas com os mesmos subgrupos NDS. Entretanto, não é observada diferença entre meninos e meninas em ambas as regiões.

5.2.7. Avaliação das células que compõem o microambiente tímico

5.2.7.1. Células epiteliais (AE1/AE3)

A análise comparativa entre as regiões do córtex e medula em ambos os grupos (DS e NDS) mostrou maior expressão de citoqueratina na região da medula, quando comparada ao córtex (DS: média medula: 28,87% x média córtex: 19,36%; $p=0,0011$; NDS: média medula: 28,1% x média córtex: 12,01% $p<0,0001$). Além disso, também foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as regiões do córtex, onde o grupo DS apresenta maior

expressão de AE1/AE3 (19,36%) do que o grupo NDS (12,01%) ($p=0,0087$). Ambos os grupos atingiram uma média de expressão de quase 30% na região da medula (figura 25A).

Quando avaliado os subgrupos etários, o subgrupo DS(PMP) apresentou maior expressão que o NDS(PMP) na região do córtex (21,31% vs 9,89%; $p=0,0026$). O subgrupo MP não apresentou diferença nessa topografia (figura 25B). Em nenhum subgrupo etário foi observada diferença na região da medula (figura 25C).

Já em relação à análise por sexo, as meninas DS apresentaram maior expressão na região do córtex do que as meninas NDS (21,08% vs 10,89%; $p=0,0268$ – figura 25D). Essa diferença não foi observada na região da medula (figura 25E). Os meninos não apresentaram diferença em nenhuma das topografias (figuras 25D e E).

Em resumo:

- O contingente de células epiteliais AE1/AE3+ foi maior na medula em ambos os grupos, DS e NDS.
- O contingente de células epiteliais AE1/AE3+ foi maior na região do córtex no grupo DS quando comparado ao grupo NDS.
- Essa diferença só se manifesta mais tardiamente, no grupo etário PMP, e no sexo feminino (em topografia de córtex).
- Não foi encontrada diferença no contingente de células epiteliais AE1/AE3+ na medula em nenhum dos subgrupos avaliados (idade e sexo).

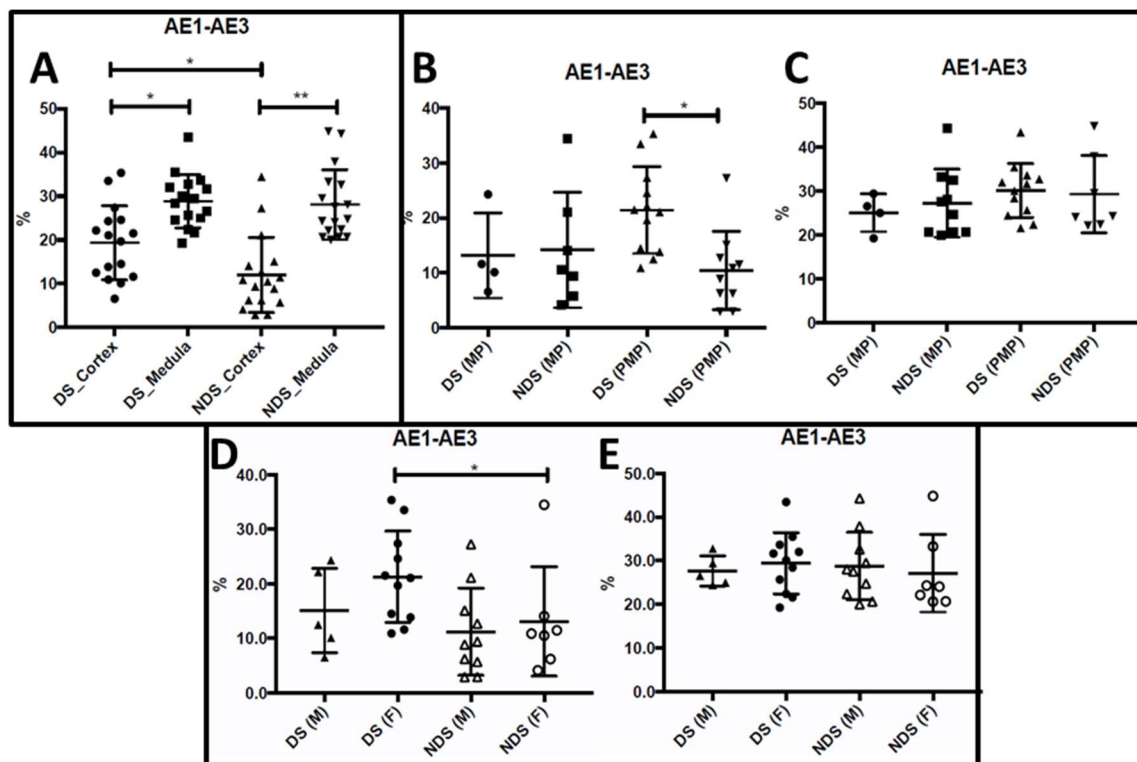


Figura 25 - Análise comparativa da expressão de AE1/AE3 entre os grupos Down (DS) e não-Down (NDS). A: em relação à distribuição topográfica (córtex x medula); B: em relação aos grupos etários no córtex C: em relação aos subgrupos etários na medula (MP x PMP); D: subgrupos por sexo (M x F) no córtex; E: subgrupos por sexo (M x F) na medula. DS(MP):minipuberdade grupo Down (círculo preto); NDS (MP): minipuberdade grupo não-Down (quadrado preto); DS (PMP): não-minipuberdade grupo DS (triângulo para cima preto); NDS(PMP): não-minipuberdade grupo NDS (triângulo para baixo preto); DS (M): meninos Down (triângulo preto); DS(F): meninas Down (círculo preto); NDS(M): meninos não-Down (triângulo cinza); NDS(F): meninas não-Down (círculo cinza). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$

5.2.7.2. Macrófagos (CD68 e CD163)

A análise do **CD68** não mostrou diferença na expressão entre as topografias (córtex x medula). Entretanto, o grupo DS apresentou maior expressão nas duas topografias, quando comparado com o grupo NDS (córtex DSxNDS: 1,22% vs 0,29%; e medula DSxNDS: 1,18% vs 0,1%; $p < 0,0001$ – figura 26A).

Estas diferenças se mantêm na comparação dos grupos etários: tanto o DS(MP) quanto o DS(PMP) apresentaram maior expressão de CD68 do que os mesmos subgrupos NDS nas duas topografias (córtex MP DSxNDS: 0,95% vs 0,29%; $p = 0,0364$; córtex PMP DSxNDS: 1,38% vs 0,26%; $p < 0,0001$; medula MP DSxNDS: 0,7% vs 0,1%; $p = 0,0424$; medula PMP DSxNDS: 1,7% vs 0,09%; $p < 0,0001$) (figuras 26B e C).

As análises dos subgrupos por sexo também mantêm essas diferenças: tanto os meninos quanto as meninas do grupo DS apresentaram maior expressão de CD68 nas duas topografias, do que os mesmos subgrupos NDS (córtex meninos DSxNDS: 1,14% vs 0,25%; $p=0,0043$; córtex meninas DSxNDS: 1,3% vs 0,29%; $p=0,0003$; medula meninos DSxNDS: 1,12% vs 0,10%; $p=0,0023$; medula meninas DSxNDS: 1,24% vs 0,08%; $p<0,0001$) (figura 26D e E).

Além do CD68, também foi avaliada a expressão de **CD163** para macrófagos. Diferente da expressão do CD68, a análise do CD163 mostrou maior expressão no córtex quando comparado a medula nos dois grupos (DS: média córtex: 5,06% x média medula: 2,29%; $p<0,0001$; NDS: média córtex: 4,70% x média medula: 3,43%; $p=0,0028$ – figura 27A). Além disso, observamos que a região da medula do grupo DS apresenta menos células CD163+ do que a mesma topografia do grupo NDS (medula DSxNDS: $p=0,0037$ – figura 27A). O inverso do que foi observado em reação do CD68 (figura 26A).

O grupo DS também apresentou menor expressão deste marcador na região da medula no subgrupo etário MP DSxNDS (1,78% vs 4,27%; $p=0,0061$) (figura 27C) e no subgrupo dos meninos DSxNDS (2,09% vs 3,2%; $p=0,028$) (figura 27E). As comparações dos subgrupos em topografia de córtex não mostraram diferença estatisticamente significativa na expressão de CD163 (figuras 27B e D).

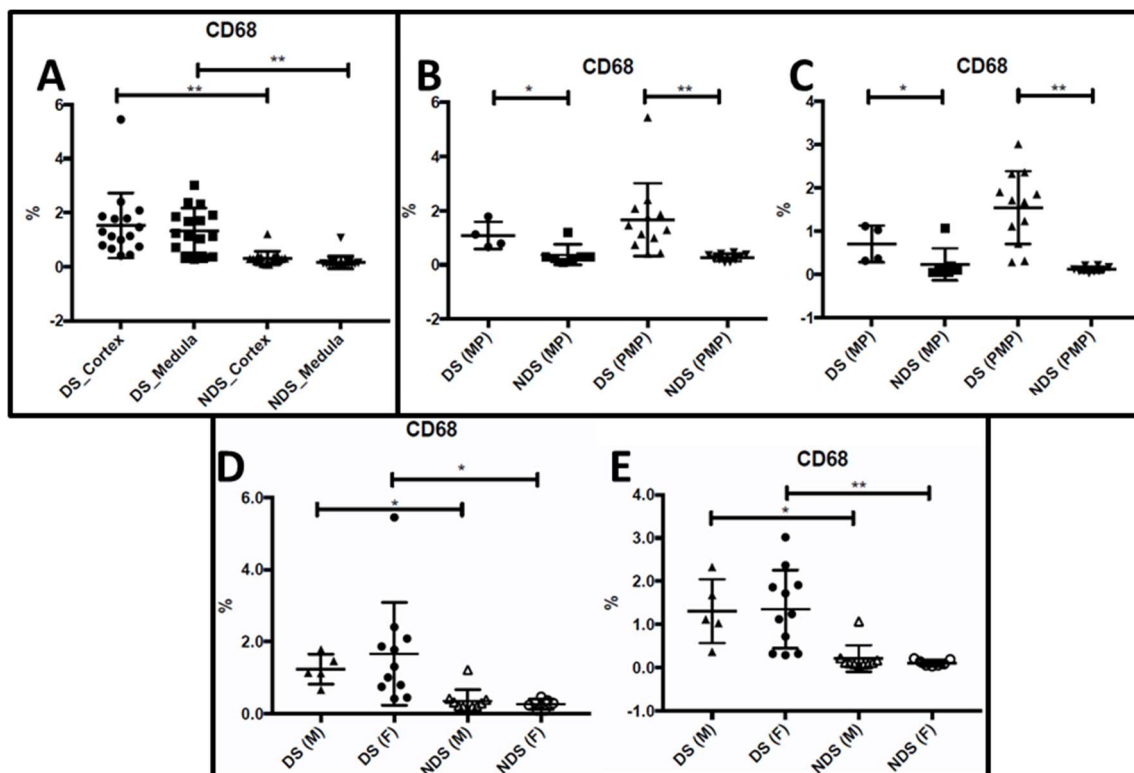


Figura 26 - Análise comparativa da expressão de CD68 entre os grupos Down (DS) e não-Down (NDS). A: em relação à distribuição topográfica (córtex x medula); B: em relação aos grupos etários no córtex C: em relação aos subgrupos etários na medula (MP x PMP); D: subgrupos por sexo (M x F) no córtex; E: subgrupos por sexo (M x F) na medula. DS (MP): minipuberdade grupo Down (círculo preto); NDS(MP): minipuberdade grupo não-Down (quadrado preto); DS (PMP): não-minipuberdade grupo DS (triângulo para cima preto); NDS(PMP): não-minipuberdade grupo NDS (triângulo para baixo preto); DS(M): meninos Down (triângulo preto); DS(F): meninas Down (círculo preto); NDS(M): meninos não-Down (triângulo cinza); NDS(F): meninas não-Down (círculo cinza). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$

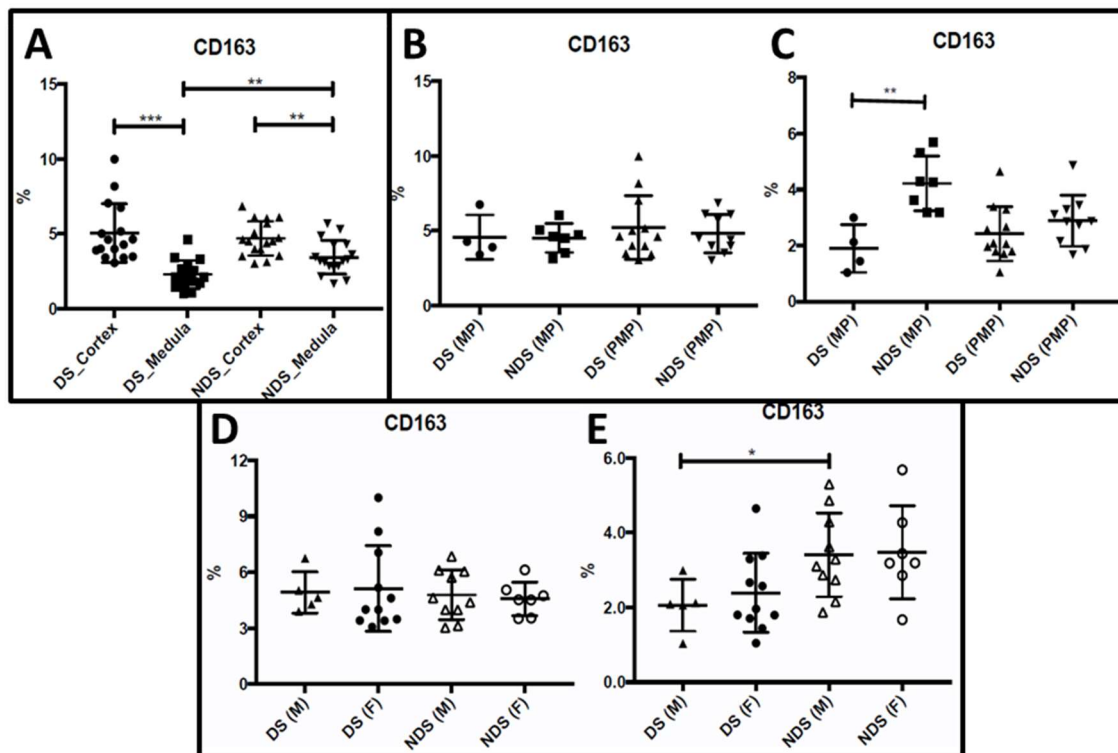


Figura 27 - Análise comparativa da expressão de CD163 entre os grupos Down (DS) e não-Down (NDS). A: em relação à distribuição topográfica (cortex x medula); B: em relação aos grupos etários no cortex C: em relação aos subgrupos etários na medula (MP x PMP); D: subgrupos por sexo (M x F) no cortex; E: subgrupos por sexo (M x F) na medula. DS (MP): minimipuberdade grupo Down (círculo preto); NDS(MP): minimipuberdade grupo não-Down (quadrado preto); DS (PMP): não-minipuberdade grupo DS (triângulo para cima preto); NDS(PMP): não-minipuberdade grupo NDS (triângulo para baixo preto); DS (M): meninos Down (triângulo preto); DS(F): meninas Down (círculo preto); NDS(M): meninos não-Down (triângulo cinza); NDS(F): meninas não-Down (círculo cinza). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$

Em resumo:

- A análise do **CD68** não mostrou diferença na expressão entre as topografias (cortex x medula).
- Em todas as análises, o grupo DS apresenta mais células CD68+ do que o grupo NDS, em ambas as topografias, cortex e medula.
- Diferente da expressão do CD68, a análise do **CD163** mostrou maior expressão no cortex quando comparado a medula nos dois grupos, DS e NDS.
- Em oposição ao observado com o CD68, a análise do **CD163** mostra que o grupo DS apresenta menos células CD163+ na medula quando comparado a mesma topografia do grupo NDS.

Esse mesmo comportamento se mantém no subgrupo etário MP e no sexo masculino, mas não no sexo F.

5.2.7.3. Células dendríticas (S100)

A expressão deste marcador concentra-se, essencialmente, na região da medula nos dois grupos (DS: média medula: 27,68% x média córtex: 1,80% $p < 0,0001$ e NDS: média medula: 19,79% x média córtex: 1,03% $p < 0,0001$), sendo que o grupo DS apresenta maior expressão que o NDS em ambas as regiões (DS x NDS córtex, $p = 0,0363$; DSxNDS medula, $p = 0,0207$) (figura 28A).

Na análise por idade, observou-se em topografia de medula que o subgrupo MP DS apresenta maior expressão do que o mesmo subgrupo NDS (31,28% vs 16,44%; $p = 0,0242$ – figura 28C). Já em topografia de córtex, é o subgrupo PMP DS que apresenta maior expressão de S100 quando comparada com o mesmo subgrupo NDS (1,70% vs 0,85%; $p = 0,0001$) (figura 28B).

Em relação aos subgrupos por sexo, as meninas DS apresentam maior expressão de S100 no córtex do que as meninas NDS ($p = 0,0083$ figura 28D). Entre os meninos, não foi observada diferença estatisticamente significativa. Dentro do grupo DS, foi identificada diferença entre os sexos: as meninas apresentam maior expressão deste marcador do que os meninos ($p = 0,038$) (figura 28D). Em topografia da medula, não foram observadas diferenças entre os sexos (figura 28E).

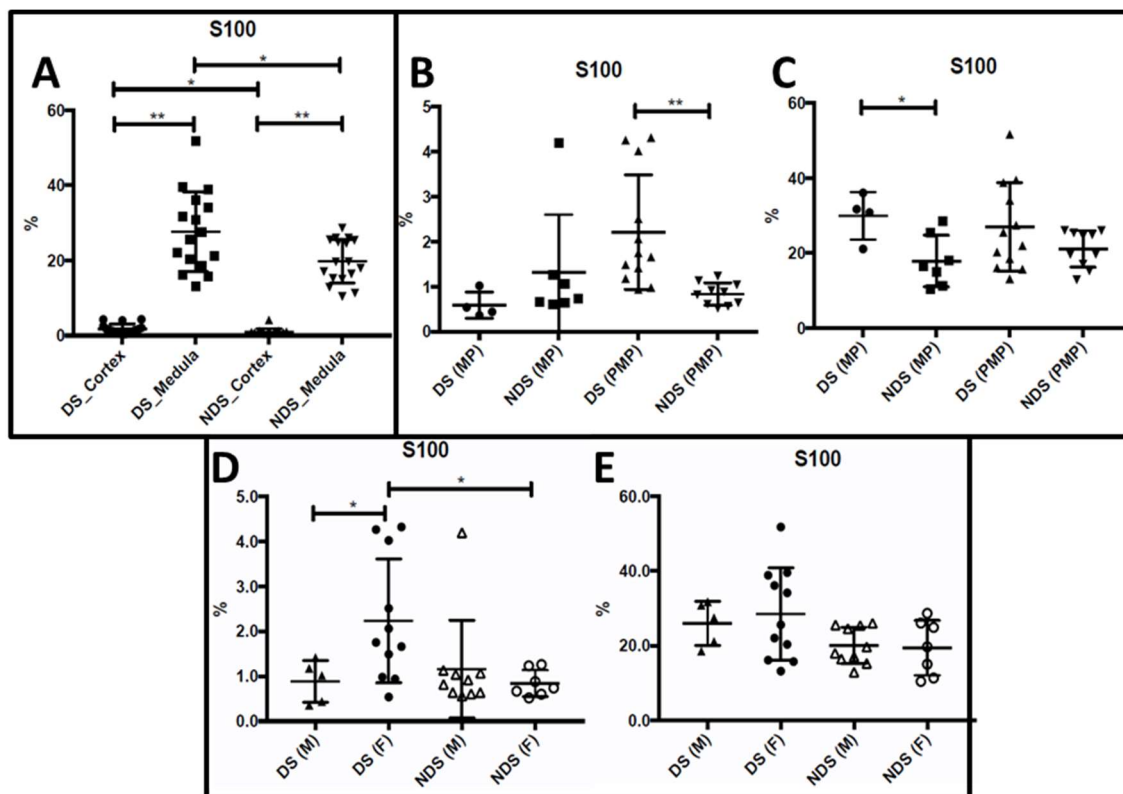


Figura 28 - Análise comparativa da expressão de S100 entre os grupos Down (DS) e não-Down (NDS). A: em relação à distribuição topográfica (córtex x medula); B: em relação aos grupos etários no córtex C: em relação aos subgrupos etários na medula (MP x PMP); D: subgrupos por sexo (M x F) no córtex; E: subgrupos por sexo (M x F) na medula. DS (MP): minipuberdade grupo Down (círculo preto); NDS(MP): minipuberdade grupo não-Down (quadrado preto); DS (PMP): não-minipuberdade grupo DS (triângulo para cima preto); NDS(PMP): não-minipuberdade grupo NDS (triângulo para abaixo preto); DS (M): meninos Down (triângulo preto); DS(F): meninas Down (círculo preto); NDS(M): meninos não-Down (triângulo cinza); NDS(F): meninas não-Down (círculo cinza). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$

Em resumo:

- As células dendríticas concentram-se, essencialmente, na medula dos dois grupos (DS e NDS).
- Sendo que, o grupo DS apresenta maior percentual de células que o NDS em ambas as regiões: córtex e medula.
- Essa diferença é pronunciada na região da medula no subgrupo etário MP.
- Apesar de ter poucas células em região de córtex (tanto no DS quanto no NDS), no subgrupo etário PMP o contingente de células dendríticas S100+ é maior no grupo DS quando comparado ao NDS.

Ainda na região do córtex, as meninas têm mais células dendríticas no grupo DS do que no grupo NDS, e tem mais células dendríticas do que os meninos no grupo DS.

Tabela 6 - Resumo dos resultados da distribuição das linhagens celulares em córtex e medula, nos grupos DS e NDS

	Localização dominante		DS X NDS	
	DS	NDS	Cortex	Medula
CD20	Medula	Medula	DS < NDS	DS = NDS
CD5	Medula	C = M	DS < NDS	DS = NDS
A1/A3	Cortex	Cortex	DS > NDS	DS = NDS
CD68	C = M	C = M	DS >> NDS	DS >> NDS
S100	Medula	Medula	DS > NDS	DS > NDS
CD4	C = M	C = M	DS = NDS	DS < NDS
CD8	Cortex	C ortex	DS > NDS	DS = NDS
CD2	Cortex	Cortex	DS = NDS	DS = NDS
CD23	Medula	Medula	DS = NDS	DS = NDS
CD163	Cortex	Cortex	DS = NDS	DS << NDS
PAX5	Medula	Medula	DS = NDS	DS = NDS
FOXP3	Medula	Medula	DS = NDS	DS > NDS
CD1a	Cortex	Cortex	DS = NDS	DS = NDS
CD56	Medula	Medula	DS > NDS	DS >>> NDS

DS: Síndrome de Down; NDS: não Síndrome de Down; C: Cortex; M: Medula;
 > e <: p<0,05; >> e <<: p<0,005; >>> e <<<: p<0,0001.

Tabela 7 - Resumo dos resultados das análises das linhagens celulares comparando os grupos DS e NDS segundo a faixa etária, em córtex e medula

Marcadores	DS X NDS			
	Cortex		Medula	
	MP	PMP	MP	PMP
CD20	DS < NDS	DS < NDS	DS = NDS	DS = NDS
CD5	DS < NDS	DS < NDS	DS = NDS	DS = NDS
A1/A3	DS = NDS	DS > NDS	DS = NDS	DS = NDS
CD68	DS > NDS	DS >> NDS	DS > NDS	DS >> NDS
S100	DS = NDS	DS >> NDS	DS > NDS	DS = NDS
CD4	DS = NDS	DS = NDS	DS = NDS	DS < NDS
CD8	DS > NDS	DS = NDS	DS = NDS	DS = NDS
CD2	DS = NDS	DS = NDS	DS = NDS	DS = NDS
CD23	DS = NDS	DS = NDS	DS = NDS	DS = NDS
CD163	DS = NDS	DS = NDS	DS << NDS	DS = NDS
PAX5	DS = NDS	DS = NDS	DS = NDS	DS = NDS
FOXP3	DS = NDS	DS = NDS	DS = NDS	DS > NDS
CD1a	DS > NDS	DS = NDS	DS = NDS	DS = NDS
CD56	DS = NDS	DS >> NDS	DS > NDS	DS >>> NDS

DS: Down Síndrome; NDS: não- Down Síndrome; MP: Minipuberdade; PMP: pós-minipuberdade;
 > e <: p<0,05; >> e <<: p<0,005; >>> e <<<: p<0,0001

Tabela 8 - Resumo dos resultados das análises das linhagens celulares comparando os grupos DS e NDS segundo o sexo, em córtex e medula

Marcadores	DS X NDS			
	Cortex		Medula	
	M	F	M	F
CD20	DS < NDS	DS = NDS	DS = NDS	DS = NDS
CD5	DS < NDS	DS < NDS	DS = NDS	DS = NDS
A1/A3	DS = NDS	DS > NDS	DS = NDS	DS = NDS
CD68	DS > NDS	DS > NDS	DS > NDS	DS > NDS
S100	DS = NDS	DS > NDS	DS = NDS	DS = NDS
CD4	DS = NDS	DS = NDS	DS = NDS	DS = NDS
CD8	DS = NDS	DS = NDS	DS = NDS	DS = NDS
CD2	DS = NDS	DS = NDS	DS = NDS	DS > NDS
CD23	DS = NDS	DS = NDS	DS = NDS	DS = NDS
CD163	DS = NDS	DS = NDS	DS < NDS	DS = NDS
PAX5	DS = NDS	DS = NDS	DS = NDS	DS = NDS
FOXP3	DS = NDS	DS = NDS	DS = NDS	DS = NDS
CD1a	DS >> NDS	DS = NDS	DS = NDS	DS = NDS
CD56	DS = NDS	DS = NDS	DS >>> NDS	DS >>> NDS

DS: Down Síndrome; NDS: não-Down Síndrome; M: Masculino; F: Feminino;
 > e <: p<0,05; >> e <<: p<0,005; >>> e <<<: p<0,0001

6. DISCUSSÃO

6.1 Morfometria

É pequeno o número de trabalhos com análise morfométrica de timo humano devido às limitações de acesso a este tipo de material. Aqueles com número grande de amostras, utilizaram material oriundo de autópsias e cirurgias para correção de malformações cardíacas, enquanto o presente trabalho utilizou amostras oriundas exclusivamente de cirurgias cardíacas. Além disso, é o primeiro trabalho que, inclui na análise comparativa DS x NDS dados relacionados ao subgrupo etário da minipuberdade e diferenças entre os sexos, realizadas de forma separada e associada. Estas diferenças podem ser visualizadas na tabela 9.

Tabela 9 - Trabalhos previamente publicados que utilizam amostras de timo humano para análise morfológica e/ou imunistoquímica *in situ* na síndrome de Down

Autor	Ano	N	Origem	Idade	Avaliação	IHQ	Principais resultados
Benda et.al.	1964	Total: 67 DS: 30 NDS: 37	A + C	9d-45a	DSxNDS	-	Alterações morfológicas no DS: tamanho menor, redução da área cortical, aumento e alteração cística dos CHs, e perda da demarcação cortico-medular
Levin et.al.	1979	Total: 24 DS: 12 NDS: 12	A	1d-15m	DSxNDS	-	Alterações morfológicas no DS: tamanho menor, depleção linfocitária cortical, aumento e alteração cística dos CHs, e aumento de celularidade em torno dos CHs
Larocca et.al.	1988	Total: 26 DS: 14 NDS: 12	C	1m-4a	DSxNDS	CD1, CD2, CD3, CD4, CD8, DR, MHC classe 1, Igs	Alterações morfológicas no DS: redução da área cortical, perda da demarcação cortico-medular, aumento de celularidade em torno dos CHs Alterações imunistoquímicas: redução de células positivas para CD3, CD1, CD4 e CD8
Larocca et.al.	1990	Total: 70 DS: 35 NDS: 35	A + C	ND	DSxNDS	S 100	Alterações morfológicas no DS: redução da espessura cortical, depleção linfocitária cortical, aumento e alteração cística dos CHs, fibrose interlobular Alterações imunistoquímicas: redução de células interdigitantes (S100+)
Musiani et.al.	1990	Total: 27 DS: 15 NDS: 12	C	1m-4a	DSxNDS	CD1, CD2, CD3, CD4, CD8, DR, MHC classe 1, Igs, TCR (q̢ e γ̢)	Alterações morfológicas no DS: redução da espessura cortical, depleção linfocitária Alterações imunistoquímicas: redução de timócitos corticais CD1+
Skogberg et.al.	2014	Total: 10 DS: 5 NDS: 5	C	0-6m	DSxNDS	AIRE, FOXP3, Involutrina, CD11c, K5, Caspase3	Alterações por citometria de fluxo: redução das células CD3, CD1, CD4, CD8 e TCR q̢
Marcovecchio et al.	2019	Total: 35 DS: 9 NDS: 26	C	0-6a	DSxNDS	CD3, CD4, CD8, TDT, FOXP3, Involutrina, AIRE	Alterações morfológicas no DS: peso reduzido, aumento da área medular, do número de CH alterações císticas Alterações imunistoquímicas: aumento AIRE (2-5m; 5-9m); redução (2-5a); aumento da Involutrina Alterações por citometria de fluxo: aumento de Treg (FOXP3) no timo; redução de TREC, Treg, CD4 e CD8 em sangue periférico; redução de linfócitos naive T (CD4+CD45RA+CD31+)
Marcovecchio et al.	2021	Total: 25 DS: 12 NDS: 13	C	2m-12a	DSxNDS	Involutrina, AIRE, p16	Alterações morfológicas no DS: aumento da área medular, do número e tamanho dos CH Alterações imunistoquímicas: redução AIRE (4a); aumento da Involutrina e do p16
Atual trabalho	2022	Total: 75 DS: 24 NDS: 51	C	11d-5a	DSxNDS MPxPMP MxP	CD20, PAX5, CD23, CD2, CD5, CD4, CD8, FOXP3, CD1a, CD68, CD163, AE1/AE3, S100, CD56	Alterações morfológicas no DS: redução da espessura média do córtex; aumento razão entre área medula e área total do lobulo Alterações imunistoquímicas: resumidas nas tabelas 6, 7 e 8.

DS: síndrome de Down; NDS: sem síndrome de Down; MP: mini-puberdade; pós-mini-puberdade; M: masculino; F: feminino; m: meses; a: anos; CHs: corpúsculos de Hassall

Dentre as alterações aqui descritas, ressaltam-se a redução da espessura do córtex e as áreas medulares mais proeminentes nos portadores de síndrome de Down, quando comparados com os não portadores desta síndrome. Estas diferenças tornam-se mais evidentes nos primeiros 6 meses de vida (minipuberdade), onde evidenciamos diferenças estatisticamente significantes dos critérios referidos (figuras 8A, 8E e 9A). O que pode ser explicado por alterações dos níveis de gonadotrofina, que são altos nos três primeiros meses de vida, mas diminuem até os 6 meses – exceto os níveis de FSH em meninas, que se mantêm elevado até os 3-4 anos.¹⁴

Depois deste período (0-6 meses de vida), o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal permanece quiescente até a puberdade. A ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário neonatal (minipuberdade) tem sido alvo de pesquisas com timo e sua relação com a função imune^{16, 17, 32}.

Colaboradores do nosso grupo mostraram, em 2018, que mecanismos genômicos governam de forma diferente processos celular e molecular envolvidos no funcionamento do timo neonato e, mais tarde, no processo de involução tímica^{18, 19}.

Moreira-Filho e colaboradores¹⁹, em 2018, mostraram que alguns genes são diferentemente expressos entre meninos e meninas nos primeiros meses de vida (minipuberdade); os autores sugerem que mecanismos genômicos e influências hormonais pós-natais possivelmente atuam de forma sinérgica moldando o dimorfismo sexual tímico nos 6 primeiros meses de vida.

Larocca e colaboradores²⁸, em 1988, avaliaram 35 amostras de portadores de síndrome de Down com 20 amostras de não portadores. A maioria foi oriunda autópsias e, no grupo de não portadores de síndrome de Down havia outras cromossomopatias. Este grupo mostrou que o grupo DS apresentava depleção cortical de timócitos, redução da espessura do córtex, perda da demarcação cortico-medular e aumento no tamanho dos corpúsculos de Hassall. Evidenciaram também que essas diferenças se tornam mais proeminentes em idades mais avançadas.

As diversas alterações estruturais observadas nas análises morfométricas em portadores de síndrome de Down estão relacionadas a diferenças nas proporções celulares dos compartimentos cortical e medular. Esses dados

associados aos achados imunistoquímico deste trabalho, dados de alterações transcricionais descritos previamente por colaboradores do nosso grupo e dados de análise celular de componentes do sangue periférico disponíveis na literatura consolidam informações importantes sobre as diferenças na maturação e seleção de células T em pacientes portadores desta síndrome que podem estar relacionadas as diferenças clínicas e biológicas observadas nesta população.

6.2. As subpopulações tímicas avaliadas pela técnica imunistoquímica

Este estudo se propôs a estudar de forma quantitativa as subpopulações tímicas de uma forma global no tecido tímico em humanos, comparando pacientes portadores de Síndrome de Down à pacientes não portadores de cromossomopatias. Foi utilizada a técnica imunistoquímica, através de um amplo painel de marcadores de células linfoides e estromais. Como inovação, nos propusemos a avaliar a influência do período da minipuberdade e do sexo sobre essas subpopulações nos dois grupos de pacientes. Algumas limitações no desenvolvimento do projeto envolvem o pequeno número de amostras, especialmente do grupo de portadores de Síndrome de Down, e a dificuldade de ter todas as idades representadas de forma contínua.

A **população B no timo humano** é alvo de muitos estudos^{6-8, 10, 37}. Para análise desta população, foram utilizados os seguintes marcadores: CD20, CD23 e PAX-5. Nossos dados confirmam dados prévios da literatura que a população B responde por cerca de 30% da população de células na região da medula em ambos os grupos (DS e NDS)^{6, 7, 10}. Entretanto não observamos diferenças entre os grupos NDS e DS na região da medula em nenhum dos parâmetros avaliados comparativamente (global, por sexo e por idade).

Dados da literatura sugerem que a diferença da imunidade entre esses dois grupos se deve à imunidade mediada pelas células B e T. Além disso, que essa deficiência é primária, e não secundária, pois mostram diferenças desde a fase fetal em portadores de síndrome de Down³⁸. Em estudo observacional prospectivo, Zizka e colaboradores³⁸, em 2006, examinaram 61 gestantes com fetos com cariótipo normal, com síndrome de Down e síndrome de Edwards. Neste trabalho, com análise de sangue obtido por cordocentese, foi evidenciado

que a população Down apresentava redução significativa de linfócitos B quando comparados com a população com cariótipo normal.

Joshi e colaboradores³⁹, em 2011, avaliaram alterações imunológicas em portadores de síndrome de Down que justificassem a maior propensão a infecções nesta população. Para isso, analisaram o sangue periférico de 24 pacientes (12 de cada grupo: DS e NDS), com idade entre 2-18 anos, após uma dose da vacina contra o vírus *influenza*³⁹. Este trabalho sugere sutis anormalidades nas respostas humoral e celular das crianças portadoras de síndrome de Down em comparação aos indivíduos controle. Assim como evidenciou menor percentual de células B no grupo DS.³⁹

Os dados deste estudo mostram que a redução dos linfócitos B no tecido tímico dos portadores de síndrome de Down ocorre apenas na região da cortical e no sexo M.

São poucos os estudos sobre o imunofenótipo das células B no tecido tímico humano utilizando a técnica imunoistoquímica. Uma revisão recente sobre esse assunto³⁷, propõe a existência de duas subpopulações de células B tímicas: - **uma dominante, localizada em medula**, constituída por células B derivadas de células imaturas progenitoras provenientes da medula óssea, que se diferenciam em células B tímicas peculiares; essas células expressam, além dos Ags B usuais, o CD5 (em 50% das células, característico da subpopulação B1 de células B), CD2, grandes quantidades de moléculas MHC-II (sugerindo que atuem como eficientes apresentadoras de Ag, em colaboração com as células dendríticas); as células B medulares se colocizam com as mTECs e os tímócitos imaturos. As células B medulares constituem a vasta maioria de células B tímicas no primeiro ano de vida, para depois declinar, juntamente com as mTECs progressivamente até a vida adulta – **o segundo componente de células B seria o perivascular**, que começa a aparecer no timo após o primeiro ano de vida, cresce, e se torna o principal componente de células B no timo do adulto. Essas são células B memória, que chegam ao timo já maduras, provenientes da medula óssea.

Os trabalhos prévios que descrevem a presença e distribuição das células B no timo não discutem a papel desenvolvido por esta população de linfócitos em humanos. Em camundongos, trabalhos experimentais sugerem que os

linfócitos B desempenhem um papel na seleção negativa de linfócitos T não reativos, além de contribuir para a diferenciação e expansão dos linfócitos T_{REG} tímicos.

Até onde pudemos pesquisar, não encontramos referência a um compartimento de linfócitos B corticais no timo, e permanece incógnito o papel da redução desse compartimento celular observada em nosso estudo, na imunodeficiência humoral dos pacientes portadores de síndrome de Down.¹¹

Em relação aos **linfócitos T** avaliados pela imunoexpressão de **CD5**, foi evidenciada depleção desta população em córtex no grupo DS em relação ao grupo NDS, que se mantem quando estratificados por faixa etária e sexo. Esse achado justifica a redução da espessura do córtex que observamos nesse grupo, e confirma dados prévios da literatura da depleção de linfócitos T na região do córtex na população DS^{28, 33}. Interessante ressaltar que essas diferenças desaparecem com o CD2; isso pode estar relacionado, pelo menos em parte, ao fato desse marcador, diferente do que ocorre com o CD5, ser expresso também pelas células NK, que se apresentam em maior número no grupo DS, mascarando assim a redução no contingente das células observado nesse grupo de pacientes.

Não observamos diferenças significantes nas subpopulações T- **CD4 e T-CD8** entre os grupos DS versus NDS na análise global das amostras (figura 21A e 21B). O que está de acordo com dados da literatura em relação à análise global destes marcadores. Marcovecchio e colaboradores, em 2019, não encontraram alterações de maturação de células T e na expressão de marcadores de desenvolvimento (TdT, CD3, CD4 e CD8)³⁰. Entretanto, na análise de **grupos etários**, DS apresentou menor proporção tardia de CD4 do em relação ao grupo subgrupo NDS em topografia de medula (figura 20C). Já o contingente de células T CD8+ no córtex é maior no grupo DS quando comparado ao grupo NDS na fase precoce de desenvolvimento (figura 21B). Esses dados reforçam a diferença na cinética de maturação de células T no grupo DS e estão de acordo com dados da literatura.^{13, 30, 34}

Prada e colaboradores,¹³ em 2005, avaliaram a capacidade do timo de crianças portadoras de síndrome de Down em produzir novos linfócitos T e como essa capacidade muda com a idade, através da quantificação de RTEs (*recent*

thymic emigrants) em sangue periférico (que contém os TRECs). Foram utilizadas amostras de 8 crianças, através das técnicas de citometria de fluxo e RT-PCR. Observaram que o grupo Down apresentava menos células T auxiliares (CD4+) e mais células T citotóxicas (CD8+). Dados semelhantes aos relatados no nosso trabalho, que evidenciou esta diferença a nível de avaliação histológica e imunofenotípica no tecido tímico, em uma amostra maior, nos subgrupos etários acima descritos.

Não foram observadas diferenças entre os grupos NDS e DS nas comparações por sexo. Entretanto, ao analisar comparativamente os sexos feminino e masculino dentro do grupo NDS, em topografia de cortex, os meninos NDS apresentaram maior proporção de células T CD4 do que as meninas NDS (figura 20D). Esses achados corroboram os dados encontrados previamente por nosso grupo em relação às diferenças a nível mecanismos genômicos e influências hormonais pós-natais moldando o dimorfismo sexual tímico nos 6 primeiros meses de vida.¹⁹

As **células T regulatórias**, aqui avaliadas pela expressão de Foxp3, têm sido estudadas na população com síndrome de Down. Sabe-se que, na população sem cromossomopatias, o número de células T regulatórias aumentam com o avançar da idade. Prada e colaboradores,¹³ em 2005, investigaram os diferentes aspectos de produção e regulação de células T em crianças com síndrome de Down. Ao avaliar a população de células T regulatórias nesta população, através da co-expressão de CD3/CD25/Foxp3 (sangue periférico de 7 amostras do grupo DS e 8 amostras no grupo NDS), foi observada maior proporção de células T regulatórias no grupo Down, quando comparada com o grupo controle. Esse achado reforça a ideia de uma similaridade entre portadores de síndrome de Down e indivíduos mais velhos sem cromossomopatias.

Nosso trabalho reforça este dado: encontramos maior expressão de Foxp3 no grupo DS do que no grupo NDS (figura 22A), especialmente no subgrupo etário pós-minipuberdade em topografia de medula (figura 22C). A análise comparativa entre os subgrupos de sexo e subgrupo etário minipuberdade não observou diferença estatisticamente significativa. Esses dados, corroboram os dados de Carneiro-Sampaio e colaboradores²⁶ (2011) de

que a imunodeficiência do grupo Down, é primária, e não secundária como advogam alguns grupos. As células T_{REG}, apesar de estarem quantitativamente aumentadas no grupo DS, são defeituosas em sua função supressora.³⁰ Desta forma, a maior incidência de doenças autoimunes nos portadores de Síndrome de Down também pode estar relacionada, pelo menos em parte, ao comprometimento funcional das células T regulatórias.³⁰

Em relação à expressão de CD1a, observou-se que há maior expressão deste marcador na região do córtex do que na região da medula tanto no grupo DS quanto no grupo NDS – que confirma os dados da literatura, que o CD1a é um marcador de timócitos imaturos corticais (figura 23A). Apesar da região cortical do grupo DS ser depletada em relação à população linfocitária do que o grupo NDS, os subgrupos MP DS e meninos DS apresentam maior expressão de CD1a que os mesmos subgrupos do grupo NDS (figura 23B e D), mostrando, que nas fases iniciais do desenvolvimento tímico, o grupo DS tem um contingente aparentemente bem desenvolvido de timócitos imaturos na região cortical. A ausência de diferença em idades avançadas sugere que não são sustentadas ao longo do tempo.

Em relação às células que expressam CD56 – reconhecido como marcador de células NK – dados da literatura mostram que a população Down apresenta maior quantidade destas células quando comparadas com a população não Down.¹³ Nossos dados corroboram este achado. Neste trabalho, o grupo DS apresentou maior expressão de CD56 tanto em região de córtex quanto em região medular, quando comparados com o grupo NDS (figura 24A). E estas diferenças permanecem ao longo do tempo (figura 24B e C) nas duas topografias.

Duas células do estroma tímico têm importância na seleção das células T: as células epiteliais tímicas (TECs) e as células do sistema macrofágico-monocítico (macrófagos e células interdigitantes).^{29, 41}

As **células epiteliais tímicas** (TECs) são alvo de diversos estudos pois o sistema imune dos vertebrados apresenta um grande dimorfismo sexual. Mulheres têm maior propensão a doenças autoimunes do que os homens. Evidências sugerem que essas diferenças resultam de efeitos diretos e indiretos dos esteroides sexuais nas respostas imunes inata e adaptativa²⁰. Perreault e

colaboradores,²⁰ em 2015, avaliaram os efeitos hormonais nos subtipos de TECs, e observaram que os homens acumulam mais TECs que as mulheres. Entretanto essas células, em homens, apresentam menor índice proliferativo que as mulheres (avaliado pela expressão de Ki67) –sugerindo uma deficiência funcional destas células. Nossos dados, avaliando comparativamente mulheres dos grupos DS e NDS, mostramos diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em topografia de córtex (figura 25A). As meninas do grupo DS apresentaram maior expressão de AE1/AE3 do que as meninas do grupo NDS (figura 25D). Considerando que as cTECs estão diretamente relacionadas com o processo de seleção positiva que ocorre na região cortical do timo, essa diferença entre os sexos reforçam, mais uma vez, os dados do nosso grupo em relação ao dimorfismo sexual tímico.¹⁹

Meng-Lei Zhu e colaboradores,²¹ em 2016, sugeriram que a regulação androgênica dos mecanismos intra-tímicos de tolerância relacionados ao *AIRE* altera a predisposição da autoimunidade. Sugerindo que a terapia androgênica pode aumentar diretamente a expressão do *AIRE*, promovendo efeito protetor da autoimunidade.

No timo, o gene regulador da autoimunidade (*AIRE*) está relacionada a auto-tolerância das células T, em parte, promovendo a expressão de antígenos tecido específicos (TSAs) nas células epiteliais tímicas da medula (mTECs). O papel crítico do *AIRE* na prevenção da autoimunidade é evidenciada pelo desenvolvimento de doenças autoimunes em camundongos e humanos deficientes em *AIRE*. Enquanto a perda completa da função do *AIRE* resulta em doença autoimune, a redução quantitativa predispõe à autoimunidade. Nossos dados evidenciam maior proporção de células epiteliais tímicas em região da medula quando comparada com a região do córtex, tanto no grupo DS quanto no grupo NDS (figura 25A). Entretanto, não observamos diferenças estatisticamente significantes na proporção de células epiteliais em topografia medula entre os grupos DS e NDS em nenhuma das comparações realizadas (faixa etária ou sexo – figura 25C e E).

Os **macrófagos** são células extremamente importantes no processo de seleção positiva e negativa, exercendo suas funções de células fagocíticas profissionais e células apresentadoras de antígenos. A análise do CD68 mostrou

expressão semelhante no córtex e na medula em ambos os grupos, DS e NDS. Entretanto, o grupo DS apresentou maior expressão de CD68 nas duas topografias, quando comparado com o grupo NDS (figura 26A). Estas diferenças se mantêm nas comparações entre grupos etários e sexos (figura 26B-E).

A análise da expressão de CD163 – marcador também utilizado para avaliação da população macrófaga – mostrou maior expressão no córtex nos dois grupos. Além disso, observamos que a região da medula do grupo DS apresenta menor contingente de células CD163 positivas do que a mesma topografia do grupo NDS, já na fase precoce da minipuberdade e no sexo masculino (figura 27C e E).

Alguns trabalhos prévios discutem vastamente a diferença entre estes dois marcadores,⁴²⁻⁴⁵ indicando que caracterizam duas populações diferentes de macrófagos do ponto de vista funcional: macrófagos M1 – caracterizado por fenótipo pró-inflamatório, promovendo a resposta imune Th1 e atividade em neoplasias malignas; e os macrófagos M2 – envolvidos em funções regulatórias do reparo / remodelamento tecidual e promovendo a resposta imune Th2.⁴⁵ Estudos *in vitro* sugerem que CD163 pode ser um marcador M2, e estudos em tecidos humanos têm considerado células CD163 positivas por imunohistoquímica como macrófagos M2.^{42, 43} Entretanto, Barros e colaboradores⁴⁵ (2013) afirmam que CD163 não é um marcador M2 específico. Limitam-se apenas a afirmar que, isoladamente, o CD163 é um marcador de macrófago específico, enquanto o CD68 pode marcar outras células (ex: células dendríticas). Portanto, o uso do CD68 pode resultar numa falsa estimativa do número real de macrófagos em determinado tecido. Nossos achados sugerem tratar-se de subpopulações diferentes de macrófagos, com uma deficiência de células CD163+ na medula nos pacientes DS, especialmente no sexo masculino, e um maior contingente de células CD68+ nos pacientes DS, que se distribuem de forma homogênea em córtex e medula.

Analisando os achados dos marcadores de células imaturas (CD1a) e macrófagos (CD68), ambos apresentam maior expressão no grupo DS quando comparado ao NDS. A depleção de CD1a no grupo DS em idades avançadas pode ter correlação, pelo menos em parte, com a atividade fagocítica exercida pelos macrófagos, reduzindo a população T imatura no grupo DS..

Nos timos de pacientes sem cromossomopatias, as **células dendríticas interdigitantes** são encontradas no entorno dos corpúsculos de Hassall e na junção cortico-medular. A presença, proporção e distribuição destas células podem ser avaliadas através da marcação de S100. Larocca e colaboradores²⁹ (1990), observaram que o grupo Down apresentava menos células positivas para S100, quando comparado com o grupo controle, e que este percentual diminuía ainda mais com o avançar da idade. Nossos dados corroboram os dados da literatura em relação à distribuição topográfica – essas células encontram-se, essencialmente, em região medular tanto no grupo DS quanto no grupo NDS. Mas, contrariamente aos dados relatados, observamos maior expressão de S100 no grupo DS do que no grupo NDS (figura 28A). Isaacson e colaboradores trabalharam com timos oriundo de autópsia e cirurgias. Não sabemos em que condições esses pacientes evoluíram para óbito e se as diferenças observadas podem se justificar por condições referentes a tratamento, quadro infeccioso ou doenças pré-existentes.

Em resumo, nossos achados apresentam evidências que dão suporte a hipótese de que um processo maturativo anômalo precoce intrínseco das subpopulações tímicas contribuem para as anormalidades observadas no sangue periférico, e as manifestações clínicas da maior suscetibilidade a quadros infecciosos e doenças autoimunes na síndrome de Down. Foram encontradas também evidências de que o dimorfismo sexual tenha um papel no desenvolvimento do timo em ambos os grupos, DS e NDS, assim como foi possível, se estabelecer uma informação cronológica das alterações observadas nas várias subpopulações tímicas, quando estratificadas segundo o critério definido para a minipuberdade. Esperamos que nossos resultados, refletindo um painel geral das diversas populações tímicas em crianças portadoras de síndrome de Down, assim como de crianças não portadoras de cromossomopatias, possam fornecer subsídios para pesquisas futuras, no sentido de se compreender melhor o significado biológico de cada uma dessas linhagens celulares no desenvolvimento do timo humano, em condições normais e patológicas.

7. CONCLUSÕES

Em relação à análise morfométrica

O grupo DS mostrou comportamento mais variável dos parâmetros morfométricos avaliados em função das faixas etárias e sexo, do que o grupo NDS.

- 7.1. Os portadores de DS apresentam áreas medulares maiores e espessura do córtex menor do que as mesmas regiões do timo dos não portadores desta síndrome, a despeito das áreas totais dos lóbulos não terem diferença estatística. Esses achados se tornam particularmente evidentes na fase inicial da minipuberdade e no sexo feminino.

Em relação à análise das linhagens celulares

Comparados a timos de pacientes não portadores de cromossomopatias, os timos de portadores de síndrome de Down apresentam:

- 7.2. Distribuição predominante em córtex ou medula semelhante em relação aos todos os marcadores, exceto o CD5, que apresenta uma população dominante na medula no grupo DS, enquanto a distribuição é uniforme em córtex e medula no grupo não portador de cromossomopatias. Isso pode ser explicado, pela depleção de linfócitos T CD5+ que ocorre na cortical no grupo DS.

- Em relação à distribuição das diferentes linhagens celulares nas duas regiões do timo, este estudo mostra uma expressiva dominância de células B (CD20+), células T_{REG} (FOXP3) e células NK (CD56+) em medula; células T imaturas (CD1a+), e macrófagos (CD163+) e células epiteliais em córtex, sendo que os macrófagos CD68+ têm distribuição semelhante nas duas regiões.

- 7.3. Menor contingente de linfócitos B CD20+ e T CD5+ em região cortical e linfócitos T CD4+ e **macrófagos CD163+ em medular.**

- 7.4.** Maior contingente de linfócitos T CD8+, **linfócitos NK CD56+** e células epiteliais AE1/AE3+ em córtex; maior contingente de células T_{REG} FOXP3+ em medula; e maior contingente de **macrófagos CD68+** e células dendríticas S100+ em córtex e medula.

***Quando estratificados nas faixas etárias correspondentes à minipuberdade e pós-minipuberdade,** os marcadores estudados exibem variações de comportamento.

- 7.5.** CD20, CD5, CD68e CD56 mantêm suas diferenças entre DS e NDS ao longo das duas faixas de idade; outros só mostram diferença entre os grupos DS e NDS tardiamente, como o AE1/AE3, **S100** e **CD56 no córtex** e CD4 e **FOXP3** na medula; e outros ainda apresentam essa diferença na fase precoce da minipuberdade, a qual desaparece na fase tardia, como o CD8 e o CD1a no córtex, e S100 e o **CD163** na medula.

***Quando estratificados por sexo,** os marcadores estudados exibem variações de comportamento.

- 7.6.** CD5 e CD68 mantêm suas diferenças em ambos os sexos; outros mantêm sua diferença apenas no sexo M, como o CD20 e o **CD1a** no córtex e o CD163 na medula; e outros ainda, mantêm sua diferença apenas no sexo F, como AE1/AE3 e S100 no córtex. Curiosamente, o CD2 apresenta-se mais expresso no grupo DS em relação ao NDS no sexo F, apenas nesta análise.

*Em negrito são identificadas as alterações mais expressivas no grupo DS.

8. REFERÊNCIAS

1. Tanegashima A, Ushiyama I, Kikui Y, Yamamoto H. Intrathymic lymph nodes in humans. *J Anat.* 2001;198(Pt 4):491-5. doi: 10.1046/j.1469-7580.2001.19840491.x.
2. Jaffe ES, Harris NL, Vardiman JW, Campo E, Arber DA. *Hematopathology*. 2. ed. [s.l.]: Elsevier; 2017.
3. Gui J, Mustachio LM, Su DM, Craig RW. Thymus size and age-related thymic involution: early programming, sexual dimorphism, progenitors and stroma. *Aging Dis.* 2012;3(3):280-90.
4. Jablonska-Mestanova V, Sisovsky V, Danisovic L, Polak S, Varga I. The normal human newborns thymus. *Bratisl Lek Listy.* 2013;114(7):402-8. doi: 10.4149/bll_2013_086.
5. Coico R, Sunshine G. *Imunologia*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.
6. Isaacson PG, Norton AJ, Addis BJ. The human thymus contains a novel population of B lymphocytes. *Lancet.* 1987;2(8574):1488-91. doi: 10.1016/s0140-6736(87)92622-5.
7. Spencer J, Choy M, Hussell T, Papadaki L, Kington JP, Isaacson PG. Properties of human thymic B cells. *Immunology.* 1992;75(4):596-600.
8. Howe CJ, Isaacson PG, Spencer J. Characterization of the stability of human and murine thymic B cell/thymocyte rosettes and investigation of unusual immunophenotypic findings. *Cell Immunol.* 1994;158(1):218-27. doi: 10.1006/cimm.1994.1269.
9. Hofmann WJ, Momburg F, Möller P. Thymic medullary cells expressing B lymphocyte antigens. *Hum Pathol.* 1988;19(11):1280-7. doi: 10.1016/s0046-8177(88)80282-x.
10. Bornemann A, Kirchner T. An immuno-electron-microscopic study of human thymic B cells. *Cell Tissue Res.* 1996;284(3):481-7. doi: 10.1007/s004410050609.

11. Kusters MA, Verstegen RH, de Vries E. Down syndrome: is it really characterized by precocious immunosenescence? *Aging Dis.* 2011;2(6):538-45.
12. Steinmann GG. Changes in the human thymus during aging. *Curr Top Pathol.* 1986;75:43-88. doi: 10.1007/978-3-642-82480-7_2.
13. Prada N, Nasi M, Troiano L, Roat E, Pinti M, Nemes E, Lugli E, Ferraresi R, Ciacci L, Bertoni D, Biagioni O, Gibertoni M, Cornia C, Meschiari L, Gramazio E, Mariotti M, Consolo U, Balli F, Cossarizza A. Direct analysis of thymic function in children with Down's syndrome. *Immun Ageing.* 2005;2:4. doi: 10.1186/1742-4933-2-4.
14. Kuiri-Hänninen T, Sankilampi U, Dunkel L. Activation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in infancy: minipuberty. *Horm Res Paediatr.* 2014;82(2):73-80. doi: 10.1159/000362414.
15. Dragin N, Bismuth J, Cizeron-Clairac G, Biferi MG, Berthault C, Serraf A, Nottin R, Klatzmann D, Cumano A, Barkats M, Le Panse R, Berrih-Aknin S. Estrogen-mediated downregulation of AIRE influences sexual dimorphism in autoimmune diseases. *J Clin Invest.* 2016;126(4):1525-37. doi: 10.1172/JCI81894.
16. Dwyer AA, Jayasena CN, Quinton R. Congenital hypogonadotropic hypogonadism: implications of absent mini-puberty. *Minerva Endocrinol.* 2016;41(2):188-95.
17. Kurtoğlu S, Baştuğ O. Mini puberty and its interpretation. *Turk Pediatri Ars.* 2014;49(3):186-91. doi: 10.5152/tpa.2014.2038.
18. Bertonha FB, Bando SY, Ferreira LR, Chacur P, Vinhas C, Zerbini MCN, Carneiro-Sampaio MM, Moreira-Filho CA. Age-related transcriptional modules and TF-miRNA-mRNA interactions in neonatal and infant human thymus. *PLoS One.* 2020;15(4):e0227547. doi: 10.1371/journal.pone.0227547.

19. Moreira-Filho CA, Bando SY, Bertonha FB, Ferreira LR, Vinhas CF, Oliveira LHB, Zerbini MCN, Furlanetto G, Chacur P, Carneiro-Sampaio M. Minipuberty and sexual dimorphism in the infant human thymus. *Sci Rep.* 2018;8(1):13169. doi: 10.1038/s41598-018-31583-3.
20. Dumont-Lagacé M, St-Pierre C, Perreault C. Sex hormones have pervasive effects on thymic epithelial cells. *Sci Rep.* 2015;5:12895. doi: 10.1038/srep12895.
21. Zhu ML, Bakhru P, Conley B, Nelson JS, Free M, Martin A, Starmer J, Wilson EM, Su MA. Sex bias in CNS autoimmune disease mediated by androgen control of autoimmune regulator. *Nat Commun.* 2016;7:11350. doi: 10.1038/ncomms11350.
22. Kusters MA, Verstegen RH, Gemen EF, de Vries E. Intrinsic defect of the immune system in children with Down syndrome: a review. *Clin Exp Immunol.* 2009;156(2):189-93. doi: 10.1111/j.1365-2249.2009.03890.x.
23. Benda CE, Strassmann GS. The thymus in mongolism. *J Ment Defic Res.* 1965;9:109-17.
24. Levin S, Schlesinger M, Handzel Z, Hahn T, Altman Y, Czernobilsky B, Boss J. Thymic deficiency in Down's syndrome. *Pediatrics.* 1979;63(1):80-7.
25. Pellegrini FP, Marinoni M, Frangione V, Tedeschi A, Gandini V, Ciglia F, Mortara L, Accolla RS, Nespoli L. Down syndrome, autoimmunity and T regulatory cells. *Clin Exp Immunol.* 2012;169(3):238-43. doi: 10.1111/j.1365-2249.2012.04610.x.
26. Carneiro-Sampaio M, Coutinho A. Down syndrome: a primary polygenia immunodeficiency.[s.d.]. Não publicado.
27. Lima FA, Moreira-Filho CA, Ramos PL, Brentani H, Lima Lde A, Arrais M, Bento-de-Souza LC, Bento-de-Souza L, Duarte MI, Coutinho A, Carneiro-Sampaio M. Decreased AIRE expression and global thymic hypofunction in

- Down syndrome. *J Immunol.* 2011;187(6):3422-30. doi: 10.4049/jimmunol.1003053.
28. Larocca LM, Piantelli M, Valitutti S, Castellino F, Maggiano N, Musiani P. Alterations in thymocyte subpopulations in Down's syndrome (trisomy 21). *Clin Immunol Immunopathol.* 1988;49(2):175-86. doi: 10.1016/0090-1229(88)90108-0.
 29. Larocca LM, Lauriola L, Ranelletti FO, Piantelli M, Maggiano N, Ricci R, Capelli A. Morphological and immunohistochemical study of Down syndrome thymus. *Am J Med Genet Suppl.* 1990;7:225-30. doi: 10.1002/ajmg.1320370745.
 30. Marcovecchio GE, Bortolomai I, Ferrua F, Fontana E, Imberti L, Conforti E, Amodio D, Bergante S, Macchiarulo G, D'Oria V, Conti F, Di Cesare S, Fousteri G, Carotti A, Giamberti A, Poliani PL, Notarangelo LD, Cancrini C, Villa A, Bosticardo M. Thymic epithelium abnormalities in DiGeorge and Down syndrome patients contribute to dysregulation in T cell development. *Front Immunol.* 2019;10:447. doi: 10.3389/fimmu.2019.00447.
 31. Marcovecchio GE, Ferrua F, Fontana E, Beretta S, Genua M, Bortolomai I, Conti A, Montin D, Cascarano MT, Bergante S, D'Oria V, Giamberti A, Amodio D, Cancrini C, Carotti A, Di Micco R, Merelli I, Bosticardo M, Villa A. Premature senescence and increased oxidative stress in the thymus of Down syndrome patients. *Front Immunol.* 2021;12:669893. doi: 10.3389/fimmu.2021.669893.
 32. Moreira-Filho CA, Bando SY, Bertonha FB, Silva FN, Costa Lda F, Ferreira LR, Furlanetto G, Chacur P, Zerbini MC, Carneiro-Sampaio M. Modular transcriptional repertoire and MicroRNA target analyses characterize genomic dysregulation in the thymus of Down syndrome infants. *Oncotarget.* 2016;7(7):7497-533. doi: 10.18632/oncotarget.7120.
 33. Musiani P, Valitutti S, Castellino F, Larocca LM, Maggiano N, Piantelli M. Intrathymic deficient expansion of T cell precursors in Down syndrome. *Am J Med Genet Suppl.* 1990;7:219-24. doi: 10.1002/ajmg.1320370744.

34. Skogberg G, Lundberg V, Lindgren S, Gudmundsdottir J, Sandström K, Kämpe O, Annerén G, Gustafsson J, Sunnegårdh J, van der Post S, Telemo E, Berglund M, Ekwall O. Altered expression of autoimmune regulator in infant down syndrome thymus, a possible contributor to an autoimmune phenotype. *J Immunol.* 2014;193(5):2187-95. doi: 10.4049/jimmunol.1400742.
35. Zlobec I, Suter G, Perren A, Lugli A. A next-generation tissue microarray (ngTMA) protocol for biomarker studies. *J Vis Exp.* 2014;(91):51893. doi: 10.3791/51893.
36. van de Rijn M, Gilks CB. Applications of microarrays to histopathology. *Histopathology.* 2004;44(2):97-108. doi: 10.1111/j.1365-2559.2004.01766.x.
37. Castañeda J, Hidalgo Y, Sauma D, Roseblatt M, Bono MR, Núñez S. The multifaceted roles of B Cells in the thymus: from immune tolerance to autoimmunity. *Front Immunol.* 2021;12:766698. doi: 10.3389/fimmu.2021.766698.
38. Zizka Z, Calda P, Fait T, Haakova L, Kvasnicka J, Viskova H. Prenatally diagnosable differences in the cellular immunity of fetuses with Down's and Edwards' syndrome. *Fetal Diagn Ther.* 2006;21(6):510-4. doi: 10.1159/000095663.
39. Joshi AY, Abraham RS, Snyder MR, Boyce TG. Immune evaluation and vaccine responses in Down syndrome: evidence of immunodeficiency? *Vaccine.* 2011;29(31):5040-6. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.04.060.
40. Roat E, Prada N, Lugli E, Nasi M, Ferraresi R, Troiano L, Giovenzana C, Pinti M, Biagioni O, Mariotti M, Di Iorio A, Consolo U, Balli F, Cossarizza A. Homeostatic cytokines and expansion of regulatory T cells accompany thymic impairment in children with Down syndrome. *Rejuvenation Res.* 2008;11(3):573-83. doi: 10.1089/rej.2007.0648.

41. Ayran Fidan P, Kaymaz FF, Dagdeviren A. Implications for thymus growth in childhood: histogenesis of cortex and medulla. *Anat Sci Int.* 2019;94(1):111-118. doi: 10.1007/s12565-018-0456-8.
42. Buechler C, Ritter M, Orsó E, Langmann T, Klucken J, Schmitz G. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol.* 2000;67(1):97-103.
43. Sulahian TH, Högger P, Wahner AE, Wardwell K, Goulding NJ, Sorg C, Droste A, Stehling M, Wallace PK, Morganelli PM, Guyre PM. Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155. *Cytokine.* 2000;12(9):1312-21. doi: 10.1006/cyto.2000.0720.
44. Harris JA, Jain S, Ren Q, Zarineh A, Liu C, Ibrahim S. CD163 versus CD68 in tumor associated macrophages of classical Hodgkin lymphoma. *Diagn Pathol.* 2012;7:12. doi: 10.1186/1746-1596-7-12.
45. Barros MH, Hauck F, Dreyer JH, Kempkes B, Niedobitek G. Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PLoS One.* 2013;8(11):e80908. doi: 10.1371/journal.pone.0080908.

APÊNDICE 1 - Dados morfométricos absolutos do grupo DS utilizados para as análises. Valores lineares em μm (micrometros) e valores das áreas em μm^2

Caso	Idade	Espessura média do córtex	Diâmetro médio da região medular	Área total do lóbulo	Área das regiões medulares	Área medular / área total do lóbulo
TD02	4m1d	329	1181	2517134	964907	38%
TD12	5m1d	307	1214	3293004	1301766	40%
TD07	5m21d	397	1890	4438820	1802313	41%
TD18	9m14d	311	1359	2493869	1022494	41%
TD10	11m12d	535	1781	4375558	1662988	38%
TD11	1a6m	195	1613	3468476	1845384	53%
TD14	1a7m25d	339	1553	4126498	1526307	37%
TD15	4m24d	295	1469	3304881	1651311	50%
TD23	6m20d	252	1362	3315041	1393387	42%
TD01	6m27d	260	707	2299267	522039	23%
TD05	7m10d	386	1076	3876018	1025555	27%
TD20	7m11d	274	1488	3180610	1293349	41%
TD04	7m24d	153	2027	3115190	2129343	68%
TD21	8m	347	924	2735196	695872	25%
TD08	8m10d	182	1566	2600284	1140281	44%
TD22	8m16d	201	909	3338728	963140	29%
TD17	8m23d	322	1246	2856165	993347	35%
TD09	9m14d	236	948	2952349	1062154	36%
TD13	1a23d	194	770	2275568	563049	25%
TD24	1a2m24d	243	1055	2560297	875660	34%
TD03	1a3m11d	303	921	2691650	806526	30%
TD06	1a6m15d	74	1585	2585418	1303596	50%
TD16	3a11m	252	1294	2775675	972735	35%
TD25	5a	211	1233	2709441	841935	31%

Apêndice 2 - Dados morfométricos absolutos do grupo NDS utilizados para as análises. Valores lineares em μm (micrometros) e valores das áreas em μm^2

Caso	Idade	Espessura média do córtex	Diâmetro médio da região medular	Área total do lóbulo	Área das regiões medulares	Área medular / área total do lóbulo
TC30	11d	344	708	2944203	657834	22%
TC52	14d	234	2122	2684669	1358700	51%
TC35	29d	284	1128	3080996	823022	27%
TC29	2m1d	322	1366	3785053	1462298	39%
TC26	2m11d	225	1262	3574059	1267007	36%
TC37	3m19d	342	853	2283619	605562	27%
TC38	6m1d	258	1044	3222219	1026504	32%
TC24	6m3d	349	1048	3495838	1083358	31%
TC18	6m6d	355	1721	3671476	1278603	35%
TC56	7m8d	263	848	3333302	996833	30%
TC01	7m17d	141	2094	3391605	2086139	62%
TC11	8m11d	293	1318	2579089	797920	31%
TC16	8m19d	176	868	1187209	406752	34%
TC07	9m2d	234	703	2573204	607836	24%
TC47	1a1m	288	1012	1961632	497032	25%
TC50	1a1m10d	274	1418	3454154	1272640	37%
TC61	1a2m	405	1503	3135760	983881	31%
TC54	1a4m	411	1001	2892288	762024	26%
TC49	1a5m	432	1075	3351552	957918	29%
TC44	1a6m	324	1088	2884437	881102	31%
TC09	1a6m10d	305	866	3265866	1067566	33%
TC48	1a7m	365	1138	3941923	1358497	35%
TC40	1a8m	264	832	2990097	1052752	35%
TC60	1a10m10d	310	842	2108999	625084	30%
TC65	1a11m	300	1256	3497214	1315738	38%
TC33	2a16d	253	1060	2860361	1058512	37%
TC12	2a1m	360	1184	4263104	1803926	42%
TC51	2a1m	221	1606	3516659	1679359	48%
TC53	2a1m	364	1300	2707328	880804	33%
TC63	2a6m	296	790	1943379	520582	27%
TC62	2a6m3d	349	631	4281410	663910	16%
TC59	2a7m	344	748	2731910	894517	33%
TC39	3m18d	350	1277	3498158	883078	25%
TC45	4m11d	420	1426	3895675	1585434	41%

continua...

continuação...

Apêndice 2 - Dados morfométricos absolutos do grupo NDS utilizados para as análises. Valores lineares em μm (micrometros) e valores das áreas em μm^2

Caso	Idade	Espessura média do córtex	Diâmetro médio da região medular	Área total do lóbulo	Área das regiões medulares	Área medular / área total do lóbulo
TC46	5m10d	423	1945	3966204	1189940	30%
TC19	6m9d	323	705	2112171	521860	25%
TC02	6m10d	413	1315	3651607	1636513	45%
TC17	6m24d	187	1597	2919112	1290333	44%
TC55	8m9d	196	1421	2619749	1123349	43%
TC27	9m1d	392	1377	2813064	796205	28%
TC31	9m26d	290	1243	3687525	1177364	32%
TC43	11m15d	159	963	2166942	658701	30%
TC08	1a2m	390	1091	4036884	1038472	26%
TC58	1a2m	397	1738	3821725	1486954	39%
TC42	1a2m19d	174	1747	3376981	1617669	48%
TC14	1a3m	260	1143	2801956	767912	27%
TC05	1a5m	329	957	2991437	830775	28%
TC57	2a1m	281	878	2629864	684168	26%
TC04	2a5m	387	1247	4002009	1160143	29%
TC32	2a6m	316	1288	3415509	964782	28%
TC15	3a4m	330	1310	3081575	937904	30%

Apêndice 3 - Percentuais de imunomarcção da subpopulação B nas regiões estudadas (córtex e medula), do subgrupo NDS. Nas linhas brancas estão representados os valores da região cortical e nas linhas cinzas estão representados os valores da região da região medular

AREA IHQ / AREA CAMPO				AREA IHQ / AREA CAMPO			
CASO	CD20	PAX5	CD23	CASO	CD20	PAX5	CD23
TC001	2,19%	0,14%	0,00%	TC35	0,75%	0,04%	0,03%
	15,12%	1,90%	0,83%		8,57%	1,10%	0,89%
TC007	0,51%	0,00%	0,00%	TC038	0,59%	0,04%	0,05%
	13,99%	3,42%	2,94%		18,19%	2,68%	2,85%
TC011	0,82%	0,05%	0,00%	TC039	0,49%	0,04%	0,00%
	19,96%	2,67%	1,90%		12,84%	1,62%	1,33%
TC014	0,52%	0,04%	0,01%	TC040	0,52%	0,05%	0,03%
	11,91%	5,20%	3,84%		26,44%	2,85%	10,13%
TC015	0,21%	0,01%	0,03%	TC043	0,71%	0,17%	0,03%
	16,07%	0,84%	2,21%		17,17%	3,17%	2,62%
TC016	2,35%	0,37%	0,00%	TC044	0,49%	0,05%	0,04%
	10,23%	0,40%	0,21%		25,34%	3,77%	7,55%
TC017	0,40%	0,07%	0,01%	TC045	0,18%	0,05%	0,01%
	10,57%	2,40%	1,64%		21,50%	4,71%	2,98%
TC029	0,60%	0,02%	0,04%	TC046	0,61%	0,02%	0,00%
	14,34%	1,62%	2,35%		17,97%	3,01%	3,40%
TC031	0,77%	0,11%	0,03%	TC047	1,48%	0,02%	0,01%
	15,15%	1,66%	1,47%		15,97%	2,32%	4,75%
TC032	1,93%	0,16%	0,03%	TC056	0,59%	0,09%	0,00%
	21,87%	7,78%	2,33%		11,49%	2,73%	4,12%
TC033	0,47%	0,06%	0,02%				
	29,62%	5,34%	14,34%				

Apêndice 4 - Percentuais de imunomarcção da subpopulação T nas regiões estudadas (córtex e medula), do subgrupo NDS. Nas linhas brancas estão representados os valores da região cortical e nas linhas cinzas estão representados os valores da região da região medular

AREA IHQ / AREA CAMPO						
CASO	CD5	CD2	CD4	CD8	FOXP3	CD1a
TC001	18,41%	34,51%	17,30%	23,18%	0,15%	18,81%
	39,32%	45,71%	9,93%	13,89%	1,30%	3,94%
TC007	37,83%	71,19%	26,07%	30,79%	0,03%	22,16%
	38,89%	57,33%	21,18%	16,11%	0,94%	14,80%
TC011	23,36%	61,01%	30,06%	40,23%	0,07%	22,83%
	39,10%	48,96%	18,59%	23,73%	2,62%	4,84%
TC014	34,42%	66,13%	23,52%	38,33%	0,23%	35,31%
	40,87%	42,79%	15,70%	17,63%	2,11%	13,05%
TC015	31,40%	64,69%	13,49%	39,74%	0,04%	37,34%
	29,01%	46,04%	17,30%	22,14%	1,20%	17,38%
TC016	12,16%	14,36%	27,80%	43,52%	0,23%	7,12%
	28,15%	23,81%	13,75%	32,50%	0,79%	0,75%
TC017	38,24%	67,98%	5,48%	10,96%	0,17%	26,81%
	40,30%	50,16%	3,57%	23,15%	4,31%	6,98%
TC029	46,54%	56,54%	24,94%	26,98%	0,18%	33,40%
	51,83%	41,13%	21,62%	17,40%	3,75%	15,24%
TC031	47,95%	63,52%	27,20%	30,66%	0,18%	31,80%
	46,62%	38,91%	31,00%	12,43%	3,30%	15,58%
TC032	40,06%	56,57%	23,92%	33,46%	0,23%	25,74%
	45,32%	55,51%	12,52%	26,03%	1,73%	16,52%
TC033	39,25%	60,00%	28,67%	37,73%	0,13%	28,13%
	42,33%	52,12%	24,50%	24,59%	2,78%	16,49%
TC35	61,55%	62,90%	17,10%	31,43%	0,14%	45,05%
	55,81%	35,84%	9,93%	19,31%	3,56%	9,74%
TC038	51,76%	70,00%	20,57%	30,13%	0,18%	33,67%
	42,38%	52,77%	15,35%	26,50%	4,20%	9,42%
TC039	49,27%	64,97%	26,69%	42,00%	0,08%	23,40%
	41,32%	43,63%	8,70%	24,37%	2,69%	19,77%
TC040	49,20%	60,36%	34,00%	36,37%	0,04%	24,80%
	25,43%	49,36%	32,94%	18,45%	0,75%	13,05%
TC043	30,01%	63,11%	25,61%	36,37%	0,45%	28,60%
	43,68%	54,46%	30,34%	18,45%	5,62%	14,90%

continua...

continuação...

Apêndice 4 - Percentuais de imunomarcção da subpopulação T nas regiões estudadas (córtex e medula), do subgrupo NDS. Nas linhas brancas estão representados os valores da região cortical e nas linhas cinzas estão representados os valores da região da região medular

AREA IHQ / AREA CAMPO						
CASO	CD5	CD2	CD4	CD8	FOXP3	CD1a
TC044	55,30%	59,08%	35,38%	43,04%	0,19%	25,49%
	56,89%	50,55%	24,34%	24,73%	3,33%	17,35%
TC045	61,47%	70,68%	14,37%	25,53%	0,11%	27,23%
	50,56%	47,31%	21,49%	17,61%	3,26%	11,44%
TC046	47,96%	63,23%	23,32%	29,36%	0,06%	25,38%
	71,63%	48,75%	24,96%	19,45%	3,68%	10,17%
TC047	48,80%	57,05%	25,73%	41,40%	0,28%	34,13%
	52,98%	51,85%	20,42%	39,60%	0,92%	13,79%
TC056	60,56%	64,06%	44,89%	22,70%	0,13%	28,99%
	43,84%	48,65%	27,59%	20,62%	3,30%	15,90%

Apêndice 5 - Percentuais de imunomarcção de macrófagos, células epiteliais e células NK, nas regiões de córtex e medula, caso a caso, do subgrupo NDS. Nas linhas brancas estão representados os valores da região cortical e nas linhas cinzas estão representados os valores da região da região medular

CASO	AREA IHQ / AREA CAMPO				
	CD68	CD163	AE1/AE3	S100	CD56
TC001	0,22%	7,62%	15,12%	0,94%	0,19%
	0,15%	1,32%	25,05%	10,96%	0,28%
TC007	0,19%	3,03%	12,72%	0,92%	0,13%
	0,17%	1,87%	24,75%	25,95%	1,08%
TC011	0,10%	6,86%	8,89%	1,13%	0,14%
	0,07%	4,86%	27,55%	24,50%	0,70%
TC014	0,36%	4,52%	6,21%	1,23%	0,08%
	0,21%	2,86%	20,66%	26,01%	0,42%
TC015	0,46%	3,52%	10,89%	0,52%	0,20%
	0,08%	3,44%	20,67%	19,68%	0,51%
TC016	1,01%	9,27%	47,95%	1,85%	0,40%
	0,08%	4,53%	45,21%	17,24%	0,69%
TC017	0,08%	5,05%	34,47%	0,60%	0,06%
	0,05%	4,27%	44,80%	15,01%	0,29%
TC029	0,29%	6,04%	5,73%	1,07%	0,77%
	0,10%	3,62%	22,40%	16,44%	1,06%
TC031	0,08%	6,12%	11,47%	0,88%	0,42%
	0,03%	1,67%	33,26%	24,90%	1,01%
TC032	0,09%	4,18%	12,73%	1,82%	0,26%
	0,04%	3,39%	26,96%	13,96%	0,76%
TC033	0,31%	4,40%	15,10%	0,82%	0,47%
	0,08%	2,87%	28,08%	17,03%	0,96%
TC35	1,21%	3,13%	21,11%	4,19%	0,54%
	1,07%	5,30%	37,88%	25,50%	0,66%
TC038	0,20%	4,63%	9,40%	0,64%	0,18%
	0,05%	4,29%	29,50%	17,98%	0,80%
TC039	0,30%	3,54%	4,15%	1,26%	0,45%
	0,19%	3,19%	24,30%	28,63%	1,19%
TC040	0,19%	3,99%	6,24%	0,61%	0,52%
	0,12%	2,74%	32,61%	25,37%	1,99%
TC043	0,30%	7,75%	46,02%	1,27%	0,26%
	0,08%	4,64%	31,14%	18,87%	0,26%

continua...

continuação...

Apêndice 5 - Percentuais de imunomarcção de macrófagos, células epiteliais e células NK, nas regiões de córtex e medula, caso a caso, do subgrupo NDS. Nas linhas brancas estão representados os valores da região cortical e nas linhas cinzas estão representados os valores da região da região medular

AREA IHQ / AREA CAMPO					
CASO	CD68	CD163	AE1/AE3	S100	CD56
TC044	0,41%	6,11%	2,91%	0,56%	0,13%
	0,11%	3,29%	20,02%	12,88%	1,57%
TC045	0,29%	4,74%	14,09%	0,67%	0,77%
	0,05%	3,19%	24,08%	10,40%	2,12%
TC046	0,23%	4,53%	10,53%	0,74%	0,46%
	0,14%	5,68%	22,15%	11,32%	0,62%
TC047	0,21%	3,98%	2,94%	0,64%	0,24%
	0,08%	2,16%	20,65%	15,24%	0,68%
TC056	0,38%	5,72%	27,26%	1,04%	0,55%
	0,22%	3,11%	44,28%	19,65%	1,12%

Apêndice 6 - Percentuais de imunomarcção da subpopulação B nas regiões de córtex e medula, caso a caso, do subgrupo DS. Nas linhas brancas estão representados os valores da região cortical e nas linhas cinzas estão representados os valores da região da região medular

CASO	AREA IHQ / AREA CAMPO		
	CD20	PAX5	CD23
TD001	0,11%	0,00%	0,03%
	16,08%	0,34%	2,13%
TD002	0,20%	0,00%	0,00%
	23,11%	4,08%	2,13%
TD003	0,32%	0,00%	0,03%
	20,32%	1,76%	2,61%
TD004	0,30%	0,02%	0,00%
	12,95%	4,04%	0,91%
TD005	0,00%	0,01%	0,03%
	16,24%	0,90%	5,75%
TD006	2,67%	0,68%	0,01%
	5,70%	2,10%	0,94%
TD007	0,05%	0,06%	0,05%
	13,77%	1,96%	2,98%
TD008	0,56%	0,05%	0,00%
	16,26%	2,86%	2,38%
TD009	0,50%	0,01%	0,00%
	18,41%	2,30%	4,04%
TD010	0,22%	0,01%	0,01%
	18,17%	3,86%	3,72%
TD012	0,21%	0,06%	0,07%
	14,18%	2,17%	2,68%
TD013	0,05%	0,02%	0,01%
	3,47%	0,26%	0,19%
TD014	0,07%	0,00%	0,11%
	24,73%	3,19%	6,55%
TD016	0,13%	0,01%	0,05%
	26,63%	5,50%	9,72%
TD017	0,50%	0,05%	0,15%
	23,06%	3,96%	5,30%
TD024	0,47%	0,10%	0,04%
	15,65%	6,43%	11,18%

Apêndice 7 - Percentuais de imunomarcção da subpopulação T nas regiões de córtex e medula, caso a caso, do subgrupo DS. Nas linhas brancas estão representados os valores da região cortical e nas linhas cinzas estão representados os valores da região da região medular

AREA IHQ / AREA CAMPO						
CASO	CD5	CD2	CD4	CD8	FOXP3	CD1a
TD001	16,65%	67,52%	2,50%	43,71%	0,11%	35,46%
	44,56%	45,67%	2,08%	18,11%	2,88%	8,07%
TD002	19,55%	69,01%	22,95%	45,93%	0,09%	45,20%
	37,28%	42,50%	11,62%	18,73%	3,99%	14,22%
TD003	39,13%	68,75%	10,90%	30,98%	0,05%	47,33%
	47,47%	48,80%	12,18%	21,11%	1,54%	11,10%
TD004	24,58%	61,64%	9,20%	23,23%	0,22%	25,19%
	30,12%	47,94%	5,75%	40,68%	4,10%	0,99%
TD005	22,94%	67,47%	13,87%	25,57%	0,11%	30,15%
	47,15%	52,80%	12,23%	28,44%	3,82%	8,06%
TD006	26,42%	28,11%	7,50%	18,05%	1,91%	0,19%
	29,90%	36,35%	8,79%	23,07%	3,39%	1,27%
TD007	44,15%	66,58%	15,80%	30,57%	0,27%	53,54%
	53,58%	55,33%	16,21%	19,69%	6,08%	11,02%
TD008	23,35%	70,07%	16,01%	31,36%	0,20%	21,33%
	46,43%	54,79%	23,50%	15,85%	4,78%	11,53%
TD009	34,36%	64,28%	18,36%	32,47%	0,19%	29,08%
	39,69%	58,64%	17,88%	19,42%	4,93%	19,37%
TD010	41,16%	70,77%	28,65%	46,87%	0,12%	37,46%
	42,18%	45,05%	16,72%	24,65%	3,64%	9,80%
TD012	35,76%	63,55%	27,63%	175,84%	0,41%	34,22%
	44,74%	47,00%	15,91%	20,11%	3,50%	10,50%
TD013	29,83%	64,36%	27,35%	37,89%	0,05%	25,37%
	39,38%	59,63%	19,82%	22,98%	2,02%	3,45%
TD014	33,19%	65,64%	26,22%	37,52%	0,08%	35,37%
	29,25%	44,27%	24,23%	24,88%	2,83%	18,52%
TD016	30,68%	64,04%	26,81%	38,20%	0,12%	33,27%
	39,39%	53,69%	18,54%	28,34%	3,76%	32,27%
TD017	43,62%	69,06%	35,36%	48,09%	0,36%	41,35%
	46,68%	54,28%	24,87%	22,89%	3,80%	13,97%
TD024	40,41%	72,65%	38,63%	37,40%	0,67%	45,61%
	45,31%	53,88%	37,27%	25,25%	12,49%	23,53%

Apêndice 8 - Percentuais de imunomarcção de macrófagos, células epiteliais e células NK, nas regiões de córtex e medula, caso a caso, do subgrupo DS. Nas linhas brancas estão representados os valores da região cortical e nas linhas cinzas estão representados os valores da região da região medular

AREA IHQ / AREA CAMPO					
CASO	CD68	CD163	AE1/AE3	S100	CD56
TD001	0,79%	3,41%	11,62%	0,54%	0,23%
	0,32%	1,44%	19,25%	36,08%	4,01%
TD002	0,66%	4,28%	10,11%	1,02%	0,13%
	0,37%	2,12%	26,55%	30,82%	2,51%
TD003	0,44%	3,07%	27,37%	0,98%	0,13%
	0,32%	1,05%	28,44%	25,55%	1,68%
TD004	2,08%	7,05%	19,69%	4,02%	0,52%
	1,72%	3,30%	32,04%	20,34%	1,93%
TD005	1,77%	4,00%	14,51%	1,49%	0,26%
	1,12%	1,96%	25,67%	34,14%	2,38%
TD006	5,45%	9,99%	35,35%	4,32%	1,54%
	0,29%	4,65%	31,66%	13,19%	2,42%
TD007	1,12%	3,90%	6,55%	0,44%	0,23%
	1,03%	2,99%	25,01%	21,12%	2,87%
TD008	1,30%	4,01%	13,84%	0,94%	0,21%
	1,24%	1,80%	22,40%	16,10%	1,87%
TD009	1,00%	3,42%	33,51%	1,66%	1,09%
	1,86%	2,57%	30,10%	22,04%	4,37%
TD010	1,14%	4,64%	12,50%	1,42%	0,80%
	2,33%	2,09%	24,49%	18,50%	3,58%
TD012	1,78%	6,75%	24,31%	0,36%	0,33%
	1,12%	1,04%	29,42%	31,74%	2,88%
TD013	0,74%	3,48%	21,53%	1,75%	1,49%
	3,02%	1,71%	21,59%	15,73%	4,00%
TD014	1,46%	5,02%	22,19%	1,18%	2,07%
	1,68%	2,06%	32,78%	27,47%	8,28%
TD016	0,41%	4,61%	21,08%	2,06%	1,05%
	0,72%	1,80%	33,66%	38,82%	2,00%
TD017	2,40%	8,18%	10,93%	2,51%	1,13%
	2,37%	2,67%	35,47%	39,55%	5,77%
TD024	1,86%	5,17%	24,60%	4,26%	6,88%
	1,91%	3,39%	43,43%	51,70%	5,51%

Apêndice 9 - Valores de p em todas as análises realizadas

Comparação 1	DS (C x M)	NDS (C x M)	C (DS x NDS)	M (DS x NDS)
CD20	<0,0001	<0,0001	0,0014	NS
CD5	0,0015	NS	0,003	NS
A1/A3	0,0011	<0,0001	0,0087	NS
CD68	NS	NS	<0,0001	<0,0001
S100	<0,0001	<0,0001	0,0363	0,0207
CD4	NS	NS	NS	NS
CD8	0,0393	0,0001	NS	NS
CD2	<0,0001	<0,0001	NS	NS
CD23	0,0001	0,0002	NS	NS
CD163	<0,0001	0,0028	NS	0,0037
PAX5	<0,0001	<0,0001	NS	NS
FOXP3	<0,0001	<0,0001	NS	0,0132
CD1a	<0,0001	<0,0001	NS	NS
CD56	0,0005	0,0001	0,0453	<0,0001
	Cortex			
Comparação 2	DS (M x F)	NDS (M x F)	Male (DS x NDS)	Female (DS x NDS)
CD20	NS	NS	0,003	NS
CD5	NS	NS	0,04	0,0083
A1/A3	NS	NS	NS	0,0268
CD68	NS	NS	0,0043	0,0003
S100	0,038	NS	NS	0,0083
CD4	NS	0,0431	NS	NS
CD8	NS	NS	NS	NS
CD2	NS	NS	NS	NS
CD23	NS	NS	NS	NS
CD163	NS	NS	NS	NS
PAX5	NS	NS	NS	NS
FOXP3	NS	NS	NS	NS
CD1a	NS	NS	0,0047	NS
CD56	NS	NS	NS	NS

continua...

continuação...

Apêndice 9 - Valores de p em todas as análises realizadas

	Medula			
	DS (M x F)	NDS (M x F)	Male (DS vs NDS)	Female (DS vs NDS)
CD20	NS	NS	NS	NS
CD5	NS	NS	NS	NS
A1/A3	NS	NS	NS	NS
CD68	NS	NS	0,0023	<0,0001
S100	NS	NS	NS	NS
CD4	NS	NS	NS	NS
CD8	NS	NS	NS	NS
CD2	NS	NS	NS	0,0268
CD23	NS	NS	NS	NS
CD163	NS	NS	0,028	NS
PAX5	NS	NS	NS	NS
FOXP3	NS	NS	NS	NS
CD1a	NS	NS	NS	NS
CD56	NS	NS	0,0007	0,0008
	grupo DS			
Comparação 3	Mini (C x M)	Non-p (C x M)	C (Mini x Non-p)	M (Mini x Non-p)
CD20	0,0046	<0,0001	NS	NS
CD5	NS	0,0146	NS	NS
A1/A3	0,0462	0,0066	NS	NS
CD68	NS	NS	NS	NS
S100	0,0026	<0,0001	0,0044	NS
CD4	NS	NS	NS	NS
CD8	NS	NS	NS	NS
CD2	0,003	0,0037	NS	NS
CD23	0,013	0,001	NS	NS
CD163	0,0275	0,0008	NS	NS
PAX5	NS	0,0001	NS	NS
FOXP3	0,0107	0,0005	NS	NS
CD1a	0,0044	0,0007	NS	NS
CD56	0,0029	0,0102	NS	NS

continua...

continuação...

Apêndice 9 - Valores de p em todas as análises realizadas

	grupo NDS			
	Mini (C x M)	Non-p (C x M)	C (Mini x Non-p)	M (Mini x Non-p)
CD20	0,0002	<0,0001	NS	NS
CD5	NS	NS	NS	NS
A1/A3	0,0136	<0,0001	NS	NS
CD68	NS	0,0062	NS	NS
S100	0,0006	<0,0001	NS	NS
CD4	NS	NS	0,0136	NS
CD8	NS	NS	NS	NS
CD2	<0,0001	<0,0001	NS	NS
CD23	0,0008	0,0029	NS	NS
CD163	NS	0,0013	NS	0,0097
PAX5	0,0018	<0,0001	NS	NS
FOXP3	<0,0001	0,0002	NS	0,0042
CD1a	0,0002	<0,0001	NS	NS
CD56	NS	0,001	NS	NS
	Cortex		Medula	
Comparação 4	Mini (DS x NDS)	Non-p (DS x NDS)	Mini (DS x NDS)	Non-p (DS x NDS)
CD20	0,0242	0,026	NS	NS
CD5	0,0121	0,030	NS	NS
A1/A3	NS	0,0026	NS	NS
CD68	0,0364	<0,0001	0,0424	<0,0001
S100	NS	0,0001	0,0242	NS
CD4	NS	NS	NS	NS
CD8	NS	NS	NS	NS
CD2	NS	NS	NS	NS
CD23	NS	NS	NS	NS
CD163	NS	NS	NS	NS
PAX5	NS	NS	NS	NS
FOXP3	NS	NS	NS	NS
CD1a	0,0242	NS	NS	NS
CD56	NS	0,0047	NS	NS