

## Avaliação da migração de neutrófilos e da frequência relativa de linfócitos CD4+/CD8+ em crianças com síndrome de Down e controles

*Evaluation of both neutrophil migration and the relative frequency of CD4+/CD8+ lymphocytes in children with Down syndrome and controls*

Artur Kautzmann Filho<sup>1,2</sup>, Patrícia Dias de Araújo<sup>1,2</sup>, Fernanda Kliemann<sup>2</sup>, Amanda Tavares Mello<sup>2</sup>, Paula Colling Klein<sup>2</sup>, Stéfanie Muraro<sup>2</sup>, Virgínia Tronco<sup>2</sup>, Liana Antunes<sup>2</sup>, Bárbara Nery Porto<sup>1,2</sup>, Ana Paula Duarte de Souza<sup>1,2</sup>, Leonardo A. Pinto<sup>1,2</sup>✉

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Pediatria e Saúde da Criança, Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

<sup>2</sup> Centro Infant, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

*Este artigo é resultante da Dissertação apresentada pelo autor Artur Kautzmann Filho ao Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Saúde da Criança. Agência de Fomento: FAPERGS, edital ARD 2011.*

### RESUMO

**Objetivos:** Avaliar a migração de neutrófilos e a frequência relativa de linfócitos CD4+/CD8+ em crianças com síndrome de Down e controles saudáveis.

**Métodos:** Este foi um estudo de caso-controle realizado no Instituto de Pesquisas Biomédicas, no Hospital São Lucas da PUCRS. Os pacientes do grupo de estudo foram selecionados por uma amostragem de conveniência, representando todas as crianças com síndrome de Down e idade entre três e 13 anos, que frequentavam os ambulatórios de Pediatria e de Otorrinolaringologia do Hospital São Lucas da PUCRS e do Kinder – Centro de Integração da Criança Especial, em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, nos meses de janeiro e dezembro de 2012. Para o grupo controle foram recrutadas crianças saudáveis e sem síndrome de Down, participantes de outro estudo em andamento no Instituto de Pesquisas Biomédicas. Foram selecionados os pacientes com maior volume de células armazenadas em criotubos. Para avaliar os parâmetros da resposta imune, foram realizados ensaio de quimiotaxia de neutrófilos e imunofenotipagem de células T CD4+ e CD8+. Associações foram avaliadas pelo teste do qui-quadrado, t de Student ou Mann-Whitney. Todos os testes foram bidirecionais e as diferenças foram consideradas significativas quando p menor que 0,05.

**Resultados:** Foram incluídos 19 pacientes (13 com síndrome de Down e seis controles), com médias de idade de 8,13 e 9,83 anos, respectivamente. Não foram observadas alterações significativas no grupo com síndrome de Down em relação à capacidade de migração dos neutrófilos. Houve uma tendência a valores percentuais menores de células T CD4+ e maiores de CD8+ para o grupo com síndrome de Down. Houve diferença significativa na relação CD4+/CD8+ entre os dois grupos, sendo a mesma menor no grupo com síndrome de Down.

**Conclusões:** Este estudo sugere que os pacientes com síndrome de Down apresentam uma taxa CD4+/CD8+ diminuída, o que pode contribuir para as infecções frequentes e recorrentes nessas crianças.

**DESCRITORES:** síndrome de down; imunidade; relação CD4-CD8; criança; infecção.

### ABSTRACT

**Aims:** To evaluate neutrophil migration and the relative frequency of CD4+/CD8+ lymphocytes in children with Down syndrome and in healthy controls.

**Methods:** This was a case-control study carried out at the Institute of Biomedical Research, affiliated with São Lucas Hospital of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS). Patients with Down syndrome were selected by convenience sampling, including all children with Down syndrome aged 3 to 13 years treated at the Pediatric and Otolaryngology Outpatient Clinics of São Lucas Hospital and at Kinder – Center for Children with Special Needs, in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Brazil, between January and December 2012. Healthy children without Down syndrome, participants in another ongoing study conducted by Institute of Biomedical Research, were recruited to the control group. Those patients with the largest volume of cells stored in cryotubes were selected. A neutrophil chemotaxis assay and immunophenotyping of CD4+ and CD8+ T cells were performed to evaluate the functionality of the immune response. Associations were assessed by the chi-squared test, Student's t test, or Mann-Whitney's test. All tests were bidirectional, and p values less than 0.05 were regarded as statistically significant.

**Results:** This study included 19 patients (13 with Down syndrome and six controls), with a mean age of 8.13 and 9.83 years, respectively. No significant changes concerning neutrophil migration were observed in the Down syndrome group. However, patients with Down syndrome tended to have a lower rate of CD4+ T cells and a higher rate of CD8+ T cells. The CD4+/CD8+ ratio revealed significant difference between the groups, being lower in patients with Down syndrome.

**Conclusions:** This study suggests that patients with Down syndrome show a decreased CD4+/CD8+ ratio, which may contribute to the frequent and recurrent infections in these children.

**KEY WORDS:** down syndrome; immunity; CD4-CD8 ratio; child; infection.

**Recebido:** novembro, 2014

**Aceito:** março, 2015

**Publicado:** abril, 2015

✉ Correspondência: [leonardo.pinto@pucrs.br](mailto:leonardo.pinto@pucrs.br)



Este artigo está licenciado sob forma de uma licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional, que permite uso irrestrito, distribuição e reprodução em qualquer meio, desde que a publicação original seja corretamente citada. [http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.pt\\_BR](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.pt_BR)

## INTRODUÇÃO

A síndrome de Down (SD) é a anomalia cromossômica mais comum entre os recém-nascidos vivos [1]. Essa síndrome apresenta uma variedade de características dismórficas e malformações congênitas, associadas frequentemente com deficiências imunológicas [2] e infecções concomitantes [3]. A incidência descrita para a SD é de um a cada 600 a 800 nascidos vivos [4].

As infecções respiratórias são a causa mais comum de internação hospitalar em crianças, incluindo aquelas com SD. Os principais fatores de risco para infecções respiratórias graves em lactentes incluem prematuridade, doenças pulmonares crônicas e cardiopatias congênitas, estas últimas comuns na SD [5,6]. Além disso, a SD é considerada um fator de risco independente para hospitalização por infecções por vírus respiratórios [7]. Isso poderia ser explicado considerando que as crianças portadoras de SD podem apresentar alterações da função pulmonar ou uma maturação imunológica anormal [8]. Existem evidências de que as crianças com SD podem apresentar uma maior suscetibilidade às infecções virais e bacterianas [9,10].

A ativação da imunidade inata é fator crucial na primeira linha de defesa contra microrganismos. Os neutrófilos são as primeiras células a chegar ao sítio de infecção e, uma vez ativadas, são capazes de fagocitar microrganismos e produzir espécies reativas de oxigênio, que são moléculas com atividade microbicida [6]. Alguns estudos sugerem que pacientes com SD possuem menor capacidade migratória de neutrófilos em relação a controles saudáveis. Porém, existe controvérsia com relação à capacidade fagocítica e de produção de espécies reativas de oxigênio por essas células. Como existem estudos com resultados conflitantes com relação às funções efetoras de neutrófilos, é importante avaliar a biologia e a capacidade efetora dessas células em crianças portadoras de SD.

Estudos têm descrito que anormalidades nas células T presentes em crianças portadoras de SD podem ser explicadas por uma disfunção no timo, e sugerem que essa alteração pode ser consequência de uma senescência precoce do sistema imune [11]. Os números de células T, B e natural killer (NK) circulantes estão reduzidos em pessoas com SD, e sua resposta a mitógenos é ineficiente [12]. Além disso, esses pacientes podem apresentar níveis diminuídos de linfócitos T CD4+ e níveis elevados de linfócitos T CD8+ comparados com indivíduos saudáveis, apresentando alteração na taxa CD4+/CD8+.

Entretanto, esses trabalhos avaliaram somente lactentes e pré-escolares até cinco anos [13]. Como as contagens de linfócitos CD4+ e CD8+ podem mudar com a idade, é relevante avaliar essas contagens e a relação CD4+/CD8+ também em crianças em idade escolar.

Os mecanismos que levam os pacientes com SD a apresentarem infecções respiratórias e hospitalizações frequentes ainda não foram totalmente esclarecidos, podendo ser decorrentes de alterações específicas do sistema imune. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar migração de neutrófilos, frequência de linfócitos CD4+ e CD8+ e relação CD4+/CD8+ em crianças com SD e controles.

## MÉTODOS

### Delineamento e amostra

Um estudo de caso-controle foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Clínica e Experimental, localizado no Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB), no Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (HSL-PUCRS). A amostra do estudo foi selecionada por conveniência, por meio de convite aos responsáveis legais de crianças com SD com idades entre três e 13 anos, recrutadas nos ambulatórios de Pediatria e de Otorrinolaringologia do HSL-PUCRS e no Kinder – Centro de Integração da Criança Especial, em Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Foram incluídos os pacientes que preenchem esses critérios de inclusão durante o período de recrutamento (meses de janeiro e dezembro de 2012). No grupo controle (cerca de um controle para cada dois casos), foram incluídas crianças saudáveis e sem SD, participantes de outro estudo em andamento no IPB (“Estudo de prevalência de asma em uma amostra de crianças brasileiras e caracterização de fenótipos clínicos, marcadores biológicos e funcionais”). Foram selecionados os pacientes com maior volume de células armazenadas em criotubos. Não houve pareamento específico por sexo e idade, porém as médias de idade foram comparadas e incluídas na análise, para testar a influência dessa variável.

### Ética

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. A assinatura do termo de consentimento foi obtida junto ao responsável legal de cada criança, aguardando-se a autorização para participação do paciente antes de iniciar qualquer procedimento. A coleta de sangue

periférico venoso (3-10 mL) dos pacientes foi realizada no ambulatório de pediatria do HSL-PUCRS ou no laboratório de Fisiologia Respiratória do IPB. Nenhum paciente apresentava sinais de infecção aguda no momento da coleta de sangue.

### Separação de monócitos e neutrófilos humanos

Os monócitos e os neutrófilos foram isolados do sangue periférico dos pacientes com SD e dos controles utilizando-se gradientes de Histopaque-1077 (para a separação de monócitos) e Histopaque-1119 (para a separação de neutrófilos) simultaneamente. As células foram contadas em microscópio óptico, para análise da pureza e viabilidade.

### Ensaio de quimiotaxia de neutrófilos humanos

Para avaliar a capacidade dos neutrófilos dos sujeitos com SD de responder a um estímulo quimiotático, essas células foram estimuladas a migrar em direção às moléculas quimiotáticas clássicas para neutrófilos. Para isso, os ensaios de quimiotaxia foram feitos em sistema Transwell (Corning, Lowell, MA, EUA), usando uma membrana de policarbonato de 5 µm [14]. O indutor da quimiotaxia de neutrófilos interleucina-8 (1 nM), foi adicionado nos poços inferiores da placa em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, na presença de 1% de soro fetal bovino, em um volume de 600 µL. Os neutrófilos suspensos em meio RPMI 1640 foram adicionados nos poços superiores da placa ( $2 \times 10^5$  células/100µL) e incubados por duas horas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após a incubação, os neutrófilos que migraram para os poços inferiores foram coletados e contados em câmara de Neubauer. A migração dos neutrófilos dos pacientes com SD foi comparada com a migração dos neutrófilos dos sujeitos-controle.

### Imunofenotipagem

As células mononucleares foram fixadas com 0,5% de formaldeído e marcadas na concentração de  $5 \times 10^6$ /mL com anticorpos anti-CD8 FITC (isotiocianato de fluoresceína) (40 µg/mL), anti-CD4 PE (ficoeritrina) (2 µg/mL) e anti-CD3 APC (aloficocianina) (2 µg/mL) (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA) por 30 minutos a 4°C e, em seguida, foram lavadas com tampão de citometria contendo 0,01% de azida de sódio e 1% de soro fetal bovino em solução salina (PBS). As células foram avaliadas no citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA) e os dados adquiridos foram analisados utilizando o programa FlowJo (TreeStar).

### Análise estatística

Foram utilizados testes de proporções, descrições em média (desvio-padrão) e mediana (intervalo interquartil), conforme distribuição das variáveis. Associações entre as variáveis categóricas e desfechos dicotômicos foram avaliadas pelo teste do qui-quadrado. Associações entre variáveis categóricas e desfechos contínuos foram analisadas pelos testes t de Student e Mann-Whitney. As análises foram realizadas com os programas SPSS e GraphPad Prism 5. Todos os testes foram bidirecionais e as diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0.05$ .

### RESULTADOS

Foram incluídos no estudo 13 pacientes com SD e seis controles, os quais apresentavam média de idade de 8,13 e 9,83 anos, respectivamente, diferença não significativa. Da mesma forma, não houve diferença significativa nas variáveis sexo e etnia. A maior parte dos pacientes com SD incluídos no estudo tinha confirmação citogenética (**Tabela 1**).

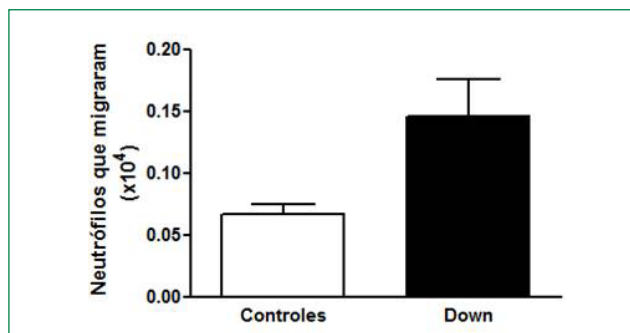
**Tabela 1.** Comparação entre os dados descritivos do grupo em estudo (crianças com síndrome de Down) e do grupo controle (crianças saudáveis, sem síndrome de Down). O recrutamento foi realizado em Porto Alegre entre 2011 e 2012.

Variáveis	Síndrome de Down (N = 13)	Controles (N = 6)	P*
Idade em anos, média ± desvio padrão	8,13 ± 1,99	9,83 ± 1,17	0,070
Sexo feminino, N (%)	10/13 (76,9)	2/6 (33,3)	0,067
Etnia caucasiana, N (%)	8/12 (66,7)	5/6 (83,3)	0,764
Cariótipo 47XXX, N (%)	9/12 (75)	–	–

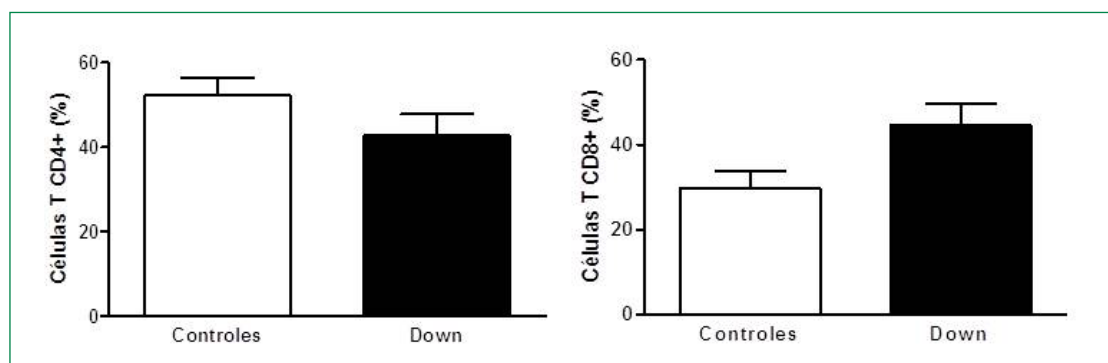
\* Teste t de Student para variável contínua (idade) e qui-quadrado para as variáveis categóricas.

Em relação à capacidade de migração dos neutrófilos dos pacientes com SD em comparação com os neutrófilos das crianças do grupo controle, não foram observadas alterações significativas no grupo com SD (**Figura 1**). Dessa forma, os neutrófilos de crianças portadoras de SD apresentaram capacidade preservada de responder a estímulos inflamatórios nesta amostra.

Por outro lado, as crianças portadoras de SD demonstraram uma tendência para valores reduzidos de linfócitos CD4+ e um percentual aumentado de CD8+ em comparação com as crianças controle (**Figura 2**). Além disso, 66,7% das crianças com SD apresentaram taxa CD4+/CD8+ menor que 1, enquanto nenhuma das crianças do grupo controle tiveram taxa CD4+/CD8+ menor que 1 ( $p=0,035$ ) (**Tabela 2**).



**Figura 1.** Migração de neutrófilos em crianças com síndrome de Down e controles. Neutrófilos de crianças com síndrome de Down e normais foram estimulados a migrar em direção a interleucina-8 (1 nM) por duas horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, os neutrófilos que migraram foram coletados e contados em câmara de Neubauer e o resultado expresso como número absoluto de neutrófilos (Teste t de Student:  $p=0,070$ ).



**Figura 2.** Contagem relativa de linfócitos CD4+ e CD8+ em crianças com síndrome de Down e controles. Células mononucleares do sangue periférico de crianças com síndrome de Down e normais foram marcadas com anticorpos anti-CD8 FITC (isotiocianato de fluoresceína), anti-CD4 PE (ficoeritrina), anti-CD3 APC (aloficocianina) por 30 minutos a 4°C. As células foram avaliadas por citometria de fluxo (citômetro modelo FACSCanto II, BD Biosciences, New Jersey, EUA) e o resultado expresso como percentual de células T CD4+ ( $p=0,268$ ) e CD8+ (Teste t de Student:  $p=0,073$ ).

**Tabela 2.** Comparação entre o grupo com síndrome de Down e o grupo controle, referente ao valor da relação CD4+/CD8+ e ao número de crianças que apresentaram relação CD4+/CD8+ menor que 1 (fator de risco para imunodeficiência). As duas últimas colunas mostram dados da literatura para comparação.

	Este estudo			Estudo de Comans-Bitter et al. <sup>19</sup>	
	Grupo síndrome de Down (N=6)	Grupo controle (N=4)	P	Controles de 2-5 anos	Controles de 5-10 anos
Mediana da relação CD4+/CD8+	0,70	1,96	0,061*	1,60	1,20
Número de pacientes com CD4+/CD8+ < 1	4/6 (66,7)	0/4 (0,0)	0,035†	0/33 (0,0)	0/35 (0,0)

\* Teste de Mann-Whitney; † Teste do qui-quadrado.

## DISCUSSÃO

Estudos prévios sugerem que crianças com SD tenham risco aumentado para infecções do trato respiratório. A partir dos resultados do presente estudo, pode-se considerar que o maior número de infecções observadas em crianças com SD não está relacionado com a resposta imune inata, em consonância com Broers et al. [15], que propõem que a maior tendência a infecções respiratórias das crianças com SD possa ser causada por modificações na resposta imune adaptativa.

As infecções respiratórias agudas em geral representam um grande espectro, incluindo rinfaringites, sinusites, otites e pneumonias [3]. Essas enfermidades podem ter diferentes agentes etiológicos, principalmente vírus e bactérias, e são mais frequentes em crianças com SD [5]. Alguns fatores não imunológicos, incluindo alterações anatômicas, também podem contribuir para a maior suscetibilidade dos pacientes com SD, especialmente para infecções das vias aéreas superiores [16,17]. Além de diferentes conformações nas vias aéreas superiores, pessoas com SD apresentam alterações morfológicas das vias aéreas inferiores e do parênquima pulmonar [16], que também podem contribuir para a maior suscetibilidade a infecções. Ainda existe um baixo índice de sucesso ao se utilizarem os instrumentos de avaliação da função pulmonar em crianças com SD, o que dificulta o entendimento e o esclarecimento do papel dessas alterações morfofuncionais [3]. Por outro lado, muitos estudos têm sugerido uma importante interferência dos fatores imunológicos.

Estudos que avaliaram a função neutrofílica nos pacientes com SD apresentam resultados conflitantes [6]. Este estudo não demonstrou diferença na função de neutrófilos entre crianças e adolescentes com SD e controles. Este resultado parece não ter

sido influenciado pelo pequeno número amostral, já que a quantidade absoluta de neutrófilos com função quimiotática preservada foi significativamente maior nos pacientes com SD.

Outro importante componente da função imunológica nesses pacientes é a função dos linfócitos B e os níveis de imunoglobulinas. Cetiner et al. [11] avaliaram os níveis de imunoglobulinas em 32 pacientes com SD e 32 controles e não observaram diferenças significativas. Esse mesmo estudo avaliou número e função dos linfócitos T CD4+ e CD8+, descrevendo um aumento significativo no percentual de linfócitos CD8+ [11]. Esse achado é compatível com nossos resultados, que demonstram tendência para um número mais elevado de linfócitos CD8+ em crianças com SD, quando comparadas aos controles saudáveis. O fato desse achado não ter sido estatisticamente significativo pode ser decorrente do pequeno número amostral no presente estudo.

Por outro lado, quando se avaliou a relação CD4+/CD8+ menor que 1, que é um dos fatores de risco para imunodeficiências, verificou-se que 66,7% dos pacientes com SD apresentaram essa alteração, contra nenhum dos pacientes do grupo controle. Essa diferença foi estatisticamente significativa e pode, em parte, contribuir para o número mais elevado de infecções respiratórias agudas observado em crianças com SD. A diferença encontrada na taxa CD4+/CD8+ pode ser causada pelo aumento dos linfócitos CD8+, redução dos linfócitos CD4+, ou, mais provavelmente, por ambos.

Esse achado, em conjunto com a análise de estudos prévios, [6,11,18,19] sugere que os pacientes com SD apresentam uma taxa de linfócitos T CD4+/CD8+ reduzida em relação a controles normais. Dessa forma, é possível concluir que a taxa de linfócitos T CD4+/CD8+ reduzida poderia contribuir para as infecções recorrentes nessas crianças.

## REFERÊNCIAS

1. Malt EA, Dahl RC, Haugsand TM, Ulvestad IH, Emilsen NM, Hansen B, Cardenas YE, Skøld RO, Thorsen AT, Davidsen EM. Health and disease in adults with Down syndrome. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 2013;133(3):290-4. <http://dx.doi.org/10.4045/tidsskr.12.0390>
2. Trotta MB, Serro Azul JB, Wajngarten M, Fonseca SG, Goldberg AC, Kalil JE. Inflammatory and Immunological parameters in adults with Down syndrome. *Immun Ageing*. 2011;8(1):4. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4933-8-4>
3. Pandit C, Fitzgerald DA. Respiratory problems in children with Down syndrome. *J Paediatr Child Health*. 2012;48(3):E147-52. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1754.2011.02077.x>
4. Tenenbaum A, Chavkin M, Wexler ID, Korem M, Merrick J. Morbidity and hospitalizations of adults with Down syndrome. *Res Dev Disabil*. 2012;33(2):435-41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ridd.2011.09.026>



5. Bloemers BL(1), van Furth AM, Weijerman ME, Gemke RJ, Broers CJ, Kimpfen JL, Bont L. High incidence of recurrent wheeze in children with Down syndrome with and without previous respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2010;29(1):39-42. <http://dx.doi.org/10.1097/INF.0b013e3181b34e52>
6. Bloemers BL, Broers CJ, Bont L, Weijerman ME, Gemke RJ, van Furth AM. Increased risk of respiratory tract infections in children with Down syndrome: the consequence of an altered immune system. *Microbes Infect*. 2010;12(11):799-808. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2010.05.007>
7. Zachariah P, Ruttenber M, Simões EA. Down syndrome and hospitalizations due to respiratory syncytial virus: a population-based study. *J Pediatr*. 2012;160(5):827-31.e1. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2011.11.004>
8. Verstegen RHJ, van Gameren-Oosterom HBM, Fekkes M, Dusseldorp E, de Vries E, van Wouwe JP. Significant impact of recurrent respiratory tract infections in children with Down syndrome. *Child Care Health Dev*. 2013;39(6):801-9. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2214.2012.01413.x>
9. Morgan J. Why is periodontal disease more prevalent and more severe in people with Down syndrome? *Spec Care Dentist*. 2007;27(5):196-201. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1754-4505.2007.tb00346.x>
10. Kusters MA, Manders NC, de Jong BA, van Hout RW, Rijkers GT, de Vries E. Functionality of the pneumococcal antibody response in down syndrome subjects. *Vaccine*. 2013;31(52):6261-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.09.070>
11. Cetiner S, Demirhan O, Inal TC, Tastemir D, Sertdemir Y. Analysis of peripheral blood T-cell subsets, natural killer cells and serum levels of cytokines in children with Down syndrome. *Int J Immunogenet*. 2010;37(4):233-7. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-313X.2010.00914.x>
12. Yilmaz C, Dogan M, Basarslan F, Yilmaz N, Yuca S, et al. Evaluation of Lymphocyte Subgroups in Children With Down Syndrome. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2013 Nov 14. [Epub ahead of print]. <http://dx.doi.org/10.1177/1076029613511521>
13. Cocchi G, Mastrocola M, Capelli M, Bastelli A, Vitali F, Corvaglia L. Immunological patterns in young children with Down syndrome: is there a temporal trend? *Acta Paediatr*. 2007;96(10):1479-82. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1651-2227.2007.00459.x>
14. Porto BN, Alves LS, Fernández PL, Dutra TP, Figueiredo RT, Graça-Souza AV, Bozza MT. Heme Induces Neutrophil Migration and Reactive Oxygen Species Generation through Signaling Pathways Characteristic of Chemotactic Receptors. *J Biol Chem*. 2007;282(33):24430-6. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M703570200>
15. Broers CJ, Gemke RJ, Weijerman ME, Kuik DJ, van Hoogstraten IM, van Furth AM. Frequency of lower respiratory tract infections in relation to adaptive immunity in children with Down syndrome compared to their healthy siblings. *Acta Paediatr*. 2012;101(8):862-7. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1651-2227.2012.02696.x>
16. McLean L, MacCormick J, Robb I, Carpenter B, Pothos M. Cilia ultrastructure in children with Down syndrome. *J Otolaryngol*. 2003;32(6):379-83. <http://dx.doi.org/10.2310/7070.2003.13923>
17. Piatti G, Allegra L, Ambrosetti U, De Santi MM. Nasal ciliary function and ultrastructure in Down syndrome. *Laryngoscope*. 2001;111(7):1227-30. <http://dx.doi.org/10.1097/00005537-200107000-00016>
18. Tanaka S, Teraguchi M, Hasui M, Taniuchi S, Ikemoto Y, Kobayashi Y. Idiopathic CD4+ T-lymphocytopenia in a boy with Down syndrome. Report of a patient and a review of the literature. *Eur J Pediatr*. 2004;163(2):122-3. <http://dx.doi.org/10.1007/s00431-003-1375-8>
19. Comans-Bitter WM, de Groot R, van den Beemd R, Neijens HJ, Hop WC, Groeneveld K, Hooijkaas H, van Dongen JJ. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. *J Pediatr*. 1997;130(3):388-93. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3476\(97\)70200-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3476(97)70200-2)