

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

JANINE SCHINCARIOL SABINO

DESREGULAÇÃO NO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DAS VIAS DE APOPTOSE RELACIONADAS AO INÍCIO DOS SINTOMAS NA ADOLESCÊNCIA DA VARIANTE *TNFRSF13B/*TACI p.C104R

CAMPINAS

2021

JANINE SCHINCARIOL SABINO

DESREGULAÇÃO NO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DAS VIAS DE APOPTOSE RELACIONADAS AO INÍCIO DOS SINTOMAS NA ADOLESCÊNCIA DA VARIANTE *TNFRSF13B/*TACI p.C104R

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências, na área de Saúde da Criança e do Adolescente.

ORIENTADORA: MARIA MARLUCE DOS SANTOS VILELA COORIENTADOR: MARCELO TEOCCHI

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA JANINE SCHINCARIOL SABINO, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. MARIA MARLUCE DOS SANTOS VILELA.

CAMPINAS

2021

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas Ana Paula de Morais e Oliveira - CRB 8/8985

Sabino, Janine Schincariol, 1982-

Sa13d

Desregulação no perfil de expressão gênica das vias de apoptose relacionadas ao início dos sintomas na adolescência da variante TNFRSF13B/TACI p.C104R / Janine Schincariol Sabino. - Campinas, SP: [s.n.], 2021.

Orientador: Maria Marluce dos Santos Vilela.

Coorientador: Marcelo Teocchi.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

 TNFRSF13B. 2. Apoptose. 3. Expressão gênica. 4. Autoimunidade. 5. Disturbios linfoproliferativos. I. Vilela, Maria Marluce dos Santos, 1947-. II. Teocchi, Marcelo Ananias. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas, IV. Título,

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Deregulation in the gene expression of apoptosis pathways related to the onset of symptoms in adolescence of the TNFRSF13B;TACI p.C104R variant

Palavras-chave em inglês:

TNFRSF13B

Apoptosis

Gene expression

Autoimmunity

Lymphoproliferative disorders

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Maria Marluce dos Santos Vilela [Orientador]

Dewton de Moraes Vasconcelos

Otávio Cabral Marques

Margareth Castro Ozelo

Sara Terezinha Olalla Saad

Data de defesa: 15-12-2021

Programa de Pós-Graduação: Saúde da Criança e do Adolescente

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a) - ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0001-6502-1206 - Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/3110378027564001

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

JANINE SCHINCARIOL SABINO

ORIENTADOR(A): MARIA MARLUCE DOS SANTOS VILELA

COORIENTADOR: MARCELO TEOCCHI

MEMBROS:

- 1. PROF. DR. MARIA MARLUCE DOS SANTOS VILELA
- 2. PROF. DR. DEWTON DE MORAES VASCONCELOS
- 3. PROF. DR. OTÁVIO CABRAL MARQUES
- 4. PROF. DR. SARA TERESINHA OLALLA SAAD
- 5. PROF. DR. MARGARETH CASTRO OZELO

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 15/12/2021

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese de doutorado a todas as pessoas que me apoiaram durante esse processo. Aos meus pais que sempre me incentivaram a estudar e seguir em frente, além de serem meu grande exemplo de persistência mesmo em meio as diversidades. À minha família por ser meu alicerce em todas as fases da minha vida. Ao meu marido por todo amor, apoio e compreensão em dias turbulentos. À minha filha sempre amorosa e que me faz ser uma pessoa melhor a cada dia. Dedico esse título de doutora a todos vocês com muito amor e com a certeza de que estarão presentes em todas minhas próximas conquistas!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por ter me dado a grande oportunidade de estudar e ter a chance de realizar grandes conquistas em minha vida.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela que abriu meus horizontes, ensinoume principalmente a pensar. Foi fundamental na transmissão de experiências, na criação e solidificação de saberes e nos meus pequenos sucessos. Sua paixão pela imunologia, seu dom de ensinar e carinho em cuidar de seus pacientes é admirável. Agradeço também a confiança que depositou em mim e em meu trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Marcelo Ananias Teocchi mesmo a distância sempre colaborou com o estudo e conseguiu dividir seus ensinamentos e experiência. Obrigada pela amizade, pelo incentivo, pelas suas reflexões críticas.

Aos pacientes e familiares pela disponibilidade em contribuir com este estudo.

Ao Ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Hospital de Clínicas e a todos os seus profissionais pela contribuição a esta pesquisa.

Aos funcionários do CIPED, dentre eles funcionários da limpeza, estagiários, técnicos, enfermeira, biologistas, administradores e professores por todo o auxílio durante esses anos.

Amigos e amigas do Laboratório de Imunologia Pediátrica pela convivência e amizade. Em especial Lia Furlaneto Marega, minha amiga e colaboradora deste trabalho, me auxiliou na realização dos experimentos e análises.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro através do processo nº 2016/25615-6.

Ao Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD).

Aos colegas de trabalho do LaCTAD pela amizade e companheirismo. Sem eles não teria sido possível conciliar trabalho e doutorado. Muito obrigada!

Ao Laboratório de Virologia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

Aos Laboratório de Hemoglobina e Genoma do Centro de Hematologia e Hemoterapia (Hemocentro).

Aos meus pais pela sólida formação dada, que me proporcionou a continuidade nos estudos até a chegada a este doutorado. Sempre me incentivaram de todas as maneiras e me apoiaram em todos os momentos. Os meus eternos agradecimentos.

Ao meu marido e filha pelo amor, apoio incondicional, compreensão e paciência. Certamente, não teria conseguido sem vocês ao meu lado.

A elaboração deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração, estímulo e empenho de diversas pessoas. Gostaria, por este fato, de expressar toda a minha gratidão e apreço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta tarefa se tornasse uma realidade. À todos quero manifestar os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A imunodeficiência comum variável (ICV) é caracterizada por infecções recorrentes, hipogamaglobulinemia de IgA e IgG ou IgM e IgG, baixa resposta à antígenos vacinais, número normal ou baixo de linfócitos B, defeitos na produção de citocinas e desregulação imunológica, com maior risco para doença autoimune, doença intersticial pulmonar (ILD) e granulomatosa (GLID), esplenomegalia e linfadenopatia benigna e maligna.

Nosso objetivo é identificar em uma coorte de 18 pacientes com fenótipo de linfoproliferação, autoimunidade e hipogamaglobulinemia, o diagnóstico genético molecular através Sequenciamento Total do Exoma (STE). Objetivos específicos, nos pacientes com mutação no gene TNFRSF13B, posição p.C104R, analisar: os membros da família; a expressão da proteína CD267 nos linfócitos B; as células viáveis e em apoptose; a expressão gênica das vias intrínseca e extrínseca da apoptose e no plasma, avaliar IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 e TGF-β. Sujeitos: Após aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa- UNICAMP, foram selecionados seis indivíduos de três famílias não aparentadas com linfoproliferação, autoimunidade e hipogamaglobulinemia, sob acompanhamento na Divisão de Alergia-Imunologia Pediátrica da UNICAMP. DNA genômico do sangue foi extraído para o STE e a validação da variante foi realizada por sequenciamento Sanger. Para análise dos efeitos da variante TNFRSF13B na expressão dos genes envolvidos nas vias de sinalização da apoptose, foi realizado extração de RNA para RT-PCR, Array em placa e expressão gênica única. Para expressão da proteína de membrana CD267 (TACI) e o ensaio de apoptose foi utilizado a citometria de fluxo e para dosagem no plasma de IL-2, IL-5, IL-6, IL-8 e IL-10, a técnica de Multiplex. Resultados e discussão: Pacientes e suas mães assintomáticas apresentam a variante p.C104R no gene TNFRSF13B, sugerindo ampliar as investigações para entendimento da fisiopatologia da doença. Em relação aos controles, os probandos apresentaram menor número de CD19+CD27+, redução da expressão de CD267+ e maior número de células viáveis, mas sem diferenças estatisticamente significativas. TNFRSF13B codifica a proteína TACI, com funções na sobrevida, apoptose, diferenciação dos linfócitos B e por recombinação somática (CSR) atua na mudança de IgM para IgA e IgG. O STE mostrou ausência de variantes entre os genes investigados das vias de sinalização da apoptose no array. Contudo, o estudo da expressão gênica revelou hiperexpressão de genes próapoptóticos BCL2L11, BCL2L13, BNIP3L, TRADD e NOD2, e de genes antiapoptóticos BCL2L1, BCL2A1, BIRC3, BIRC5, BIRC6, BIRC8, NAIP e TNFRSF1B como também hipoexpressão de genes proapoptóticos APAF1, BCL10, BOK, CARD6, CASP3, CASP4, CASP5, CASP6, CASP8, FASL, TNFRSF21, DAPK1, DIABLO, NLRP1 e de genes antiapoptóticos BCL2A1, BCL2, BIRC3, BIRC6, BIRC8, CHUK, RIPK2 e XIAP. Esta desregulação predominou entre os genes próapoptóticos da via intrínseca mitocondrial. O probando com fenótipo mais grave de linfoproliferação recidivante apresentava menor número de genes desregulados e aquele com fenótipo leve, maior número de genes desregulados. Especulamos que a desregulação na expressão gênica seja um mecanismo compensatório positivo do organismo, na tentativa de controlar a doença. Nossos resultados e os da literatura sobre os efeitos da variante p.C104R, sugerem que além da sua haploinsuficiência e penetrância variável, ela pode ser deficiente na sinalização da via canônica NF- $\kappa \mathrm{B}$ e exacerbar a sinalização da via não canônica, promovendo autoreatividade e linfoproliferação de linfócitos B naive através da hiperexpressão de genes antiapoptóticos BCL2L1, BCL2A1, BIRC3, BIRC5, BIRC6, BIRC8, NAIP e TNFRSF1B induzindo o organismo a usar mecanismos compensatórios na tentativa de alcançar uma regulação.

Palavras-Chave: TNFRSF13B; TACI; CD267; apoptose; linfoproliferação; autoimunidade; expressividade variável; penetrância incompleta; expressão gênica; vias de sinalização da apoptose; p.C104R.

ABSTRACT

immunodeficiency (CVI) is characterized Common variable by recurrent infections, hypogammaglobulinemia of IgA and IgG or IgM and IgG, low response to vaccine antigens, normal or low number of B lymphocytes, defects in cytokine production and immune dysregulation, with increased risk for autoimmune disease, interstitial lung disease (ILD) and granulomatous disease (GLID), splenomegaly, and benign and malignant lymphadenopathy. Our objective is to identify, in a cohort of 18 patients with lymphoproliferation, autoimmunity and hypogammaglobulinemia phenotype, the molecular genetic diagnosis through Total Exome Sequencing (STE). As specific objectives, in patients with a mutation in the TNFRSF13B gene, in position p.C104R, to analyze: family members; the expression of the CD267 protein on B lymphocytes; viable and apoptotic cells; gene expression of the intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis and in plasma, evaluate IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 and TGF-β. Subjects: After approval by the Ethics and Research Committee - UNICAMP, six individuals from three unrelated families were selected from a cohort of 18 patients with lymphoproliferation, autoimmunity and hypogammaglobulinemia, under follow-up at the Division of Pediatric Allergy-Immunology at UNICAMP. Blood genomic DNA was extracted for STE and variant validation was performed by Sanger sequencing. To analyze the effects of the TNFRSF13B variant on the expression of genes involved in apoptosis signaling pathways, RNA extraction for RT-PCR, plate array and single gene expression were performed. For expression of CD267 membrane protein (TACI) and the apoptosis assay, flow cytometry was used and for plasma dosage of IL-2, IL-5, IL-6, IL-8 and IL-10, the technique of Multiplex. Results and discussion: Patients and their asymptomatic mothers have the p.C104R variant in the TNFRSF13B gene, suggesting further investigations to understand the pathophysiology of the disease. Compared to controls, the probands had a lower number of CD19+CD27+, reduced expression of CD267+ and a higher number of viable cells, but without statistically significant differences. TNFRSF13B encodes the TACI protein, with functions in survival, apoptosis, differentiation of B lymphocytes and by somatic recombination (CSR) it acts in the change from IgM to IgA and IgG. STE showed absence of variants among the investigated genes of the apoptosis signaling pathways in the array. However, the study of gene expression revealed hyperexpression of proapoptotic genes BCL2L11, BCL2L13, BNIP3L, TRADD and NOD2, and antiapoptotic genes BCL2L1, BCL2A1, BIRC3, BIRC5, BIRC6, BIRC8, NAIP1, TNFRSF1B and hypoexpression of proapoptotic genes APAF1, BCL10, BOK, CARD6, CASP3, CASP4, CASP5, CASP6, CASP8, FASL, TNFRSF21, DAPK1, DIABLO, NLRP1 and anti-apoptotic genes BCL2A1, BCL2, BIRC3, BIRC6, BIRC8 CHUK, RIPK2 and XIAP. Dysregulation predominated among proapoptotic genes of the intrinsic mitochondrial pathway. The proband with the most severe phenotype of relapsing lymphoproliferation had a lower number of dysregulated genes, and the one with a mild phenotype, a higher number of dysregulated genes. We speculate that the dysregulation in gene expression is a positive compensatory mechanism of the organism, in an attempt to control the disease. Our results, and those in the literature on the effects of the p.C104R variant, suggest that, in addition to its haploinsufficiency and variable penetrance, it may be deficient in NF- $\kappa \mathrm{B}$ canonical pathway signaling and exacerbate non-canonical pathway signaling, promoting lymphocyte autoreactivity and lymphoproliferation B naive through hyper-expression of anti-apoptotic genes BCL2L1, BCL2A1, BIRC3, BIRC5, BIRC6, BIRC8, NAIP and TNFRSF1B inducing the organism to use compensatory mechanisms in an attempt to achieve regulation.

Keywords: TNFRSF13B; TACI; CD267; apoptosis; lymphoproliferation; autoimmunity; variable expressiveness; incomplete penetrance; gene expression; apoptosis signaling pathways; p.C104R.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Estrutura da proteína transmembrana TACI e suas mutações em humanos
- Figura 2: As formas de ligantes para ativar TACI
- Figura 3: As atividades biológicas de TACI
- Figura 4: Heredograma dos pacientes
- Figura 5: Análise dos dados de citometria de fluxo e estratégia de gates dos linfócitos B
- **Figura 6:** Correlação da expressão de CD267 em linfócitos B de memória com as porcentagens de subtipos de linfócitos B, como linfócitos B, linfócitos B de memória, linfócitos B CD267+ e linfócitos B de memória CD267+
- Figura 7: Análise de dados de apoptose por citometria de fluxo
- Figura 8: Resultados em porcentagem de células viáveis e apoptóticas
- Figura 9: HeatMap dos genes envolvidos com a via extrínseca da apoptose
- **Figura 10:** Resultados dos índices de concordância e discordância da expressão gênica da via extrínseca da apoptose, entre os pacientes avaliados por famílias de genes no *array*
- Figura 11: HeatMap dos genes envolvidos com a via intrínseca e extrínseca da apoptose
- **Figura 12:** Avaliação da concordância e discordância na expressão gênica entre os pacientes no *array* da via intrínseca e extrínseca da apoptose
- **Figura 13:** Resultados dos índices de concordância e discordância da expressão gênica entre os pacientes avaliados por famílias de genes no *array* da via intrínseca e extrínseca da apoptose. A) PO1 x PO2 x PO3. B) PO2 (SRL+) x PO2. C) PO1 x PO2. D) PO2 x PO3. E) PO1 x PO3
- **Figura 14:** Expressão relativa dos genes *APAF1*, *TP53*, *FAS, FASLG*, *IL10*, *IL10RA*, *BCL2*, *BCL2L1*, *BCL2L14*, *BIRC8*, *BOK*, *TNFRSF21*, *CASP2* e *TNFRSF13B*
- **Figura 15:** Níveis de citocinas plasmáticas nos pacientes e em suas mães com mutação no gene *TNFRSF13B*

LISTA DE TABELAS

- **Tabela 1:** Genes da via extrínseca da apoptose examinados no *array*
- Tabela 2: Genes das via extrínseca e intrínseca da apoptose examinados no array
- Tabela 3: Lista dos genes estudados
- **Tabela 4:** Quantificação relativa dos genes da via extrínseca da apoptose em P01 e P02 (SRL+), previamente examinados no *array*
- **Tabela 5:** Expressão gênica da via extrínseca da apoptose no paciente P01 separado por famílias de genes
- **Tabela 6:** Expressão gênica da via extrínseca da apoptose no paciente PO2 (SRL+) separado por famílias de genes
- **Tabela 7:** Quantificação relativa dos genes de ambas as vias da apoptose em P01, P02 (SRL+ e SRL-) e P03, previamente examinados no *array*
- **Tabela 8:** Expressão gênica das via extrínseca e intrínseca da apoptose no paciente P01 separado por famílias de genes.
- **Tabela 9:** Expressão gênica das via extrínseca e intrínseca da apoptose no paciente PO2 (SRL+) separado por famílias de genes
- **Tabela 10:** Expressão gênica das via extrínseca e intrínseca da apoptose no paciente PO2 separado por famílias de genes.
- **Tabela 11:** Expressão gênica das via extrínseca e intrínseca da apoptose no paciente PO3 separado por famílias de genes.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μl Microlitro

% Porcentagem

°C Graus Celsius

ACTA1* Actin, Alpha 1, Skeletal Muscle

ACTB* Actin, Beta

APAF1* Apoptotic Peptidase Activating Factor 1

APC Aloficocianina (*Allophycocyanin*)

BAD* BCL2 associated agonist of cell death

BAK1* BCL2 Antagonist/Killer 1

BAX* BCL2-associated X protein

BBC3* BCL2 Binding Component 3

BCL2* B-cell CLL/lymphoma 2

BCAP31* B Cell Receptor Associated Protein 31

BCL2A1* BCL2 Related Protein A1

BCL2L1* BCL2 Like 1

BCL2L2* BCL2 Like 2

BCL2L10* *BCL2 Like 10*

BCL2L11* *BCL2 Like 11*

BCL2L13* *BCL2 Like 13*

BCL2L14* *BCL2 Like 14*

BCL3* B Cell CLL/Lymphoma 3

BCL10* B Cell CLL/Lymphoma 10

BCR* Breakpoint Cluster Region

BID* BH3 Interacting Domain Death Agonist

BIK* BCL2 Interacting Killer

BIRC2* Baculoviral IAP Repeat Containing 2

BIRC3* Baculoviral IAP Repeat Containing 3

BIRC5* Baculoviral IAP Repeat Containing 5

BIRC6* Baculoviral IAP Repeat Containing 6

BIRC7* Baculoviral IAP Repeat Containing 7

BIRC8* Baculoviral IAP Repeat Containing 8

BIM* BCL2L11 (Bcl-2-Like Protein 11)

Blimp-1* B-Lymphocyte-Induced Maturation Protein 1

BNIP3* BCL2 Interacting Protein 3

BNIP3L* BCL2 Interacting Protein 3 Like

BOK * BCL2 Family Apoptosis Regulator BOK

CARD6* Caspase Recruitment Domain Family Member 6

CARD9* Caspase Recruitment Domain Family Member 9

CARD18* Caspase Recruitment Domain Family Member 18

CASP1* Caspase 1

CASP2* Caspase 2

CASP3* Caspase 3

CASP4* Caspase 4

CASP5* Caspase 5

CASP7* Caspase 7

CASP8* Caspase 8

CASP9* Caspase 9

CASP10* Caspase 10

CASP14* Caspase 14

CD Grupamento de diferenciação (*Cluster of Differentiation*)

CD19 Marcador de linfócitos B (*B-Lymphocyte Antigen CD19*)

CD27 Marcador de linfócitos B de memória (Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily,

Member 7)

CD44* *CD44 molecule (Indian blood group)*

CD267 Proteína TACI (Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 13B)

cDNA DNA complementar

CFLAR* CASP8 and FADD Like Apoptosis Regulator

CHUK* Conserved Helix-loop-helix Ubiquitous Kinase

cIAP* Cellular Inhibitors of Apoptosis

CRADD* CASP2 and RIPK1 Domain Containing Adaptor With Death Domain

CRDs Domínio rico em Cisteína (*Cysteine-Rich Domains*)

CSR Recombinação de troca de classe de imunoglobulina (Class Switch Recombination)

Ct Cicle Threshold

DAPK1* Death Associated Protein Kinase 1

DAXX* Death-domain Associated Protein

DEDD* Death Effector Domain Containing

DEDD2* Death Effector Domain Containing 2

DIABLO* Diablo, IAP-binding mitochondrial protein

DNT Linfócitos T duplo-negativos (*Double Negative T Lymphocyte*)

DR Receptor de morte (*Death Receptor*)

DRGE Doença do Refluxo Gastroesofágico

EDTA Ácido Diaminotetracetico Etileno (*Ethylenediamine Tetra Acetic Acid*)

EIIH Erros Inatos da Imunidade Humana

FADD* Fas Associated via Death Domain

FAS Receptor de morte FAS (Fas Cell Surface Death Receptor)

FASLG Fas ligante (*Fas Ligand*)

FC Fold Change

FITC Isotiocianato de fluoresceína (Fluorescein Isothiocyanate)

GAPDH* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GC Centro Germinativo (Germinal Center)

gDNA DNA genômico

GUSB* Glucuronidase Beta

HIP1* Huntingtin Interacting Protein 1

HPRT1* Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1

HRK* Harakiri, BCL2 Interacting Protein

HTRA2* HtrA Serine Peptidase 2

IAP Proteínas Inibidoras da apoptose (Inhibitors of Apoptosis Proteins)

ICOSL* Inducible T Cell Costimulator Ligand

ICV Imunodeficiência Comum Variável

IDP Imunodefificência Primária

IgA Imunoglobulina A

IgM Imunoglobulina M

IgG Imunoglobulina G

IgE Imunoglobulina E

IFT57* Intraflagellar Transport 57

IKBKB* Inhibitor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, Kinase Beta

IKBKG* Inhibitor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, Kinase Gamma

IKBKE* Inhibitor Of Nuclear Factor Kappa B Kinase Subunit Epsilon

IL10 Interleucina 10 (*Interleukin 10*)

IL10RA Interleucina 10 receptor alfa (*Interleukin 10 Receptor, Alpha*)

IUIS* International Union of Immunological Societies

IVIG Imunoglobulina Intravenosa Humana (Intravenous Immunoglobulin)

LRDD* P53-Induced Death Domain Protein 1

LTA* Lymphotoxin Alpha

LTB* Lymphotoxin Beta

MCL1 apoptosis regulator, BCL2 family member

MAP3K5* Mitogen-Activated Protein Kinase kinase 5

MAPK8* Mitogen-Activated Protein Kinase 8

MAPK9* Mitogen-Activated Protein Kinase 9

MFI Média de intensidade de Fluorescência (Median Fluorescence Intensity)

MMF Micofenolato

NAIP* NLR Family Apoptosis Inhibitory Protein

NFKB1* Nuclear Factor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1

NFKB2* Nuclear Factor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2

NFKBIA* Nuclear Factor of Kappa light polypeptidegene enhancer in B-cells inhibitor, Alpha

NFKBIB* NFKB Inhibitor Beta

NFKBIE* NFKB Inhibitor Epsilon

NFKBIZ* NFKB Inhibitor Zeta

NLRP1* *NLR Family Pyrin Domain Containing 1*

NGF* Nerve Growth Factor (beta polypeptide)

NGFR* Nerve Growth Factor Receptor

NIK* Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 14

NOD1* Nucleotide Binding Oligomerization Domain Containing 1

NOD2* Nucleotide Binding Oligomerization Domain Containing 2

MZ Zona Marginal (Marginal Zone)

PARP1* Poly (ADP-ribose) Polymerase 1

PBMC Células Mononucleadas do Sangue Periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

PCR Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)

PEA15* Proliferation And Apoptosis Adaptor Protein 15

PIRD Distúrbios Imunológicos Primários Regulatórios (Primary Immune Regulatory

Disorders)

PMAIP1* Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1

PYCARD* PYD And CARD Domain Containing

P01 Paciente 1

P01mother Mãe do paciente 1

P02 Paciente 2

P02mother Mãe do paciente 2

P03 Paciente 3

P03mother Mãe do paciente 3

PI lodeto de Propídio (*Propidium Iodide*)

RQ Quantificação Relativa

REL* REL Proto-Oncogene, NF-KB Subunit

RELA* v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A

RELB* RELB Proto-Oncogene, NF-KB Subunit

RIN Número de Integridade do RNA (RNA Integrity Number)

RIPK1* Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 1

RIPK2* Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 2

RT-qPCR* Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction

sIgAD Deficiência seletiva de IgA (selective IgA Deficiency)

SRL Sirolimus

SRL- Sem uso de Sirolimus

SRL+ Com uso de Sirolimus

SMD Síndromes Mielodisplásicas

STE Sequenciamento Total de Exoma

TACI* Transmembrane Activator and Calcium modulator and cyclophilin ligand Interactor

TBK1* TANK Binding Kinase 1

TLR4* Toll Like Receptor 4

TLR7* Toll Like Receptor 7

TLR9* Toll Like Receptor 9

TNF Fator de Necrose Tumoral (*Tumor Necrosis Factor*)

TNFR* Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily

TNFRSF1A* Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily member 1A

TNFRSF1B* TNF Receptor Superfamily Member 1B

TNFRSF6B* Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily member 6b

TNFRSF10A* Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily member 10a

TNFRSF10B* Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily member 10b

TNFRSF10C* Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily member 10c

TNFRSF10D* Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily member 10d

TNFRSF21* Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily member 21

TNFRSF25* Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily member 25

TNFRSF13B (TACI)* Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 13B

TNFRSF13C (BAFFR)* Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 13C

TNFRSF17 (BCMA)* Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 17

TNFSF10* Tumor Necrosis Factor superfamily member 10

TNFSF13 (APRIL)* Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamily Member 13

TNFSF13B (BAFF)* Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamily Member 13B

TP53* Tumor Protein P53

TRADD* TNFRSF1A Associated Via Death Domain

TRAF2* TNF Receptor Associated Factor 2

XIAP* X-Linked Inhibitor of Apoptosis

U.A. Unidades Arbitrárias

18S* Eukaryotic 18S rRNA

^{*} Essa sigla não há acrônimo correspondente na língua portuguesa

Sumário

| 1. | INTRODUÇÃO | 19 |
|---------------|--|------------|
| 2. | OBJETIVOS | 24 |
| 2.1. | GERAL | 24 |
| 2.2. | ESPECÍFICOS | 24 |
| 3. | MATERIAL E MÉTODOS | 25 |
| 3.1. | SUJEITOS | 25 |
| 3.2. | COLETAS DE SANGUE | 25 |
| 3.3. | ESTUDO MOLECULAR | 25 |
| 3.3.1 | L. EXTRAÇÃO DE DNA | 25 |
| 3.3.2 | 2. STE E ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA | 25 |
| 3.3.3 | 3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR (<i>POLYMERASE CHAIN REACTION</i>) | 26 |
| 3.3.4 | 1. SEQUENCIAMENTO SANGER | 26 |
| 3.3.5 | 5. EXTRAÇÃO DO ÁCIDO RIBONUCLÉICO (RNA) TOTAL | 27 |
| 3.3.6 | 5. QUANTIFICAÇÃO, PUREZA E INTEGRIDADE DO RNA | 27 |
| 3.3.7 | 7. REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA (RT-PCR) | 27 |
| 3.3.8 | 3. EXPRESSÃO GÊNICA – PLACAS DE ARRANJO GÊNICO (<i>ARRAY</i>) | 28 |
| 3.3.9 EXPE | 9. QUANTIFICAÇÃO RELATIVA (RT-qPCR) – EXPRESSÃO GÊNICA ÚNICA (SINGLE GEN RESSION) | NE 34 |
| 3.4. | • | 35 |
| | L. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DE MEMBRANA CD267 (TACI) | 35 |
| | 2. AVALIAÇÃO DA APOPTOSE | 35 |
| 3.5. | • | 35 |
| 3.5.1 | | 35 |
| | ANÁLISE DE DADOS | 36 |
| 4. | RESULTADOS | 36 |
| 4.1. | | |
| | itificada por ste | 36 |
| 4.2. | AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA CD267 (TACI) EM LINFÓCITOS B ATRAVÉ OMETRIA DE FLUXO | S DA 37 |
| 4.3. | ANÁLISE DE APOPTOSE POR CITOMETRIA DE FLUXO | 39 |
| 4.4. | EXPRESSÃO GÊNICA ARRAY VIA EXTRÍNSECA | 40 |
| 4.5. | EXPRESSÃO GÊNICA <i>ARRAY</i> VIA INTRÍNSECA E EXTRÍNSECA | 43 |
| 4.5. 4.6. | EXPRESSÃO GÊNICA ÚNICA (SINGLE GENE EXPRESSION) | 52 |
| 4.7. | | 55 |
| т./. | DODINGLINI DE CITOCINAD | |

| 5. | DISCUSSÃO | 56 |
|----|-------------|----|
| 6. | CONCLUSÃO | 64 |
| 7. | REFERÊNCIAS | 66 |
| 8. | ANEXOS | 74 |

1. INTRODUÇÃO

A imunodeficiência comum variável (ICV) é a imunodeficiência primária sintomática mais prevalente em humanos e representa um grupo heterogêneo de doenças ¹ com fenótipos infecciosos e não infecciosos. A prevalência exata da doença é desconhecida, embora as estimativas tenham sido feitas entre 1:10.000 e 1:50.000 em caucasianos, e raramente é descrita em populações asiáticas e africanas^{1; 2}.

Foi descrita pela primeira vez em 1953 ^{3; 4}, mas nos últimos anos houve avanços significativos na elucidação de alguns dos defeitos genéticos e mecanismos moleculares em ICV que contribuíram para a compreensão da imunologia humana ¹.

É caracterizada pela presença de hipogamaglobulinemia de pelo menos dois isotipos de imunoglobulina 1, e pela baixa ou ausência de produção de anticorpos específicos após a vacinação ou exposição a antígenos 5. Além disso, pacientes com ICV sofrem de infecções recorrentes sinopulmonares, de ouvido e gastrointestinais e têm risco aumentado de doenças autoimunes e linfoproliferativas ^{2; 5; 6} Uma proporção significativa de pacientes também exibe características de desregulação imunológica, incluindo doença autoimune 1, doença granulomatosa, doença pulmonar crônica, bronquiectasia, doença hepática, esplenomegalia, linfadenopatia com e sem linfoma e outras doenças malignas 7. A contagem de linfócitos T e B é variável, podendo ser baixa ou normal, com suas funções geralmente comprometidas ⁸, como também das citocinas IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, TGF-β e IL-21 9. Embora as falhas na diferenciação e secreção de anticorpos pelos linfócitos B sejam considerados o defeito principal, múltiplas anormalidades já foram descritas em vários outros componentes do sistema imunológico 1. Contudo, a etiologia da ICV continua desconhecida na maioria dos casos, provavelmente como decorrência da interação complexa entre os fatores ambientais e genéticos 10; 11; 12. A maioria dos casos de ICV são esporádicos, mas cerca de 10%-20% são familiares 5; 13; 14. Foram observadas em famílias com ICV tanto a herança autossômica dominante quanto a recessiva ¹³ e pelo menos um membro adicional da família tem ICV ou deficiência seletiva de IgA (sIgAD, do inglês selective IgA Deficiency) 14. A causa monogênica foi identificada em apenas 2-10% dos pacientes com ICV ^{2;7}. A doença ocorre em ambos os sexos, e o início dos sintomas pode ocorrer em qualquer idade, com picos na infância entre 2 e 5 anos e picos na segunda e terceira décadas de vida 1; 2. A frequência de apresentação infecciosa difere ligeiramente em populações pediátricas de ICV, onde sinusite é a apresentação clínica mais comum, seguida por otite média e pneumonia ⁶.

Cerca de 25% dos pacientes com ICV têm eventos autoimunes. Esta desregulação imunológica leva à geração de múltiplos autoanticorpos contra vários antígenos alvos. Púrpura trombocitopênica e anemia hemolítica são as consequências autoimunes mais comuns, ocorrendo em 5-8% de todos os pacientes com ICV. Outras doenças autoimunes incluem a presença de anticorpos anti-IgA ⁶, anemia perniciosa ¹⁵ e tireoidite autoimune ⁶. As consequências autoimunes menos comuns de ICV incluem artrite reumatóide, vitiligo e vasculite ⁶. Complicações pulmonares crônicas, são as principais causas de morbidade significativa nesses pacientes. As mais comuns incluem a fibrose pulmonar e a bronquiectasia. Até 50% dos pacientes com ICV podem apresentar fenótipo pulmonar obstrutivo, como bronquite crônica e asma. A doença granulomatosa na ICV pode afetar cerca de 10-22% dos pacientes com idade média de 18-34 anos. Embora os granulomas sejam mais comuns em adultos, até um terço dos pacientes pediátricos com ICV também podem ter essa complicação ⁶.

Complicações gastrointestinais são comuns em 50% dos pacientes com ICV, manifestada por diarreia crônica com má absorção, doença de Crohn, doença granulomatosa intestinal, infecções bacterianas ou virais, parasitas intestinais, doença celíaca e linfangiectasia intestinal ⁶.

As características celulares do sistema imunológico em ICV são complexas com vários defeitos numéricos e funcionais envolvendo linfócitos B, linfócitos T, *Natural killers*, macrófagos e monócitos. O número de linfócitos B no sangue periférico pode ser normal ou reduzido e pode

haver defeitos na produção de citocinas. O número de linfócitos B que faz a recombinação somática para a troca de classe (CRS, *Class Switch Recombination*) é baixo em 50-75% dos pacientes ⁶.

Os resultados de três grandes estudos clínicos, incluindo 248, 220 e 176 pacientes com ICV, sugerem que os pacientes apresentam alto risco de doença neoplásica - tumor hematológico e sólido (mama, próstata, ovário, pele e cólon). Em particular, doenças malignas mais comuns são linfoma não-Hodgkin e câncer gástrico ⁶. No entanto, a variabilidade no fenótipo clínico e o início tardio da doença podem levar a um diagnóstico tardio de ICV ⁷. Apesar de muitos esforços para aumentar a conscientização sobre as imunodeficiências, o atraso médio entre o início dos sintomas e o diagnóstico da ICV ainda é de 4 anos nos países ocidentais e pode afetar o prognóstico devido ao início tardio da terapia adequada ¹⁶.

Com o surgimento de novas tecnologias de sequenciamento foi acelerada a descoberta de genes associados ao ICV ². Mutações em pelo menos 24 genes ^{2; 17} estão associadas a ICV. Uma das mutações mais frequentes ocorre no gene *TNFRSF13B* (*Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 13B*) ¹⁸, aproximadamente 5%-10% dos pacientes com ICV ^{5; 14}. O gene *TNFRSF13B* é responsável pela produção da proteína TACI (*Transmembrane Activator and Calcium modulator and cyclophilin ligand Interactor*), a qual é um receptor transmembrana, pertencente da superfamília do Fator de Necrose Tumoral – TNFR (*Tumor Necrosis Factor Receptor superfamily*) (OMIM ID 604907 - 18/10/2021) ^{14; 19}.

A expressão de TACI varia em diferentes subpopulações de linfócitos B ²⁰. Em humanos, é encontrada uma expressão pronunciada nos linfócitos B da Zona Marginal (MZ, *Marginal Zone*), nos linfócitos B de memória CD27+ ^{14; 20; 21; 22; 23; 24} e nos linfócitos T ativados ²⁰. TACI é um regulador que, quando ativado, afeta múltiplos eventos na resposta imune, envolvido na sobrevida, apoptose ²¹ e diferenciação dos linfócitos B, sendo responsável pela CSR de IgM para IgA e IgG ²⁵. Portanto, mutações em TACI podem causar deficiência de IgG e, principalmente, deficiência de IgA ⁶. A produção de IgG, IgA e IgE (Imunoglobulina E) depende de uma troca adequada de isotipos IgM+ IgD+ nas células B *naïve* ⁸. O CSR requer dois sinais: um é fornecido por citocinas, e o outro por CD40, TACI e BAFF-R, também conhecido como TNFRSF13C (*Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 13C*)^{8; 26}, membros da família de receptores de TNF (*Tumor Necrosis Factor*) expressos em linfócitos B.

Mutações em TACI estão associadas a um fenótipo clínico de linfoproliferação, que pode incluir esplenomegalia ou hiperplasia tonsilar e deficiência de IgA, com tireoidite autoimune sendo relatada em 15% dos pacientes com ICV ².

TACI funciona como um receptor para dois ligantes do tipo TNF, o BAFF, também conhecido como TNFSF13B (*Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamily Member 13B*) e o APRIL, também conhecido como TNFSF13 (*Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamily Member 13*) ^{14; 27}. Os ligantes da superfamília TNF, BAFF e APRIL e seus três receptores BAFFR, BCMA, também chamado de TNFRSF17 (*Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 17*) e TACI compreendem uma rede que está envolvida na ativação e sobrevivência dos linfócitos B, na função dos linfócitos T e na regulação da imunidade humoral ^{20; 25}. Curiosamente, em alguns casos, os sinais associados à apoptose ou sobrevivência podem ser transmitidos através do mesmo receptor em resposta ao mesmo ligante ²⁸. Falhas neste complexo sistema estão associadas com doenças autoimunes, tumores de linfócitos B e deficiência de anticorpos ²⁰.

Apenas duas variantes do *TNFRSF13B* são as mais prevalentes, p.C104R e p.A181E, representando mais de 90% das mutações em TACI (CD267). Entretanto, essas variantes monoalélicas já foram detectadas em indivíduos assintomáticos em uma frequência de 1-2% ^{2; 19; 25}. Portanto, o papel da mutação p.C104R na patogênese da ICV permanece não resolvido. Embora esses indivíduos sejam portadores da variante e não apresentem manifestações clínicas de ICV, defeitos nas funções dos linfócitos B foram detectados por Zhang et. al.; 2015 ²⁵ através de ensaios *in vitro*. Este estudo comparou indivíduos saudáveis sem mutações em TACI com os indivíduos portadores de mutação heterozigota em TACI. Os portadores da mutação apresentaram diminuição na expressão de TACI nos linfócitos B. Os autores concluíram que as

mutações em TACI aumentam o risco de desenvolver ICV ²⁵. A grande maioria dos pacientes com as mutações p.C104R e A181E são heterozigotos ²⁹.

Estruturalmente, TACI é uma proteína transmembrana do tipo III. O domínio extracelular (EC) contém 2 domínios ricos em cisteína (CRDs, *Cysteine-Rich Domains*), os quais são marcas registradas da superfamília do TNFR ¹⁴. O primeiro CRD é necessário para a montagem em complexos multiméricos independentes do ligante de TACI, o segundo CRD é necessário para ligação de APRIL e BAFF ²⁹ (Figura 1).

A mutação p.C104R está localizada na porção extracelular no domínio de ligação ao ligante CRD2 ^{5; 29; 30}. Uma substituição de nucleotídeo 310T por C no gene *TNFRSF13B* leva à mutação p.C104R (Cisteína 104 por Arginina) na proteína TACI ¹³. Esta mutação leva a uma ruptura de uma região rica em cisteína importante para a ligação ao ligante ²² (Figura 1). Desse modo, a mutação p.C104R anula a ligação de BAFF e APRIL ao TACI ^{5; 13; 29; 31} e, consequentemente, a sinalização ²⁹. Uma complexa sinalização compreendendo p.C104R heterozigoto evita a sinalização de NF-kappaB de uma maneira negativa dominante ¹³. Além disso, estudos mostram que os linfócitos B de tais pacientes não produzem imunoglobulinas em resposta a APRIL ⁵. Em ICV, a mutação p.C104R apresenta expressividade variável e penetrância incompleta ³².

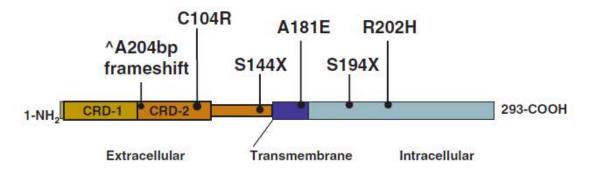


Figura 1: Estrutura da proteína transmembrana TACI e suas mutações em humanos ²⁸.

Tanto o BAFF 60-monômero quanto o APRIL multimerizado com HSPG (*Heparan Sulphate Proteoglycans*) são capazes de ativar o TACI. No entanto, os trímeros BAFF e os trímeros APRIL não podem ativar o TACI porque são necessários que pelo menos dois trímeros TRAF se associem à seis TACIs para ativar a via NF- κ B clássica ^{25; 33} (figura 2). Além disso, TACI serve como o único receptor para heterotrímeros de BAFF/APRIL ²².

A ligação ao ligante provoca agrupamento dos domínios intracelulares de TACI, recrutando moléculas de sinalização que incluem moduladores de cálcio, proteínas associadas a TNFR, ativação de fatores de transcrição nuclear de linfócitos T ativadas e NF- κ B (*Nuclear Factor* κ B) ^{29;34}.

O TACI regula o número de plasmócitos e a produção de anticorpos por meio de pelo menos dois mecanismos. Em primeiro lugar, o TACI promove a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos, mantendo uma expressão contínua de Blimp-1 (*B-Lymphocyte-Induced Maturation Protein 1*) em linfócitos B. Em segundo lugar, o TACI inibe a apoptose dos plasmócitos, regulando negativamente a expressão de BIM (*BCL2L11, Bcl-2-Like Protein 11*) nestas células. O BIM promove a apoptose. APRIL e BAFF regulam negativamente a expressão de BIM ao interagir com TACI, promovendo assim a sobrevivência dos plasmócitos (figura 3) ²².

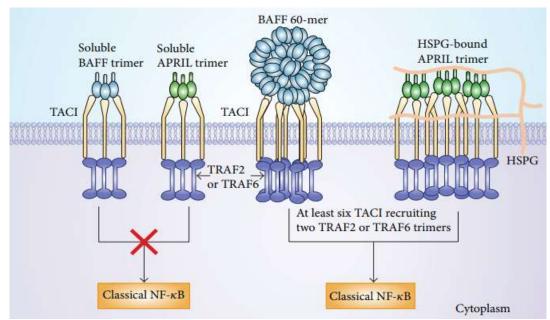


Figura 2: As formas de ligantes para ativar TACI ²².

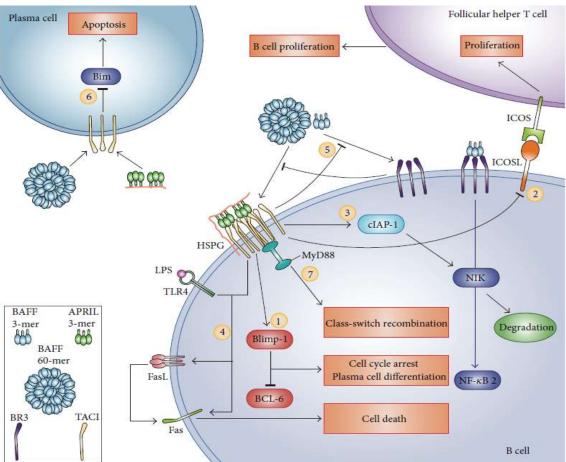


Figura 3: As atividades biológicas de TACI. TACI inibe a proliferação de linfócitos B, promovendo a expressão contínua de Blimp-1. O Blimp-1 induz a parada do ciclo celular nos linfócitos B, promovendo a diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos (1). TACI inibe as reações do centro germinativo (GC, Germinal Center) e a proliferação de linfócitos B ao suprimir a expressão de ICOSL (Inducible T Cell Costimulator Ligand) nos linfócitos B GC (2). TACI regula positivamente a expressão de cIAP (Cellular Inhibitors of Apoptosis) em linfócitos B GC. cIAP direciona NIK (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 14) para degradação por ubiquitinação, inibindo assim a via NF-κB não canônica mediada por BAFF-R (3). A sinalização de TACI e TLR4 (Toll Like Receptor 4) cooperam para desencadear os linfócitos B MZ para apoptose por indução do receptor de morte FAS (Fas Cell Surface Death Receptor) e FasL (4). A TACI concorre com o BAFF-R pelo BAFF, que também reduz a concentração do BAFF (5). O TACI inibe a apoptose dos plasmócitos, regulando negativamente a expressão de BIM nos plasmócitos (6). TACI medeia CSR ligando-se a MyD88 (7) 25.

Mutações TACI em ICV também se correlacionam com suscetibilidade a doenças autoimunes. Alterações homozigóticas nos alelos TACI resultam em uma perda completa da função TACI e na incapacidade de manter a produção contínua de anticorpos auto-reativos. Por outro lado, mutações heterozigotas nos alelos de TACI apenas prejudicam a função TACI. A função TACI não está completamente perdida e é suficiente para manter a produção contínua de anticorpos auto-reativos. Portanto, pacientes com CVID que são heterozigotos para mutantes TACI mutantes são propensos a doenças auto-imunes, enquanto que os homozigotos de alelos TACI de CVID parecem experimentar um efeito preventivo auto-imune da doença ²⁵.

Defeitos em TACI também estão associados à imunodeficiência humoral, conforme documentado por respostas independentes de linfócitos T, para antígenos polissacarídeos. Isso ocorre pelo fato de TACI ser expresso em subconjuntos de linfócitos B MZ, os quais são fortes responsivos a antígenos timo independentes ²⁴. O efeito de APRIL nos linfócitos B é complexo porque proteoglicanos, como CD44 (*CD44 molecule - Indian blood group*) e Syndecan 1 expressos em linfócitos B, podem fornecer parceiros de ligação eficazes para APRIL, induzindo a proliferação celular, CSR e a produção de imunoglobulinas ²². No entanto, a compreensão atual de como o APRIL sinaliza via TACI não explica como as mutações heterozigotas em TACI podem estar associadas à deficiência imunológica e autoimunidade em pacientes, mas não está associada nos parentes heterozigotos normais ²².

Níveis reduzidos de IgG e IgA em indivíduos com deficiência de TACI são provavelmente devido a uma CSR ineficiente em linfócitos B ³⁵. Zhang *et al.*; 2007, mostraram que três indivíduos com mutações TACI eram originalmente deficientes em IgA ou levemente hipogamaglobulinêmicos e tinham níveis séricos de IgG e IgM em declínio ao longo dos anos. Embora nesses casos a mutação em TACI fosse claramente congênita, o defeito imunológico completo parecia se desenvolver e se expressar somente ao longo do tempo ²².

A maioria dos linfócitos que se proliferam em resposta aos antígenos *in vivo* morre subsequentemente para manter um número constante dessas células entre as respostas imunes. Assim, os sinais de sobrevivência e apoptóticos são altamente regulados ²⁸. A apoptose é importante para o desenvolvimento, função e manutenção do sistema imunológico. Da mesma forma, desempenha um papel significativo na duração das respostas imunes a antígenos estranhos, deleção de linfócitos T e B autoreativos e eliminação de células infectadas por vírus e células cancerosas ^{9; 36}.

Para o sistema imunológico, muitos sinais apoptóticos e de sobrevivência são mediados por meio de receptores presentes nas superfícies dos linfócitos e outras células hematopoiéticas. Ambos os sinais apoptóticos e sobrevivência em linfócitos são mediados principalmente por membros da superfamília de TNFR. Curiosamente, em alguns casos, esses sinais podem ser transmitidos através do mesmo receptor em resposta ao mesmo ligante. Entender como essa transdução de sinal é executada é fundamental para entendimento das respostas imunológicas e inflamatórias dos indivíduos com mutação em TACI ²⁸. A interrupção da apoptose pode ser um dos mecanismos envolvidos na patogênese dessa doença, levando à sobrevivência prolongada e defeituosa de linfócitos B baixa produção de anticorpos, aumento ou redução da proliferação de linfócitos e secreção defeituosa de citocinas ^{9; 37}.

A variante *TNFRSF13B* (*OMIM 604907-12*/10/2021) na classificação da IUIS 2020 (*International Union of Immunological Societies* 2020) ³⁸ foi categorizada dentro das deficiências de anticorpos primários, como distúrbios ICV, e reconhecida como a variante mais frequente entre esses pacientes ¹⁸. Entretanto, baseado em seus fenótipos clínicos de autoimunidade, autoinflamação/hiperinflamação, linfoproliferação, infiltração linfocítica policlonal, infiltração granulomatosa, malignidade e atopia grave, sugerimos que a variante *TNFRSF13B* deva ser alocada no grupo heterogêneo de distúrbios imunológicos primários regulatórios (PIRD, *Primary Immune Regulatory Disorders*), ao invés de uma complicação infecciosa de hipogamaglobulinemia ^{39; 40}. Essas complicações não infecciosas são a principal causa de morbidade e mortalidade, uma vez que esse defeito no gene está na intersecção de múltiplas

vias regulatórias imunológicas. No entanto, os mecanismos subjacentes à desregulação imunológica sistêmica nesses pacientes ainda precisam ser definidos.

A apoptose é importante no desenvolvimento, função e manutenção do sistema imune. Tem uma função significativa na limitação da duração da resposta imune contra antígenos externos, deleção de linfócitos T e B autorreativos, eliminação de infecções virais e células de câncer³⁶.

Tradicionalmente, as doenças são classificadas de acordo com o sistema de órgãos afetado - cardiovascular, endócrino, neurológico, etc. No entanto, é muito mais útil para o investigador biomédico pensar nos mecanismos responsáveis pelas doenças. A este respeito, a simples reclassificação baseada no fato das doenças estarem associadas à morte celular insuficiente ou excessiva, contribui com mais eficiência no entendimento da fisiopatologia e do plano terapêutico. A apoptose por ser essencial na homeostase e regulação das respostas imunológicas, ela sozinha pode afetar substancialmente a celularidade em doenças autoimunes. Adicionalmente, aumento da apoptose e consequentemente, redução da sobrevida, crescimento e diferenciação dos linfócitos, inabilidade dos linfócitos B produzirem níveis normais de imunoglobulinas ⁹, tornam fundamental a identificação de quais genes reguladores estão envolvidos na via de sinalização da apoptose para melhor entendimento da patogênese de ICV associada a mutação em TNFRSF13B. A compreensão dos processos que medeiam essas decisões celulares deve auxiliar no desenho de terapêuticas racionais para doenças autoimunes.

Em nosso estudo apresentamos descrição clínica, imunológica e molecular detalhadas de três famílias com a mutação TACI p.C104R, análises de expressão gênica de genes relacionados à apoptose, avaliação da expressão de TACI e produção de citocinas para melhor entendimento da ICV com mutação no gene *TNFRSF13B*.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Identificar em uma coorte de 18 pacientes com fenótipo de linfoproliferação, autoimunidade e hipogamaglobulinemia o diagnóstico molecular, através do Sequenciamento Total do Exoma (STE).

2.2. ESPECÍFICOS

Nos pacientes com mutação no gene TNFRSF13B, na posição p.C104R:

- Analisar os membros da família quanto a presença da mesma variante identificada no paciente e suas características clínicas;
- Correlacionar a expressão da proteína CD267 com a porcentagem de subpopulações de linfócitos B;
- Correlacionar a proporção de células viáveis e em apoptose com os sintomas clínicos de linfoproliferação;
- Apresentar aspectos clínicos e imunológicos detalhados de três famílias
- Analisar a expressão gênica das vias intrínseca e extrínseca da apoptose;
- Identificar potenciais marcadores associados com apoptose através das vias de sinalização da apoptose;
- Dosagem de citocinas IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 e TGF-β.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. SUJEITOS

Em uma corte de 18 pacientes com fenótipo de linfoproliferação, autoimunidade e hipogamaglobulinemia, foram selecionados seis indivíduos de três famílias brasileiras não aparentadas, acompanhados no Ambulatório de Imunodeficiência Primária de Pediatria - UNICAMP. Os controles foram representados por indivíduos saudáveis, pareados por sexo e idade. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil (UNICAMP), N° 1176/2011.

3.2. COLETAS DE SANGUE

As coletas dos indivíduos controles saudáveis foram realizadas no Centro de Investigação em Pediatria (CIPED) na FCM da UNICAMP, enquanto que as coletas dos pacientes e familiares foram realizadas no ambulatório de Imunodeficiência Pediátrica do Hospital das Clínicas da Universidade de Campinas - São Paulo - Brasil. O volume total de amostra de sangue periférico coletado foi de 30 mL anticoagulado com Ácido Diaminotetracetico Etileno (EDTA, Ethylenediamine Tetra Acetic Acid).

3.3. ESTUDO MOLECULAR

3.3.1. EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA genômico (gDNA) foi extraído de sangue periférico utilizando o kit de extração comercial Puregene Blood Kit B (catálogo: 1042606; Qiagen, Hilden, Alemanha). Foram adicionados 9 mL de Solução de Lise de RBC a 3 mL de sangue total, e homogeneizados. Incubados por 5 min em temperatura ambiente (15-25°C) e centrifugado por 2 min a 2.000 g. Descartado o sobrenadante. Ao pellet de células resultante foram acrescentados 3 mL de solução de lise celular e homogeneizado completamente. Em seguida, foi adicionado ao tubo 1 mL de Solução de Precipitação de Proteína e, novamente, homogeneizado completamente e centrifugado por 5 min a 2000g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 3 mL de isopropanol, para a precipitação de DNA. Posteriormente, o tubo foi centrifugado 3 minutos a 2.000 g. O DNA precipitado foi lavado com 3 ml de solução de etanol 70%, centrifugado por mais 1 min a 2.000g descartado o sobrenadante. O DNA precipitado foi ressuspendido em 150 μL de solução de hidratação de DNA.

As amostras foram incubadas 12 horas para completa solubilização. As amostras de gDNA foram quantificadas por fluorimetria utilizando o equipamento Qubit (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA) e ajustado para 50 ng/ μ L, para início do preparo das bibliotecas de exoma. Já as amostras usadas nas reações de reação em cadeia da polimerase (PCR, Polymerase Chain Reaction) foram diluídas a 100 ng/ μ L.

3.3.2. STE E ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

O STE foi realizado no Laboratório Central de Tecnologia de Alto Desempenho (LaCTAD - UNICAMP), utilizando o equipamento Hi-seq 2500 Illumina (Illumina Inc., San Diego, CA, EUA). O kit de enriquecimento e amplificação utilizado foi o Nextera Rapid Capture Custom Enrichment Kit (catálogo: FC-140-1007; Illumina Inc.) com a opção 12-plex para multiplexar as amostras. A cobertura estimada de cada paciente foi da ordem de 100x do exoma, seguida de análise por bioinformática para a construção de uma base de dados de variações (single nucleotide variants − SNVs) para cada paciente. As sequências de baixa qualidade foram filtradas utilizando o programa NGS Tool kit 41; 42. Sequências que tinham menos de 70% de bases com um escore de Phred ≤ 20 foram descartadas. A ferramenta BWA foi usada para alinhar com o

genoma humano (montagem de HG19) e a identificação de variantes foi realizada através do programa Genome Analysis ToolKit (GATK - https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us -19/10/2021). Para a anotação das variantes, foi utilizado o programa ANNOVAR (https://annovar.openbioinformatics.org/en/latest/ - 19/10/2021). Os genes candidatos foram escolhidos com base na literatura específica sobre a fisiopatologia de ALPS/ICV reconhecidamente causadas por desregulação do sistema imunológico e envolvendo genes dos mecanismos de maturação dos sistemas T e B, das vias de apoptose, e da produção de imunoglobulinas. Para essa seleção priorizamos as variantes de alta qualidade, excluindo da análise: variantes em regiões intrônicas e não traduzidas; mutações sinônimas (quando a alteração do nucleotídeo não altera o aminoácido); variantes com predições benignas partilhadas por todos os bancos de dados analisados, variantes com índice de confiabilidade menor do que 30 para mutações homozigotas e menores que 50 para mutações heterozigotas e variantes com a soma dos reads acima de 10. O conjunto final de variantes selecionadas passou por inspeção visual junto à classificação de EIIH (Erros Inatos da Imunidade Humana) 2017, ao Phenolyzer (https://phenolyzer.wglab.org/ - 04/07/2018), ferramenta que usa informações prévias da literatura para sugerir possíveis genes associados e busca da literatura específica sobre a fisiopatologia e alguns dos EIIH. Após a seleção do gene candidato, pesquisamos sua função nas bases GENECARDS (base de dados de genes humanos - https://www.genecards.org/ - 18/10/2021), e a frequência da variante na base ENSEMBL (https://www.ensembl.org/ -18/10/2021). Em seguida, utilizamos o site Online Mendelian Inheritance in Man – OMIM (https://www.omim.org/ - 18/10/2021) que compreende um resumo autêntico de genes humanos e fenótipos genéticos e a literatura atual.

No paciente PO3 realizamos o painel genético de ALPS ao invés do STE.

3.3.3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR (*POLYMERASE* CHAIN REACTION)

Após a análise do STE, os segmentos das variantes selecionadas foram amplificados a partir de gDNA utilizando um conjunto de pares de primers desenhados com o software Generunner (http://www.generunner.net/).

TNFRSF13B_DNA_F: 5'- CAAGGAGCAAGGCAAGTTCTAT -3'

TNFRSF13B_DNA_R: 5'- GCTTACCTGGACTTGCTTCTGA -3'

A PCR foi padronizada com gDNA de controle para o volume de reação de 30 μL contendo 100 ng de DNA; 0,4 μL de dNTPs (catálogo: 11615-010; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc.); 3,0 μL de solução tampão 10X (10X PCR Buffer); 0,6 μL de cada primer; 1,2 μl de MgCl2 e 0,2 μL de Taq polimerase (catálogo: 10297018; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc.) em termociclador (Mastercycler – Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), sendo desnaturação inicial por 2 min na temperatura de 96 °C, e amplificação com 30 ciclos na temperatura de 96 °C por 30 seg, com anelamento a 57 °C por 30 seg e a extensão a 72 °C por 1 min.

3.3.4. SEQUENCIAMENTO SANGER

A validação da variante encontrada foi realizada através do sequenciamento Sanger nas amostras dos pacientes e seus parentes, realizado no Centro de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Estadual de Campinas (HEMOCENTRO/UNICAMP). Utilizou-se o kit "Big Dye Terminator Kit" (catálogo: 4337455; Thermo Fisher Scientific Inc.) e o equipamento ABI3730xL (Thermo Fisher Scientific Inc.). A análise dos sequenciamentos foi realizada confrontando a

sequência obtida com a sequência referência de TNFRSF13B (NG_007281.1) depositada no banco internacional de genomas - GenBank utilizando o programa Blast (Basic Local Alignment Tool) do National Center for Biotechnology Information (NCBI) e o editor de sequências biológicas Chromas (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Austrália).

3.3.5. EXTRAÇÃO DO ÁCIDO RIBONUCLÉICO (RNA) TOTAL

A extração do RNA foi realizada a partir do sangue periférico coletado com EDTA e utilizando o kit de extração comercial RiboPure™ RNA Purification Kit Blood (catálogo: AM 1928; Thermo Fisher Scientific Inc.) de acordo com as instruções do fabricante. O tubo de coleta foi centrifugado por 15 min a 2000 g, retirado o buffy coat e colocado em solução de estabilização (RNAlater solution). Posteriormente, centrifugou-se por 2 min a 2000 g e descartou-se o sobrenadante. Foram adicionados 800 µL de solução de lise (Lysis solution), 50 µL de solução de acetato de sódio (Sodium acetate solution) e agitou-se a amostra com auxílio do vórtex para a lise celular completa, após essa etapa, acrescentou-se 500 μL de ácido-fenol clorofórmio, agitouse a amostra com vórtex por 30 seg e incubou-se durante 5 min em temperatura ambiente. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 2000 g durante 2 min. A fase aquosa foi recolhida, colocada em outro tubo cônico (2 mL) limpo, adicionado 600 µL de etanol 100% em temperatura ambiente e a solução foi homogeneizada com o vórtex. Em seguida, essa solução foi aplicada sobre uma coluna de micro-filtro e centrifugada a 2000 g por 15 seg, e o eluato foi descartado. Este processo de microfiltração foi repetido com todo o volume da solução. A coluna foi lavada com 700 µL da solução de lavagem 1 (wash solution 1) e duas vezes com 700 µL da solução de lavagem 2/3 (wash solution 2/3). Em seguida o RNA retido na coluna foi eluído com 25μl de uma solução de eluição (elution solution) pré-aquecida a 75 °C, deixando-a por 30 segundos, e a seguir, o RNA foi recuperado por centrifugação. Essa eluição foi repetida uma vez usando 25 μL da solução de eluição. O volume final de RNA eluído foi de 50 μL.

3.3.6. QUANTIFICAÇÃO, PUREZA E INTEGRIDADE DO RNA

As amostras de RNA foram quantificadas por fluorimetria utilizando o equipamento Qubit (Invitrogen) e avaliadas quanto à pureza, por espectrofotometria, através da razão DO 260/280 e DO 260/230 (NanoDrop ND1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA). A integridade do RNA (RIN, RNA Integrity Number) foi avaliada por eletroforese utilizando-se o equipamento Bioanalyzer 2100 Expert (B.02.08.SI648) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA).

3.3.7. REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA (RT-PCR)

Para expressão gênica, o RNA foi convertido em DNA complementar (cDNA) através da reação de RT-PCR. A reação foi efetuada utilizando o kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (catálogo: 4374966; Thermo Fisher Scientific Inc.) segundo o protocolo do fabricante. Em um volume de 20 μ l contendo 1 μ g de RNA diluído em 0,2 μ l de tampão 10X, 0,8 μ l de mix de dNTPs (100mM), 2,0 μ l random primers 10X, 1 μ l de transcriptase reversa Multiscribe (50 U/ μ l), 1,0 μ l de inibidor de RNases (20 U/ μ l) e água livre de nucleases (Nuclease-free water). As reações foram realizadas no gelo, submetidas a 25°C por 10 min, 37°C por 120 min e a 85°C por 5 min (inativação da transcriptase), em termociclador (Mastercycler-Eppendorf).

3.3.8. EXPRESSÃO GÊNICA – PLACAS DE ARRANJO GÊNICO (ARRAY)

Com a finalidade de identificar os efeitos da variante *TNFRSF13B* na expressão de outros genes envolvidos nas vias de sinalização da apoptose, foi utilizada a placa de Array TaqMan® Array Human Apoptosis through Death Receptors 96-well Plate (catálogo: 4414105; Thermo Fisher Scientific Inc.). A placa contém 44 conjuntos de genes associados à apoptose mediada por receptor de morte (tabela 1) e 4 controles endógenos: 18S (Eukaryotic 18S rRNA), GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase), GUSB (Beta Glucuronidase) e HPRT1 (Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1). Um controle endógeno é um gene cuja expressão não deve variar entre as amostras. Para a análise dos resultados foram utilizados como referência os genes GAPDH, HPRT1 e GUSB. Os ensaios da placa de Array TaqMan® Array Human Apoptosis through Death Receptors foram realizados para os pacientes 1 (PO1) e paciente 2 (PO2) e comparado com um o pool de cDNA de controles.

Avaliamos também a placa de Array TaqMan® Array Human Apoptosis plate 96-well (catálogo: 4418717; Thermo Fisher Scientific Inc.). Nesta placa temos 92 assyas des genes associados à apoptose de ambas as vias (tabela 2), e os mesmos 4 controles endógenos. Os ensaios da placa Array TaqMan® Array Human Apoptosis plate foram realizados para o P01, P02 e P03 e comparado com um o pool de cDNA de controles.

Todos os ensaios foram realizados em triplicada. Os controles foram selecionados de acordo com sexo e a idade de cada paciente com desvio padrão de \pm 5 anos e o RIN acima de 7,0. Um pool de 8 controles foi realizado para essas análises. As reações foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Utilizamos um volume total de 20 µl, contendo 10 µl de TaqMan® Gene Expression Master Mix (Catálogo: 4369016; Thermo Fisher Scientific Inc.) e 10 µl de cDNA diluído em água livre de nucleases. A concentração final das amostras de cDNA utilizadas foi de 10 ng em 10 µL para cada 20 µL de reação, realizado no equipamento ABI PRISM® 7500 (Thermo Fisher Scientific Inc).

Tabela 1: Genes da via extrínseca da apoptose examinados no *array*

| | Símbolo, nome aprovado | Função |
|----|---|---|
| 1 | ACTA1 | Cell motility |
| | actin, alpha 1, skeletal muscle | |
| 2 | ACTB | Cell motility |
| | actin, beta | |
| 3 | APAF1 | Apoptosis induction by |
| | apoptotic peptidase activating factor 1 | CASP3 activation |
| 4 | BAX | Apoptosis induction by |
| | BCL2-associated X protein | CASP3 activation |
| 5 | BCL2 | Apoptosis inhibition |
| | B-cell CLL/lymphoma 2 | Apoptosis illilisticili |
| 6 | BID | Apoptosis induction |
| | BH3 interacting domain death agonist | Apoptosis induction |
| 7 | BIRC2 | A contact in hibition |
| , | baculoviral IAP repeat containing 2 | Apoptosis inhibition |
| | BIRC3 | |
| 8 | baculoviral IAP repeat containing 3 | Apoptosis inhibition |
| | CASP2 | |
| 9 | caspase 2 | Involved in the activation cascade of caspases responsible for apoptosis execution |
| | • | |
| 10 | CASP3 | Involved in the activation cascade of caspases responsible for apoptosis execution |
| | caspase 3 | |
| 11 | CASP7 | Involved in the activation cascade of caspases responsible for apoptosis execution; |
| | caspase 7 | overexpression promotes programmed cell death |
| 12 | CASP8 | |
| | _ | |

| | caspase 8 | Most upstream protease of the activation cascade of caspases responsible for the FAS mediated and TNFRSF1A induced cell death |
|----|---|---|
| 13 | CASP9 caspase 9 | Involved in the activation cascade of caspases responsible for apoptosis execution |
| 14 | CFLAR CASP8 and FADD like apoptosis regulator | Apoptosis regulator protein as FAS mediated apoptosis inhibitor |
| 15 | CHUK conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase | Serine kinase. Essential role in the NFkB signaling pathway |
| 16 | DAXX death-domain associated protein | JNK pathway and apoptosis mediator via MAP3K5 [FAS and TGFBR2 (transforming growth factor beta receptor II) signaling] |
| 17 | DIABLO diablo, IAP-binding mitochondrial protein | Apoptosis promoter by caspase activation in the cytochrome c/APAF1/CASP9 pathway |
| 18 | FADD Fas associated via death domain | CASP8 and CASP10 apoptotic adaptor recruiter to activated FAS and TNFRSF1A |
| 19 | FAS Fas cell surface death receptor | Receptor with death domain for FASLG |
| 20 | FASLG Fas ligand | Cytokine ligand for FAS |
| 21 | IKBKB inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta | NFkB activator |
| 22 | IKBKG inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma | NFkB activator |
| 23 | MAP3K5 mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5 | Signal transduction mediator by oxidative stress and receptor-mediated inflammatory signals (TNF) |
| 24 | MAPK8 mitogen-activated protein kinase 8 | Stressed cell apoptosis promoter through TP53 and YAP1 |
| 25 | MAPK9 mitogen-activated protein kinase 9 | Stressed cell apoptosis promoter through TP53 and YAP1 |
| 26 | NFKB1 nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 | Rel protein-specific transcription inhibitor (105 kD) and DNA binding subunit of the transcription factor NFkB (50 kD) |
| | NFKB2 | |
| 27 | nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100) | Subunit of the transcription factor NFkB |
| | NFKBIA | |
| 28 | nuclear factor of kappa light polypeptidegene enhancer in B-cells inhibitor, alpha | NFkB inhibitor |
| 29 | NGF nerve growth factor (beta polypeptide) | Ligand for NTRK1 and NGFR; neuronal proliferation, differentiation and survivalregulator |
| 30 | NGFR nerve growth factor receptor | Neural cell death or survival mediator |
| 31 | PARP1 | DNA repair pathway initiation; apoptosis promoter in response to genotoxic stress |
| 32 | poly(ADP-ribose) polymerase 1 RELA v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A | Subunit of the transcription factor NFkB |

| 33 | TNF tumor necrosis factor | Multifunctional proinflammatory cytokine ligand for TNFRSF1A and TNFRSF1B | |
|----|---|--|--|
| 34 | TNFRSF10A tumor necrosis factor receptor superfamily member 10a | Receptor with death domain for TNFSF10; NFkB activator | |
| 35 | TNFRSF10B tumor necrosis factor receptor superfamily member 10b | Receptor with death domain for TNFSF10; ER stress-induced apoptosis promoter; NFkB activator | |
| 36 | TNFRSF10C tumor necrosis factor receptor superfamily member 10c | Decoy receptor for TNFSF10; apoptosis inhibitor | |
| 37 | TNFRSF10D tumor necrosis factor receptor superfamily member 10d | Decoy receptor for TNFSF10; apoptosis inhibitor | |
| 38 | TNFRSF1A tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A | Receptor with death domain for TNF and LTA (lymphotoxin alpha); NFkB activator, apoptosis mediator, and inflammation regulator | |
| 39 | TNFRSF21 tumor necrosis factor receptor superfamily member 21 | Receptor with death domain; apoptosis promoter | |
| 40 | TNFRSF25 tumor necrosis factor receptor superfamily member 25 | Receptor with death domain for TNFSF12; mediator of NFkB activation and apoptosis promoter | |
| 41 | TNFRSF6B tumor necrosis factor receptor superfamily member 6b | Decoy receptor for FASLG; apoptosis inhibitor | |
| 42 | TNFSF10 tumor necrosis factor superfamily member 10 | Cytokine ligand for TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF10C, and TNFRSF10D | |
| 43 | TP53 tumor protein p53 | Tumor suppressor, growth arrest, or apoptosis promoter depending on the physiological circumstances and cell type | |
| 44 | TRAF2 TNF receptor associated factor 2 | Mediator of the antiapoptotic signals from TNF receptors; NFkB and JNK activation regulator | |

Tabela 2: Genes das via extrínseca e intrínseca da apoptose examinados no array

| | Símbolo, nome aprovado | Função |
|---|---|--|
| 1 | BIRC2 | Apoptosis inhibition |
| | baculoviral IAP repeat containing 2 | Apoptosis illilibition |
| 2 | APAF1 | Apoptosis induction by |
| | apoptotic peptidase activating factor 1 | CASP3 activation |
| 3 | BAD | Anontocic induction |
| | BCL2 associated agonist of cell death | Apoptosis induction |
| 4 | BAK1 | Apoptosis induction |
| | BCL2 Antagonist/Killer 1 | Apoptosis induction |
| 5 | BAX | Apoptosis induction by |
| | BCL2-associated X protein | CASP3 activation |
| 6 | BBC3 | The protein cooperates with direct activator proteins to induce |
| | BCL2 Binding Component 3 | mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. |
| 7 | BCAP31 | Plays a role in the export of secreted proteins in the ER, the recognition of abnormally folded protein and their targeting to the ER associated-degradation (ERAD). Also serves as a cargo receptor for the export of |
| | B Cell Receptor Associated Protein 31 | transmembrane proteins. May be involved in CASP8-mediated apoptosis. |
| 8 | BCL10 | Promotes apoptosis, pro-caspase-9 maturation and activation of |
| | B Cell CLL/Lymphoma 10 | NF-kappa-B via NIK and IKK. |
| 9 | BCL2 | Apoptosis inhibition |
| | | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · |

| | B-cell CLL/lymphoma 2 | | |
|----|--|---|--|
| 10 | BCL2A1 | | |
| 10 | | Apoptosis inhibition | |
| 11 | BCL2 Related Protein A1 BCL2L1 | | |
| 11 | BCL2 Like 1 | Apoptosis inhibition | |
| | | | |
| 12 | BCL2L10 | Promotes cell survival. Suppresses apoptosis induced by BAX but not BA | |
| | BCL2 Like 10 | | |
| 13 | BCL2L11 | | |
| | BCL2 Like 11 | Apoptosis induction | |
| 14 | BCL2L13 | | |
| | BCL2 Like 13 | Apoptosis induction | |
| 15 | BCL2L14 | | |
| | BCL2 Like 14 | Apoptosis induction | |
| 16 | BCL2L2 | | |
| | BCL2 Like 2 | Promotes cell survival | |
| 17 | BCL3 | Contributes to the regulation of transcriptional activation of NF-kappa-B | |
| 17 | B Cell CLL/Lymphoma 3 | target genes.Contributes to the regulation of cell proliferation | |
| 18 | BID | | |
| 10 | BH3 interacting domain death agonist | Apoptosis induction | |
| | | | |
| 19 | BIK | Accelerates programmed cell death | |
| | BCL2 Interacting Killer | | |
| 20 | NAIP | Anti-apoptotic protein which acts by inhibiting the activities of CASP3, CASP7 and CASP9 | |
| | NLR Family Apoptosis Inhibitory Protein | CASP7 and CASP9 | |
| 21 | BIRC3 | Apoptosis inhibition | |
| | baculoviral IAP repeat containing 3 | | |
| 22 | XIAP | Apoptosis inhibition | |
| 22 | X-Linked Inhibitor Of Apoptosis | | |
| 23 | BIRC5 | Apoptosis inhibition | |
| | Baculoviral IAP Repeat Containing 5 | | |
| 24 | BIRC6 | Anti-apoptotic protein which can regulate cell death by controlling caspases and by acting as an E3 ubiquitin-protein ligase. Acts as an | |
| | Decider in LAD Demost Containing C | inhibitor of CASP3, CASP7 and CASP9. | |
| | Baculoviral IAP Repeat Containing 6 | <u> </u> | |
| | | Apoptotic regulator capable of exerting proapoptotic and anti-apoptotic activities and plays crucial roles in apoptosis, cell proliferation, and cell | |
| 25 | BIRC7 | cycle control. Its anti-apoptotic activity is mediated through the inhibition | |
| 23 | BINC/ | of CASP3, CASP7 and CASP9, as well as by its E3 ubiquitin-protein ligase | |
| | Baculoviral IAP Repeat Containing 7 | activity. | |
| 26 | BIRC8 | Protects against apoptosis mediated by BAX | |
| | Baculoviral IAP Repeat Containing 8 | , | |
| 27 | BNIP3 | | |
| ۷, | BCL2 Interacting Protein 3 | Apoptosis-inducing protein that can overcome BCL2 suppression. | |
| 28 | BNIP3L | | |
| 20 | BCL2 Interacting Protein 3 Like | Induces apoptosis. | |
| 29 | BOK | | |
| 23 | BOK, BCL2 Family Apoptosis Regulator | Apoptosis induction | |
| 30 | NOD2 | | |
| 30 | Nucleotide Binding Oligomerization Domain | Involved in gastrointestinal immunity. | |
| | Containing 2 | · | |
| 31 | NOD1 | | |
| | Nucleotide Binding Oligomerization Domain | Enhances caspase-9-mediated apoptosis. | |
| | Containing 1 | | |
| 32 | CARD6 | | |
| | Caspase Recruitment Domain Family Member 6 | | |
| 33 | CARD9 | | |
| 55 | Caspase Recruitment Domain Family Member 9 | Plays an important regulatory role in cell apoptosis. | |
| | <u> </u> | | |
| 34 | CASP1 | Induce cell apoptosis and may function in various developmental stages. | |
| | | | |

| | Caspase 1 | |
|----|--|--|
| 35 | CASP10 | The standard for the second section of the section of the second section of the section of the second section of the s |
| 33 | | Involved in the activation cascade of caspases responsible for apoptosis execution. |
| | Caspase 10 | |
| 36 | CASP14 | Non-apoptotic caspase involved in epidermal differentiation. |
| 27 | Caspase 14 CASP2 | to all additions and additions and additional additional additions and additional additi |
| 37 | | Involved in the activation cascade of caspases responsible for apoptosis execution |
| 38 | caspase 2 CASP3 | Involved in the activation cascade of caspases responsible for apoptosis |
| 30 | caspase 3 | execution |
| 39 | CASP4 | |
| 33 | Caspase 4 | Plays a central role in the execution-phase of cell apoptosis. |
| | CASP5 | _ |
| 40 | | Mediator of programmed cell death (apoptosis). |
| | Caspase 5 | - |
| 41 | CASP6 | Involved in the signaling pathways of apoptosis, necrosis and inflammation. |
| | Caspase 6 | illiammation. |
| 42 | CASP7 | Involved in the activation cascade of caspases responsible for apoptosis |
| | caspase 7 | execution; overexpression promotes programmed cell death |
| 43 | CASP8 | Most upstream protease of the activation cascade of caspases responsible for the FAS mediated and TNFRSF1A induced cell death |
| | caspase 8 | Tor the FAS mediated and TNFRSF1A induced cell death |
| 44 | CASP8AP2 | Acts as a downstream mediator for CASP8-induced activation of NF-kappa- |
| | Caspase 8 Associated Protein 2 | B. Required for the activation of CASP8 in FAS-mediated apoptosis. |
| 45 | CASP9 | Involved in the activation cascade of caspases responsible for apoptosis |
| | caspase 9 | execution |
| 46 | CFLAR | Apoptosis regulator protein as FAS mediated apoptosis inhibitor |
| | CASP8 and FADD like apoptosis regulator | Apoptosis regulator protein as r A3 mediated apoptosis illilibitor |
| 47 | CHUK | Control Process Formation and the NELD street to continue |
| | conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase | Serine kinase. Essential role in the NFkB signaling pathway |
| 48 | CRADD CASP2 And RIPK1 Domain Containing Adaptor With | Apoptotic adaptor molecule specific for caspase-2 and FASL/TNF receptor-interacting protein RIP |
| | Death Domain | |
| 49 | DAPK1 Death Associated Protein Kinase 1 | Involved in multiple cellular signaling pathways that trigger cell survival, apoptosis, and autophagy. |
| 50 | DEDD Death Effector Domain Containing | A scaffold protein that directs CASP3 to certain substrates and facilitates their ordered degradation during apoptosis. |
| 51 | DEDD2 | May play a critical role in death receptor-induced apoptosis and may |
| | Death Effector Domain Containing 2 | target CASP8 and CASP10 to the nucleus. |
| 52 | DIABLO | Apoptosis promoter by caspase activation in the cytochrome |
| | Diablo, IAP-binding mitochondrial protein | c/APAF1/CASP9 pathway |
| 53 | IFT57 | Pro-apoptotic function via its interaction with HIP1, leading to recruit |
| | Intraflagellar Transport 57 | caspase-8 (CASP8) and trigger apoptosis. |
| 54 | FADD | CASP8 and CASP10 apoptotic adaptor recruiter to activated FAS and |
| | Fas associated via death domain | TNFRSF1A |
| 55 | FAS | Receptor with death domain for FASLG |
| | Fas cell surface death receptor | <u> </u> |
| 56 | FASLG | Cytokine ligand for FAS |
| | Fas ligand | |
| 57 | HIP1 | May act as a proapoptotic protein that induces cell death by acting |
| | Huntingtin Interacting Protein 1 | through the intrinsic apoptosis pathway |
| 58 | HRK | Promotes apoptosis. |
| | Harakiri, BCL2 Interacting Protein | |
| 59 | HTRA2 | Promotes or induces cell death |
| | HtrA Serine Peptidase 2 | |
| 60 | CARD18 Caspase Recruitment Domain Family Member 18 | Inhibits generation of IL-1-beta by interacting with caspase-1 and preventing its association with RIP2. |
| | | |

| | | <u>.</u> |
|--|--|---|
| 61 | IKBKB | NELD |
| | inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta | NFkB activator |
| 62 | IKBKE | Plays an assential rate in regulating inflammatory responses to viral |
| | Inhibitor Of Nuclear Factor Kappa B Kinase Subunit | Plays an essential role in regulating inflammatory responses to viral infection |
| | Epsilon | |
| 63 | IKBKG | |
| | Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer | NFkB activator |
| | in B-cells, kinase gamma | |
| | | Promotes apoptosis downstream of the tumor suppressor as component |
| 64 | LRDD | of the DNA damage/stress response pathway that connects p53/TP53 to |
| | P53-Induced Death Domain Protein 1 | apoptosis. |
| | | This protein also mediates a large variety of inflammatory, |
| 65 | LTA | immunostimulatory, and antiviral responses, is involved in the formation |
| 05 | | of secondary lymphoid organs during development and plays a role in |
| | Lymphotoxin Alpha | apoptosis. |
| 66 | LTB | |
| | Lymphotoxin Beta | Play a specific role in immune response regulation. |
| 67 | MCL1 | Involved in the regulation of apoptosis versus cell survival, and in the |
| 67 | | maintenance of viability but not of proliferation. |
| 68 | MCL1, BCL2 Family Apoptosis Regulator NLRP1 | <u> </u> |
| 08 | NLR Family Pyrin Domain Containing 1 | Plays a crucial role in innate immunity and inflammation. |
| 69 | NFKB1 | |
| 03 | nuclear factor of kappa light polypeptide gene | Rel protein-specific transcription inhibitor (105 kD) and DNA binding |
| | enhancer in B-cells 1 | subunit of the transcription factor NFkB (50 kD) |
| 70 | NFKB2 | |
| | nuclear factor of kappa light polypeptide gene | Subunit of the transcription factor NFkB |
| | enhancer in B-cells 2 (p49/p100) | |
| 71 | NFKBIA | |
| | nuclear factor of kappa light polypeptidegene | NFkB inhibitor |
| | | |
| | enhancer in B-cells inhibitor, alpha | |
| 72 | | |
| 72 | enhancer in B-cells inhibitor, alpha | Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm |
| | enhancer in B-cells inhibitor, alpha NFKBIB NFKB Inhibitor Beta | Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm |
| 72 73 | enhancer in B-cells inhibitor, alpha NFKBIB NFKB Inhibitor Beta NFKBIE | |
| 73 | enhancer in B-cells inhibitor, alpha NFKBIB NFKB Inhibitor Beta NFKBIE NFKB Inhibitor Epsilon | Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm |
| | enhancer in B-cells inhibitor, alpha NFKBIB NFKB Inhibitor Beta NFKBIE NFKB Inhibitor Epsilon NFKBIZ | Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm |
| 73 74 | enhancer in B-cells inhibitor, alpha NFKBIB NFKB Inhibitor Beta NFKBIE NFKB Inhibitor Epsilon NFKBIZ NFKB Inhibitor Zeta | Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm. Involved in regulation of NF-kappa-B transcription factor complexes. |
| 73 | enhancer in B-cells inhibitor, alpha NFKBIB NFKB Inhibitor Beta NFKBIE NFKB Inhibitor Epsilon NFKBIZ NFKB Inhibitor Zeta PEA15 | Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm. Involved in regulation of NF-kappa-B transcription factor complexes. Inhibits both TNFRSF6- and TNFRSF1A-mediated CASP8 activity and |
| 73 74 75 | enhancer in B-cells inhibitor, alpha NFKBIB NFKB Inhibitor Beta NFKBIE NFKB Inhibitor Epsilon NFKBIZ NFKB Inhibitor Zeta PEA15 Proliferation And Apoptosis Adaptor Protein 15 | Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm. Involved in regulation of NF-kappa-B transcription factor complexes. |
| 73 74 | enhancer in B-cells inhibitor, alpha NFKBIB NFKB Inhibitor Beta NFKBIE NFKB Inhibitor Epsilon NFKBIZ NFKB Inhibitor Zeta PEA15 | Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm. Involved in regulation of NF-kappa-B transcription factor complexes. Inhibits both TNFRSF6- and TNFRSF1A-mediated CASP8 activity and apoptosis. |
| 73 74 75 | enhancer in B-cells inhibitor, alpha NFKBIB NFKB Inhibitor Beta NFKB Inhibitor Epsilon NFKBIZ NFKB Inhibitor Zeta PEA15 Proliferation And Apoptosis Adaptor Protein 15 PMAIP1 | Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm. Involved in regulation of NF-kappa-B transcription factor complexes. Inhibits both TNFRSF6- and TNFRSF1A-mediated CASP8 activity and |
| 73 74 75 76 | enhancer in B-cells inhibitor, alpha NFKBIB NFKB Inhibitor Beta NFKBIE NFKB Inhibitor Epsilon NFKBIZ NFKB Inhibitor Zeta PEA15 Proliferation And Apoptosis Adaptor Protein 15 PMAIP1 Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1 | Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm. Involved in regulation of NF-kappa-B transcription factor complexes. Inhibits both TNFRSF6- and TNFRSF1A-mediated CASP8 activity and apoptosis. Promotes activation of caspases and apoptosis. |
| 73 74 75 | enhancer in B-cells inhibitor, alpha NFKBIB NFKB Inhibitor Beta NFKBIE NFKB Inhibitor Epsilon NFKBIZ NFKB Inhibitor Zeta PEA15 Proliferation And Apoptosis Adaptor Protein 15 PMAIP1 Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1 PYCARD | Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm. Involved in regulation of NF-kappa-B transcription factor complexes. Inhibits both TNFRSF6- and TNFRSF1A-mediated CASP8 activity and apoptosis. |
| 73 74 75 76 | enhancer in B-cells inhibitor, alpha NFKBIB NFKB Inhibitor Beta NFKBIE NFKB Inhibitor Epsilon NFKBIZ NFKB Inhibitor Zeta PEA15 Proliferation And Apoptosis Adaptor Protein 15 PMAIP1 Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1 PYCARD PYD And CARD Domain Containing | Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm. Involved in regulation of NF-kappa-B transcription factor complexes. Inhibits both TNFRSF6- and TNFRSF1A-mediated CASP8 activity and apoptosis. Promotes activation of caspases and apoptosis. Functions as key mediator in apoptosis and inflammation. |
| 73 74 75 76 | enhancer in B-cells inhibitor, alpha NFKBIB NFKB Inhibitor Beta NFKBIE NFKB Inhibitor Epsilon NFKBIZ NFKB Inhibitor Zeta PEA15 Proliferation And Apoptosis Adaptor Protein 15 PMAIP1 Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1 PYCARD PYD And CARD Domain Containing REL | Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm. Involved in regulation of NF-kappa-B transcription factor complexes. Inhibits both TNFRSF6- and TNFRSF1A-mediated CASP8 activity and apoptosis. Promotes activation of caspases and apoptosis. Functions as key mediator in apoptosis and inflammation. Proto-oncogene plays a role in the survival and proliferation of B |
| 73 74 75 76 77 | enhancer in B-cells inhibitor, alpha NFKBIB NFKB Inhibitor Beta NFKBIE NFKB Inhibitor Epsilon NFKBIZ NFKB Inhibitor Zeta PEA15 Proliferation And Apoptosis Adaptor Protein 15 PMAIP1 Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1 PYCARD PYD And CARD Domain Containing REL REL Proto-Oncogene, NF-KB Subunit | Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm. Involved in regulation of NF-kappa-B transcription factor complexes. Inhibits both TNFRSF6- and TNFRSF1A-mediated CASP8 activity and apoptosis. Promotes activation of caspases and apoptosis. Functions as key mediator in apoptosis and inflammation. |
| 73 74 75 76 | enhancer in B-cells inhibitor, alpha NFKBIB NFKB Inhibitor Beta NFKB Inhibitor Epsilon NFKBIZ NFKB Inhibitor Zeta PEA15 Proliferation And Apoptosis Adaptor Protein 15 PMAIP1 Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1 PYCARD PYD And CARD Domain Containing REL REL Proto-Oncogene, NF-KB Subunit RELA | Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm. Involved in regulation of NF-kappa-B transcription factor complexes. Inhibits both TNFRSF6- and TNFRSF1A-mediated CASP8 activity and apoptosis. Promotes activation of caspases and apoptosis. Functions as key mediator in apoptosis and inflammation. Proto-oncogene plays a role in the survival and proliferation of B lymphocytes. |
| 73 74 75 76 77 | enhancer in B-cells inhibitor, alpha NFKBIB NFKB Inhibitor Beta NFKBIE NFKB Inhibitor Epsilon NFKBIZ NFKB Inhibitor Zeta PEA15 Proliferation And Apoptosis Adaptor Protein 15 PMAIP1 Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1 PYCARD PYD And CARD Domain Containing REL REL Proto-Oncogene, NF-KB Subunit RELA v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene | Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm. Involved in regulation of NF-kappa-B transcription factor complexes. Inhibits both TNFRSF6- and TNFRSF1A-mediated CASP8 activity and apoptosis. Promotes activation of caspases and apoptosis. Functions as key mediator in apoptosis and inflammation. Proto-oncogene plays a role in the survival and proliferation of B |
| 73 74 75 76 77 78 79 | enhancer in B-cells inhibitor, alpha NFKBIB NFKB Inhibitor Beta NFKBIE NFKB Inhibitor Epsilon NFKBIZ NFKB Inhibitor Zeta PEA15 Proliferation And Apoptosis Adaptor Protein 15 PMAIP1 Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1 PYCARD PYD And CARD Domain Containing REL REL Proto-Oncogene, NF-KB Subunit RELA v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A | Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm. Involved in regulation of NF-kappa-B transcription factor complexes. Inhibits both TNFRSF6- and TNFRSF1A-mediated CASP8 activity and apoptosis. Promotes activation of caspases and apoptosis. Functions as key mediator in apoptosis and inflammation. Proto-oncogene plays a role in the survival and proliferation of B lymphocytes. |
| 73 74 75 76 77 | enhancer in B-cells inhibitor, alpha NFKBIB NFKB Inhibitor Beta NFKBIE NFKB Inhibitor Epsilon NFKBIZ NFKB Inhibitor Zeta PEA15 Proliferation And Apoptosis Adaptor Protein 15 PMAIP1 Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1 PYCARD PYD And CARD Domain Containing REL REL Proto-Oncogene, NF-KB Subunit RELA v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A RELB | Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm. Involved in regulation of NF-kappa-B transcription factor complexes. Inhibits both TNFRSF6- and TNFRSF1A-mediated CASP8 activity and apoptosis. Promotes activation of caspases and apoptosis. Functions as key mediator in apoptosis and inflammation. Proto-oncogene plays a role in the survival and proliferation of B lymphocytes. |
| 73 74 75 76 77 78 79 | enhancer in B-cells inhibitor, alpha NFKBIB NFKB Inhibitor Beta NFKBIE NFKB Inhibitor Epsilon NFKBIZ NFKB Inhibitor Zeta PEA15 Proliferation And Apoptosis Adaptor Protein 15 PMAIP1 Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1 PYCARD PYD And CARD Domain Containing REL REL Proto-Oncogene, NF-KB Subunit RELA v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A | Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm. Involved in regulation of NF-kappa-B transcription factor complexes. Inhibits both TNFRSF6- and TNFRSF1A-mediated CASP8 activity and apoptosis. Promotes activation of caspases and apoptosis. Functions as key mediator in apoptosis and inflammation. Proto-oncogene plays a role in the survival and proliferation of B lymphocytes. Subunit of the transcription factor NFkB |
| 73 74 75 76 77 78 79 | enhancer in B-cells inhibitor, alpha NFKBIB NFKB Inhibitor Beta NFKBIE NFKB Inhibitor Epsilon NFKBIZ NFKB Inhibitor Zeta PEA15 Proliferation And Apoptosis Adaptor Protein 15 PMAIP1 Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1 PYCARD PYD And CARD Domain Containing REL REL Proto-Oncogene, NF-KB Subunit RELA v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A RELB | Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm. Involved in regulation of NF-kappa-B transcription factor complexes. Inhibits both TNFRSF6- and TNFRSF1A-mediated CASP8 activity and apoptosis. Promotes activation of caspases and apoptosis. Functions as key mediator in apoptosis and inflammation. Proto-oncogene plays a role in the survival and proliferation of B lymphocytes. Subunit of the transcription factor NFkB |
| 73 74 75 76 77 78 79 | enhancer in B-cells inhibitor, alpha NFKBIB NFKB Inhibitor Beta NFKBIE NFKB Inhibitor Epsilon NFKBIZ NFKB Inhibitor Zeta PEA15 Proliferation And Apoptosis Adaptor Protein 15 PMAIP1 Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1 PYCARD PYD And CARD Domain Containing REL REL Proto-Oncogene, NF-KB Subunit RELA v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A RELB RELB Proto-Oncogene, NF-KB Subunit | Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm. Involved in regulation of NF-kappa-B transcription factor complexes. Inhibits both TNFRSF6- and TNFRSF1A-mediated CASP8 activity and apoptosis. Promotes activation of caspases and apoptosis. Functions as key mediator in apoptosis and inflammation. Proto-oncogene plays a role in the survival and proliferation of B lymphocytes. Subunit of the transcription factor NFkB Is required for both T and B lymphocyte maturation and function |
| 73 74 75 76 77 78 79 | enhancer in B-cells inhibitor, alpha NFKBIB NFKB Inhibitor Beta NFKBIE NFKB Inhibitor Epsilon NFKBIZ NFKB Inhibitor Zeta PEA15 Proliferation And Apoptosis Adaptor Protein 15 PMAIP1 Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1 PYCARD PYD And CARD Domain Containing REL REL Proto-Oncogene, NF-KB Subunit RELA v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A RELB RELB Proto-Oncogene, NF-KB Subunit | Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm. Involved in regulation of NF-kappa-B transcription factor complexes. Inhibits both TNFRSF6- and TNFRSF1A-mediated CASP8 activity and apoptosis. Promotes activation of caspases and apoptosis. Functions as key mediator in apoptosis and inflammation. Proto-oncogene plays a role in the survival and proliferation of B lymphocytes. Subunit of the transcription factor NFkB Is required for both T and B lymphocyte maturation and function Plays a role in inflammation and cell death in response to tissue damage, |
| 73 74 75 76 77 78 79 | enhancer in B-cells inhibitor, alpha NFKBIB NFKB Inhibitor Beta NFKBIE NFKB Inhibitor Epsilon NFKBIZ NFKB Inhibitor Zeta PEA15 Proliferation And Apoptosis Adaptor Protein 15 PMAIP1 Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1 PYCARD PYD And CARD Domain Containing REL REL Proto-Oncogene, NF-KB Subunit RELA v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A RELB RELB Proto-Oncogene, NF-KB Subunit | Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm. Involved in regulation of NF-kappa-B transcription factor complexes. Inhibits both TNFRSF6- and TNFRSF1A-mediated CASP8 activity and apoptosis. Promotes activation of caspases and apoptosis. Functions as key mediator in apoptosis and inflammation. Proto-oncogene plays a role in the survival and proliferation of B lymphocytes. Subunit of the transcription factor NFkB Is required for both T and B lymphocyte maturation and function Plays a role in inflammation and cell death in response to tissue damage, |
| 73 74 75 76 77 78 79 80 | enhancer in B-cells inhibitor, alpha NFKBIB NFKB Inhibitor Beta NFKB Inhibitor Epsilon NFKBIZ NFKB Inhibitor Zeta PEA15 Proliferation And Apoptosis Adaptor Protein 15 PMAIP1 Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1 PYCARD PYD And CARD Domain Containing REL REL Proto-Oncogene, NF-KB Subunit RELA v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A RELB RELB Proto-Oncogene, NF-KB Subunit RIPK1 Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 1 | Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm. Involved in regulation of NF-kappa-B transcription factor complexes. Inhibits both TNFRSF6- and TNFRSF1A-mediated CASP8 activity and apoptosis. Promotes activation of caspases and apoptosis. Functions as key mediator in apoptosis and inflammation. Proto-oncogene plays a role in the survival and proliferation of B lymphocytes. Subunit of the transcription factor NFkB Is required for both T and B lymphocyte maturation and function Plays a role in inflammation and cell death in response to tissue damage, pathogen recognition, and as part of developmental regulation. |

| 83 | TBK1 | Plays an essential role in regulating inflammatory responses to foreign | |
|----------------|---|---|--|
| | TANK Binding Kinase 1 | agents | |
| 84 | TNF | Multifunctional proinflammatory cytokine ligand for TNFRSF1A and | |
| | tumor necrosis factor | TNFRSF1B | |
| 85 | TNFRSF10A | | |
| | tumor necrosis factor receptor superfamily member 10a | Receptor with death domain for TNFSF10; NFkB activator | |
| 86 | TNFRSF10B | Receptor with death domain for TNFSF10; ER stress-induced apoptosis | |
| | tumor necrosis factor receptor superfamily member 10b | promoter; NFkB activator | |
| 87 | TNFRSF1A | Receptor with death domain for TNF and LTA (lymphotoxin alpha); NFkB | |
| | tumor necrosis factor receptor superfamily | activator, apoptosis mediator, and inflammation regulator | |
| | member 1A | | |
| | | | |
| 88 | TNFRSF1B | Mediates the recruitment of two anti-apoptotic proteins, c-IAP1 and c- | |
| 88 | TNFRSF1B TNF Receptor Superfamily Member 1B | Mediates the recruitment of two anti-apoptotic proteins, c-IAP1 and c-IAP2 | |
| 88 89 | | IAP2 | |
| | TNF Receptor Superfamily Member 1B | • • • • • • | |
| | TNF Receptor Superfamily Member 1B TNFRSF21 | IAP2 | |
| | TNF Receptor Superfamily Member 1B TNFRSF21 | Promotes apoptosis Receptor for TNFSF12/APO3L/TWEAK. Interacts directly with the adapter TRADD. Mediates activation of NF-kappa-B and induces apoptosis. May | |
| 89 | TNF Receptor Superfamily Member 1B TNFRSF21 TNF Receptor Superfamily Member 21 | Promotes apoptosis Receptor for TNFSF12/APO3L/TWEAK. Interacts directly with the adapter | |
| 89 | TNF Receptor Superfamily Member 1B TNFRSF21 TNF Receptor Superfamily Member 21 TNFRSF25 | Promotes apoptosis Receptor for TNFSF12/APO3L/TWEAK. Interacts directly with the adapter TRADD. Mediates activation of NF-kappa-B and induces apoptosis. May play a role in regulating lymphocyte homeostasis. | |
| 89 | TNF Receptor Superfamily Member 1B TNFRSF21 TNF Receptor Superfamily Member 21 TNFRSF25 TNF Receptor Superfamily Member 25 | Promotes apoptosis Receptor for TNFSF12/APO3L/TWEAK. Interacts directly with the adapter TRADD. Mediates activation of NF-kappa-B and induces apoptosis. May | |
| 89 | TNF Receptor Superfamily Member 1B TNFRSF21 TNF Receptor Superfamily Member 21 TNFRSF25 TNF Receptor Superfamily Member 25 TNFSF10 | Promotes apoptosis Receptor for TNFSF12/APO3L/TWEAK. Interacts directly with the adapter TRADD. Mediates activation of NF-kappa-B and induces apoptosis. May play a role in regulating lymphocyte homeostasis. | |
| 89 90 91 | TNF Receptor Superfamily Member 1B TNFRSF21 TNF Receptor Superfamily Member 21 TNFRSF25 TNF Receptor Superfamily Member 25 TNFSF10 tumor necrosis factor superfamily member 10 | Promotes apoptosis Receptor for TNFSF12/APO3L/TWEAK. Interacts directly with the adapter TRADD. Mediates activation of NF-kappa-B and induces apoptosis. May play a role in regulating lymphocyte homeostasis. | |

3.3.9. QUANTIFICAÇÃO RELATIVA (RT-qPCR) – EXPRESSÃO GÊNICA ÚNICA (SINGLE GENE EXPRESSION)

Os genes APAF1(Apoptotic Peptidase Activating Factor 1), TP53 (Tumor Protein P53), FAS, FASLG (Fas Ligand), IL10 (Interleukin 10), IL10RA (Interleukin 10 Receptor, Alpha), BCL2L14 (BCL2 Like 14), BOK (BCL2 Family Apoptosis Regulator BOK), TNFRSF21 (Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily member 21), CASP2 Caspase 2), BCL2 (B-cell CLL/lymphoma 2), BCL2L1 (BCL2 Like 1), BIRC8 (Baculoviral IAP Repeat Containing 8) e TNFRSF13B foram testados separadamente nos indivíduos (tabela 3). A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada com TaqMan® (Thermo Fisher Scientific Inc.). Cada cDNA foi amplificado utilizando primers específicos para cada gene de referência (GAPDH e HPRT1). Para isso, cada qPCR foi feita em triplicata, adicionou-se 6,25 μL de TaqMan® Gene Expression Master Mix (catálogo: 4369016; Thermo Fisher Scientific Inc.); 0,625 μL do respectivo primer mix; 0,625 μL de água livre de nuclease e 5 μL contendo 10 ng de amostra de cDNA diluído em água livre de nucleases, resultando em um volume total de 12,5 μL. Os experimentos foram realizados no equipamento Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Thermo Fisher Scientific Inc.) utilizando-se o desvio padrão de Ct (Cicle Threshold) de 0,3.

Tabela 3: Lista dos genes estudados

| Gene | Name | Assay ID | Function |
|---------|---|---------------|----------|
| APAF1 | Apoptotic Peptidase Activating Factor 1 | Hs00559441_m1 | Target |
| BCL2 | BCL2 Apoptosis Regulator | Hs00608023_m1 | Target |
| BCL2L14 | BCL2 Like 14 | Hs01030396_m1 | Target |
| BCL2L1 | BCL2 Like 1 | Hs00236329_m1 | Target |
| BIRC8 | Baculoviral IAP Repeat Containing 8 | Hs01057786_s1 | Target |
| ВОК | BCL2 Family Apoptosis Regulator BOK | Hs00261296_m1 | Target |

| CASP2 | Caspase 2 | Hs00892484_m1 | Target |
|-----------|--|---------------|-----------|
| FAS | Fas Cell Surface Death Receptor | Hs00236330_m1 | Target |
| FASLG | Fas Ligand | Hs00181225_m1 | Target |
| GAPDH | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | 4332649 | Reference |
| HPRT1 | Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 | 4332657 | Reference |
| IL10 | Interleukin 10 | Hs00961622_m1 | Target |
| IL10RA | Interleukin 10 receptor, alpha | Hs00155485_m1 | Target |
| TNFRSF13B | TNF Receptor Superfamily Member 13B | Hs00963364_m1 | Target |
| TNFRSF21 | TNF Receptor Superfamily Member 21 | Hs01560898_m1 | Target |
| TP53 | Tumor Protein P53 | Hs01034249_m1 | Target |

3.4. ESTUDO DA ATIVIDADE FUNCIONAL POR CITOMETRIA DE FLUXO

3.4.1. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DE MEMBRANA CD267 (TACI)

A avaliação da expressão proteica por citometria de fluxo foi realizada em amostras de pacientes e controles por meio de células mononucleadas do sangue periférico (PBMC, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*). Primeiramente, as PBMC foram separadas em tubos de citometria com concentração de 1 x 10⁶ células/mL /tubo. Em seguida, os tubos foram lavados duas vezes com BD Pharmingen Stain Buffer gelado (número de catálogo: 554656; BD Biosciences) a 300 g por 7 min a 4 °C. As células ressuspendidas foram marcados os respectivos anticorpos e incubadas por 30 min a 4 °C, protegido da luz. Finalmente, lavamos duas vezes e ressuspendemos a amostra para análise no citômetro de fluxo.

Para identificar a expressão da proteína TACI (CD267), codificada pelo gene *TNFRSF13B*, usamos os seguintes anticorpos: anti-CD19-PE (número de catálogo: 340364; BD Biosciences), anti-CD27-Isotiocianato de fluoresceína (FITC, *Fluorescein Isothiocyanate*) (número de catálogo: 340424; BD Biosciences) e anti-CD267 Aloficocianina (APC, *Allophycocyanin*) (número de catálogo: 562345; BD Biosciences).

A aquisição de eventos ocorreu no citômetro de fluxo BD FACSVerse (BD Biosciences).

3.4.2. AVALIAÇÃO DA APOPTOSE

Após a separação das PBMC, lavamos as células com PBS gelado duas vezes. Então, ressuspendidos com tampão de ligação 1X, específico para ensaio de Anexina V, para estar em uma concentração de 1x10⁶ células/mL. Transferimos 1 x 10⁵ células para cada tubo de citometria. Em seguida, adicionamos 3μL de Anexina V e 3 μL de Iodeto de Propídio (PI, *Propidium Iodide*), homogeneizados e incubados por 15 min em temperatura ambiente, protegido da luz. Finalmente, adicionamos 300 μL de tampão de ligação 1x em cada tubo. A aquisição de eventos ocorreu no citômetro de fluxo BD FACSVerse (BD Biosciences).

3.5. DOSAGEM DE CITOCINAS NO PLASMA

3.5.1. LUMINEX

Foram verificadas as concentrações de IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 e TGF-β pela técnica de Multiplex (MILLIPLEX MAP Human High Sensitivity T Cell Panel - Immunology Multiplex Assay – Merck, Darmstadt, Alemanha) em pg/mL no equipamento de Imunoensaio Multiplex Bio-plex 200 (Bio-Rad, Berkeley, Califórnia, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 200 μL de tampão de lavagem (Wash Buffer) em cada poço, em seguida, a placa foi selada e homogeneizada em um agitador de placas por 10 min à

temperatura ambiente. Após a decantação do tampão de lavagem, foi removido a quantidade residual de todos os poços através da inversão da placa e adicionado 50 μL de cada diluição da curva padrão em cada poço apropriado. Em seguida, foram adicionados 25 μL do tampão de ensaio (Assay Buffer) aos poços das amostras e 25 µL das amostras em seus respectivos poços. Após essa etapa, foram adicionados 25 μL das beads em cada poço, esta placa foi selada e incubada em um agitador de placas por 16 h, no escuro, a 4 °C. No dia seguinte, o conteúdo dos poços foi removido cuidadosamente e a placa lavada por três vezes com 200 μL de tampão de lavagem. Posteriormente, foram adicionados 50 μL de anticorpos de detecção em cada poço da placa, que foi selada e incubada em um agitador de placas por 1 h em temperatura ambiente, protegida da luz. Após a incubação, adicionou-se 50 μL de estreptavidina-ficoeritrina em cada poço, seguido de incubação em um agitador de placas por 30 min, no escuro à temperatura ambiente. Em seguida, o conteúdo dos poços foi removido cuidadosamente, a placa lavada por três vezes com 200 µL de tampão de lavagem e adicionado 150 µL de Sheath Fluid em todos os poços. A seguir as beads foram ressuspendidas com auxílio de um agitador de placas por 5 min e levadas ao equipamento de Imunoensaio Multiplex Bio-plex 200. Os limites de detecção foram 0,19 pg/mL para IL-2; 0,12 pg/mL para IL-5; 0,11 pg/mL para IL-6 e 0,56 pg/mL para IL-10.

3.6. ANÁLISE DE DADOS

Os dados de quantificação da expressão gênica relativa foram gerados e analisados com o Software StepOne™ and StepOnePlus™ Software versão 2.3 e do a*rray* com o Software 7500, versão 2.0.5 (ambos Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

Para o *array* os dados foram convertidos para valores de *Fold Change* (FC), em que o inverso negativo (-1/x) é utilizado para valores entre 0 e 1 (por exemplo, 0,5 é convertido para -2). A conversão não é feita para valores acima de 1.

A expressão dos genes de interesse foi determinada de forma relativa, sendo os valores de expressão normalizados em relação a genes controles endógenos (*GAPDH* e *HPRT1*). Além disso, o modelo matemático geNorm ⁴³ foi utilizado para quantificar a expressão gênica e o valor obtido foi expresso em unidades arbitrárias (U.A.) ou valor absoluto de expressão.

As análises de citometria de fluxo foram realizadas no software FACSDIVA software (BD Bioscience).

Para a análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Prism versão 6.0 para Windows; GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Para amostras com distribuição normal, foi utilizado um teste T pareado e para amostras com distribuição não normal, o teste U Mann-Whitney pareado; os quais permitiu a comparação dos pacientes com os controles.

Para a comparação entre os pacientes utilizamos o teste Anova One-way para dados normais e para os dados com distribuição não normais o teste de Kruskal Wallis. O nível de significância adotado foi P<0,05.

4. RESULTADOS

4.1. DESCRIÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES COM MUTAÇÃO GERMINATIVA EM *TNFRSF13B* IDENTIFICADA POR STE

O paciente P01, 20 anos, sexo masculino, filho de pais não consanguíneos (figura 4A). Iniciou acompanhamento clínico no Serviço de Imunodeficiências Primárias do HC-UNICAMP aos 8 anos. Entretanto, antes disso, aos 4 anos foi submetido a amigdalectomia e adenoidectomia. Aos 8 anos apresentou equimoses em membros inferiores, trombocitopenia, linfadenopatia, esplenomegalia e telangectasia facial. Nesta idade a biópsia de linfonodo e mielograma indicaram hiperplasia linfoide reacional. Aos 10 anos iniciou terapia com Micofenolato (MMF),

mas devido à baixa adesão, precisou de 22 meses para resolução da trombocitopenia. Aos 11 anos, os níveis de IgA e IgG começaram a diminuir e a terapia de substituição de IgG foi necessária aos 13 anos, a cada 28 dias. Apresentou nível elevado de vitamina B12, linfócitos B reduzidas (CD19+) e aumento de linfócitos T duplamente negativos (DNT, Double Negative T Lymphocyte), portanto CD4 e CD8 negativos. História pregressa: amigdalite de repetição até os 4 anos (amigdalectomia); IgG positivo para EBV.

O paciente PO2, 25 anos, sexo masculino, filho de pais não consanguíneos (figura 4B), iniciou o acompanhamento clínico no ambulatório de imunodeficiências primárias do HC-UNICAMP aos 9 anos de idade. Neste período, apresentou linfadenopatia submandibular, o qual se disseminou (regiões submandibulares, cervicais, axilares e inguinais), associados a trombocitopenia, baixa IgA, porém IgM e IgG normais, leucopenia leve e sem anemia. Biópsia de linfonodo e mielograma indicaram hiperplasia linfoide reacional. Em 2007, iniciou MMF, que utilizou por 20 meses, com resolução da trombocitopenia. Faz uso de Imunoglobulina Intravenosa (IVIG, Intravenous Immunoglobulin) a cada 28 dias desde os 18 anos de idade. Aos 14 anos foi suspendido MMF e iniciou o uso de Rapamicina com efetiva redução dos linfonodos. História pregressa: cefaleia diária, amigdalite de repetição até 5 anos (amigdalectomia); varicela aos 3 anos; mononucleose em 4 anos; sinusopatia crônica; 2 pneumonias (1 ano e 6 anos); Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE) tratada de 11 meses a 2 anos; Herpes Zoster aos 11 anos.

O paciente P03, 22 anos, sexo masculino, filho de pais não consanguíneos (figura 4C). O primeiro sintoma aos 15 anos, com fenótipo clínico de trombocitopenia, sem história de infecção, sem queixa clínica associada atual e exame físico normal. Ausência de IgA, ligeira redução de IgG e valores normais de IgM. Linfócitos DNT elevados e níveis séricos elevados de vitamina B12. Fez uso de MMF durante 18 meses, mas sem sucesso no tratamento da trombocitopenia. Aos 20 anos foi necessária terapia IVIG.

Identificamos a variante patogênica em heterozigose NM_012452chr17: 16.852.187p.Cys104Arg (p.C104R), variação A> G por STE nos três pacientes e suas mães, que foram confirmados por sequenciamento de Sanger.

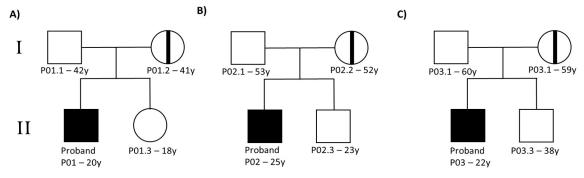


Figura 4: Heredograma dos pacientes.

4.2. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA CD267 (TACI) EM LINFÓCITOS B ATRAVÉS DA CITOMETRIA DE FLUXO

Quando avaliamos a expressão de CD267 (TACI) nos linfócitos B de memória (CD19+ e CD27+), verificamos que, comparados ao controle, os pacientes P01, P03 e todas as mães apresentaram discreta redução na expressão de CD267 na membrana, porém sem diferença estatística significativa. Apesar da diferença na média de intensidade de fluorescência (MFI, Mean Fluorescence Intensity) entre os pacientes e suas mães, não houve diferença significativa (figura 5 e 6).

Correlacionando a porcentagem de subtipos de linfócitos B com a expressão de CD267 em linfócitos B de memória (CD19+ CD27+), verificamos que PO2 e todas as mães apresentaram valores de % de linfócitos B acima do grupo controle. Embora as mães tivessem expressões de

CD267 abaixo do controle, elas tinham % de linfócitos B mais altas (figura 6). Sendo que verificamos diferença significativa apenas entre All Controls x P02: p= 0,0123; All Controls x P01 Mother: p=0,0170. Observamos também que P01 Mother apresentou a % de linfócitos B 3 vezes maior que seu filho (P01), havendo diferença significativa com p=0,0421.

Na avaliação da % de linfócitos B de memória, verificamos que não há correlação com a expressão de CD267, uma vez que P02 que apresentou alta expressão de CD267 (MFI=794), porém mostrou % de linfócito B de memória inferior a P03, P01 Mother, P02 Mother, P03 Mother e controles (figura 6).

Pudemos observar uma correlação dos linfócitos B de memória CD267+ com a expressão de CD267, uma vez que quando verificamos aumento de um o outro também aumenta. Houve diferença significativa entre P02 x P03: p=0,0337; P02 x P02 mother p=0,0096 (figura 6).

É importante salientar que no estudo de citometria de fluxo foi possível avaliar o paciente PO2 apenas sem o uso do medicamento Sirolimus (SRL), o qual foi avaliado após 2 meses de interrupção do tratamento (figura 7).

A % de linfócitos B CD267+ variou de acordo com a expressão de CD267 apenas em pacientes. Nas mães, essas células apresentaram quantidades semelhantes às do grupo controle, embora tivessem MFI de CD267 muito inferior ao do grupo controle (figura 6). Entretanto, não observamos diferença significativa entre os grupos neste tipo celular.

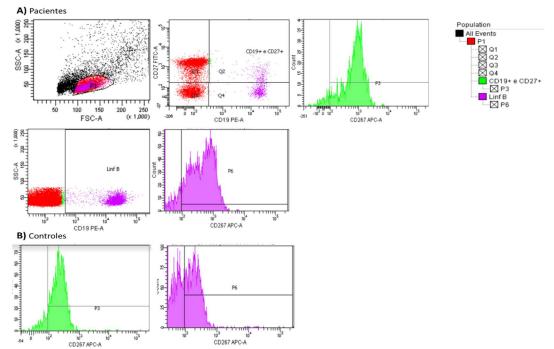


Figura 5: Análise dos dados de citometria de fluxo e estratégia de gates dos linfócitos B. A) Pacientes: primeiro e segundo dot plot refere-se a citometria de fluxo baseada nas análises de linfócitos B de memória (CD19+ CD27+) e o terceiro dot plot baseado em linfócitos B (CD19+). Ambos foram "gateados" da população de linfócitos totais (primeiro dot plot). O primeiro histograma é a variação da média de intensidade de fluorescência (MFI) expressa por CD267 nos linfócitos B de memória e o segundo histograma em linfócitos B. B) Controles: O primeiro histograma refere-se à MFI de CD267 em linfócitos B de memória e o segundo histograma é a MFI de CD267 de linfócitos B.

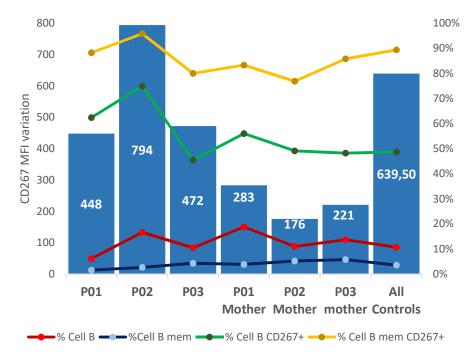


Figura 6: Correlação da expressão de CD267 em linfócitos B de memória com as porcentagens de subtipos de linfócitos B, como linfócitos B, linfócitos B de memória, linfócitos B CD267+ e linfócitos B de memória CD267+. Na % de linfócitos B, All Controls x P02: p=0,0123; All Controls x P01 Mother: p=0,0170; P01 x P01 Mother: p=0,0421. Na % de linfócitos B de memória CD267+, P02 x P03: p=0,0337; P02 x P02 mother p=0,0096.

4.3. ANÁLISE DE APOPTOSE POR CITOMETRIA DE FLUXO

O estudo da apoptose por citometria de fluxo utilizando os marcadores Anexina V e PI nos permitiu avaliar a % de células viáveis, % de células em apoptose (inicial e tardia) e % de células em necrose (figura 7).

Apesar de observarmos uma discreta redução da % de células em apoptose tardias e necrose em quase todos os indivíduos, exceto PO1, quando comparados com controles, esses resultados não foram significativos (figura 8).

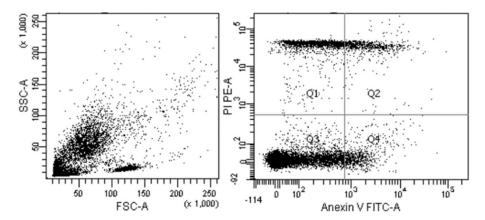


Figura 7: Análise de dados de apoptose por citometria de fluxo. Q1 representa as células em necrose, Q2 células em apoptose tardia, Q3 são as células viáveis e Q4 são as células no estágio inicial da apoptose.

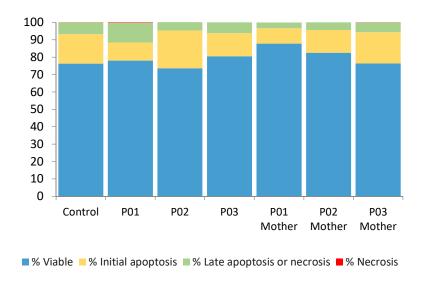


Figura 8: Resultados em porcentagem de células viáveis e apoptóticas.

4.4. EXPRESSÃO GÊNICA ARRAY VIA EXTRÍNSECA

Avaliamos a expressão de 44 genes selecionados da via extrínseca de apoptose em amostras de 2 pacientes não relacionados (P01 e P02 (SRL+)) com mutação em TNFRSF13B.

Exceto para TNFRSF13B, a análise do STE não mostrou variantes em nenhum desses genes.

Tabela 4 mostra a quantificação relativa (RQ) dos valores médios de FC em grupos: Muito hiperexpresso (RQ \geq 2), hiperexpresso (entre 1,5 e 1,99), expressão normal (entre -1,49 e 1,49), hipoexpresso (entre -1,5 e -1,99) e muito hipoexpresso (RQ \leq -2).

Embora carreguem a mesma mutação em TNFRSF13B, o perfil de expressão é diferente. Pois 35% dos genes no paciente P01 são hipoexpressos ou muito hipoexpressos, enquanto no paciente P02, temos apenas 21% com esse perfil. No paciente P02 aproximadamente 73% dos genes apresentam expressão normal, enquanto no P01, apenas 61%.

| | P01 | P02 (SRL+) |
|---|----------|------------|
| Muito Hiperexpresso (≥2) | 1 (2%) | 1 (3%) |
| Hiperexpresso (1.5 até 1.99) | 1 (2%) | 2 (5%) |
| Expressão Normal (entre -1.49 até 1.49) | 25 (61%) | 29 (73%) |
| Hipoexpresso (-1.5 até -1.99) | 8 (20%) | 5 (13%) |
| Muito Hipoexpresso (≤-2) | 6 (15%) | 3 (8%) |

Tabela 4: Quantificação relativa dos genes da via extrínseca da apoptose em PO1 e PO2 (SRL+), previamente examinados no *array*. Muito hiperexpresso (FC≥2), hiperexpresso (1,99 ≥ FC ≥ 1,5), expressão normal (1,49 ≥ FC ≥ 0,67), hipoexpresso (-1,5 ≤ FC ≥ -1,99) e muito hipoexpresso (FC ≤ 2) no *array* da via extrínseca.

Os genes BAX (BCL2-associated X protein), CASP2, CASP9 (Caspase 9), CHUK (Conserved Helix-loop-helix Ubiquitous Kinase), DAXX (Death-domain Associated Protein), DIABLO (Diablo, IAP-binding mitochondrial protein), IKBKG (Inhibitor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, Kinase Gamma), NFKB2 (Nuclear Factor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2), NFKBIA (Nuclear Factor of Kappa light polypeptidegene enhancer in B-cells inhibitor, Alpha), NGFR (Nerve Growth Factor Receptor), TNF, TNFRSF10A (Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily member 10a), TNFRSF10B (Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily member 1A), TNFRSF25 (Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily member 25), TNFRSF6B (Tumor Necrosis Factor

Receptor Superfamily member 6b), TNFSF10 (Tumor Necrosis Factor superfamily member 10), TP53 e *TRAF2* (TNF Receptor Associated Factor 2) apresentaram expressão normal em ambos os pacientes (anexo 1).

O HeatMap mostrado na figura 9 ilustra uma visão geral dos valores médios de FC na expressão dos genes em relação ao FC médio do grupo de controle.

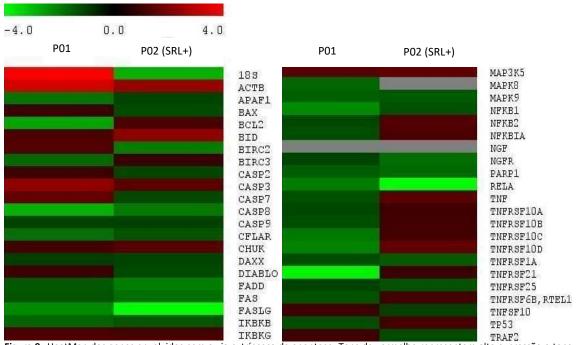


Figura 9: HeatMap dos genes envolvidos com a via extrínseca da apoptose. Tons de vermelho representam alta expressão e tons verdes representam baixa expressão. Tons próximos ao preto apresentam expressão normal. Cinza representam análise não realizada.

Os genes estudados foram agrupados de acordo com sua função e estrutura. Genes da família CARD, MAPK e IAP (*Inhibitors of Apoptosis Proteins*) apresentaram 100% de discordância na expressão de PO1 e PO2 (SRL+). O grupo "Others" e a família do TNF e TNFR foram os que apresentaram menor índice de discordância, 20% e 38%, respectivamente (figura 10).

APAF1 que pertence à família de genes contendo o Domínio de Recrutamento da Caspase (CARD, Caspase Recruitment Domain Containing), foi hipoexpresso apenas em P01, resultado consistente com RT-qPCR (Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction) (tabela 5 e anexo 1).

Entre os membros da família *BCL2* (*BAX, BCL2* e *BID*) - via regulatória - apenas o gene *BCL2* apresentou muito hipoexpresso para P01, e o gene *BID* (*BH3 Interacting Domain Death Agonist*) foi muito hiperexpresso para P02 (SRL+) (tabela 5 e 6 e anexo 1).

Além disso, ambos os pacientes apresentavam níveis muito baixos de um dos reguladores negativos da apoptose da família das proteínas inibidoras da apoptose (IAP, Inhibitors of Apoptosis Proteins), BIRC2 (Baculoviral IAP Repeat Containing 2) para PO2 e BIRC3 (Baculoviral IAP Repeat Containing 3) para PO1 (tabela 5 e 6 e anexo 1).

Ao avaliar a expressão gênica das caspases, encontramos CASP8 (Caspase 8) hipoexpresso para ambos, sendo P01 muito hipoexpresso e P02 apenas hipoexpresso; CFLAR (CASP8 and FADD Like Apoptosis Regulator) que faz parte da cascata que regula a atividade de CASP8 e, consequentemente, um regulador negativo da apoptose, foi hipoexpresso apenas para P01; e CASP3 (Caspase 3) foi muito hiperexpressos e CASP7 (Caspase 7) foi hiperexpressos para P01 (tabela 5 e 6 e anexo 1).

Entre os genes da cascata de sinalização MAPK, o gene *MAP3K5* (*Mitogen-Activated Protein Kinase kinase kinase 5*) foi encontrado para ser ligeiramente hiperexpresso em P02, no entanto, *MAPK8* (*Mitogen-Activated Protein Kinase 8*) e *MAPK9* (*Mitogen-Activated Protein Kinase 9*) foram hipoexpressos para P01 (tabela 5 e 6 e anexo 1).

No grupo da via de sinalização NFkB não encontramos genes com expressão acima do normal, NFKB1 (Nuclear Factor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1), RELA e IKBKB (Inhibitor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, Kinase Beta) estavam com baixa expressão em PO1 e NGFR, RELA também com hipoexpressão e muita hipoexpressão respectivamente para PO2. É importante notar que a expressão de RELA no paciente PO2 apresentou uma expressão extremamente baixa (FC= -149,40), a expressão mais baixa de todo o ensaio (tabela 5 e 6 e anexo 1).

Quando avaliamos os genes da superfamília TNF e TNFR, encontramos uma prevalência de genes hipoexpressos ou muito hipoexpressos. *TNFRSF10C* (*Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily member 10c*), *TNFRSF10D* (*Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily member 10d*), *TNFRSF21* e *FASLG* no paciente P01 e *FADD* (*Fas Associated via Death Domain*), *FAS* e *FASLG* para P02, exceto para o gene *TNFRSF10D* que foi ligeiramente hiperexpresso em P02 (tabela 5 e 6 e anexo 1).

Dos outros genes, como *DAXX, DIABLO, PARP1* (*PolyADP-ribose Polymerase 1*), *TP53* e *TRAF2*, apenas *PARP1* foi hipoexpresso para P02 (tabela 5 e 6 e anexo 1).

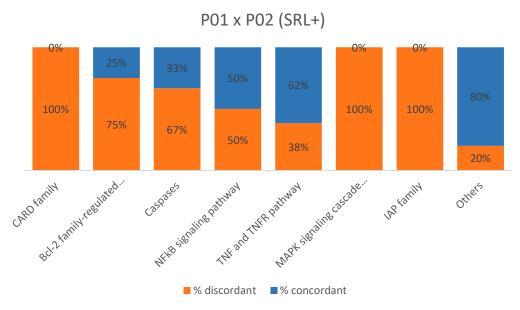


Figura 10: Resultados dos índices de concordância e discordância da expressão gênica da via extrínseca da apoptose, entre os pacientes avaliados por famílias de genes no *array*.

| P01 | | | | | |
|------------------------|--------------------------------|------------------------------|--|--------------------------------|--------------------------------|
| | Muito Hiperexpresso (≥2) | Hiperexpresso (1.5 and 1.99) | Expressão Normal (- 1.49 a 1.49) | Hipoexpresso (-1.5 a -1.99) | Muito Hipoexpresso (≤-2) |
| CARD family | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Bcl-2 family | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 |
| Caspases | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| NFkB signaling pathway | 0 | 0 | 5 | 2 | 1 |
| TNF and TNFR pathway | 0 | 0 | 9 | 1 | 3 |
| MAPK signaling cascade | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 |
| IAP family | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| Outros | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 |
| Total | 1 | 1 | 25 | 8 | 6 |

Tabela 5: Expressão gênica da via extrínseca da apoptose no paciente PO1 separado por famílias de genes.

| P02 (SRL+) | | | | | |
|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|--|--------------------------------|---------------------------------|
| | Muito Hiperexpresso (≥2) | Hiperexpresso (1.5 and 1.99) | Expressão Normal (- 1.49 a 1.49) | Hipoexpresso (-1.5 a -1.99) | Muito Hipoexpress o (≤-2) |
| CARD family | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Bcl-2 family | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| Caspases | 0 | 0 | 5 | 1 | 0 |
| NFkB signaling pathway | 0 | 0 | 6 | 1 | 1 |
| TNF and TNFR pathway | 0 | 1 | 9 | 2 | 1 |
| MAPK signaling cascade | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| IAP Family | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| Outros | 0 | 0 | 4 | 1 | 0 |
| Total | 1 | 2 | 29 | 5 | 3 |

Tabela 6: Expressão gênica da via extrínseca da apoptose no paciente PO2 (SRL+) separado por famílias de genes.

4.5. EXPRESSÃO GÊNICA ARRAY VIA INTRÍNSECA E EXTRÍNSECA

Para a amplificação de nossos testes, realizamos ensaios com a placa TaqMan® Array 96-well Human Apoptosis, os genes analisados são de ambas as vias da apoptose, a via regulada pelos receptores de morte e a via da família BCL-2. Para este ensaio foi possível testar o paciente P02 em dois momentos, um deles com SRL (P02 (SRL+)) e o outro sem SRL (P02) após 2 meses de interrupção. Com isso, foi possível avaliar a interferência desse fármaco na expressão dos genes de ambas as vias de apoptose. Os outros dois pacientes P01 e P03 não fizeram uso dessa droga para avaliação.

Exceto para TNFRSF13B, a análise do exoma não mostrou variantes em nenhum desses genes.

Ao avaliar a expressão de genes de ambas as vias para P01 e P02 (SRL+), o perfil é semelhante ao ensaio anterior da via extrínseca. P01 tem uma quantidade maior de genes desregulados (34,4%) em relação à P02 (SRL+) (12,6%). Há uma incidência maior de genes hipoexpressos ou muito hipoexpressos no P01 (18%) do que em P02 (SRL +) (3%) (tabela 7).

Porém, ao avaliar PO2 (SRL-), encontramos um aumento na quantidade de genes desregulados (24%). Embora PO3 tenha sido o indivíduo menos sintomático, apresentou 71,1% dos genes desregulados.

| | P01 | P02 (SRL+) | P02 | P03 |
|-----------------------------------|---------------|------------|------------|------------|
| Muito Hiperexpresso (≥2) | 8 (9,2%) | 2 (2,3%) | 3 (3,4%) | 27 (31,0%) |
| Hiperexpresso (1.5 até 1.99) | 7 (8,0%) | 6 (6,9%) | 10 (11,5%) | 15 (17,2%) |
| Expressão Normal (-1.49 até 1.49) | 57 (65,5%) | 76 (88,5%) | 66 (75,9%) | 25 (28,7%) |
| Hipoexpresso (-1.5 até -1.99) | 12 (13,8%) | 0 (0%) | 3 (3,4%) | 3 (3,4%) |
| Muito hipoexpresso (≤-2) | 3 (3,4%) | 3 (3,4%) | 5 (5,7%) | 17 (19,5%) |

Tabela 7: Quantificação relativa dos genes de ambas as vias da apoptose em P01, P02 (SRL+ e SRL-) e P03, previamente examinados no *array*. Muito hiperexpresso (FC≥2), hiperexpresso (1,99 ≥ FC ≥ 1,5), expressão normal (1,49 ≥ FC ≥ 0,67), hipoexpresso (-1,5 ≤ FC ≥ -1,99) e muito hipoexpresso (FC ≤ 2).

Quando comparamos a expressão dos genes das duas vias da apoptose para o paciente P02 com e sem SRL o perfil apresenta-se mais desregulado sem o medicamento. Cerca de 88% dos genes apresentaram expressão normal no indivíduo com o SRL, mas com a retirada do medicamento houve diminuição de 12,6% na expressão normal dos genes (tabela 7).

O HeatMap mostrado na figura 11 ilustra uma visão geral dos valores médios de FC na expressão do gene em relação ao FC médio do grupo de controle.

Como essa placa cobre as vias intrínseca e extrínseca, 30 genes já haviam sido quantificados anteriormente. Eles são APAF1, BAX, BCL2, BID, BIRC3, CASP2, CASP3, CASP7, CASP8, CASP9, CFLAR, CHUK, DIABLO, FADD, FAS, FASLG, IKBKB, IKBKG, NFKB1, NFKB1, NFKB1, NFKB2, REL (REL Proto-Oncogene, NF-KB Subunit), TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF1A, TNFRSF21, TNFRSF25 e TNFSF10. Embora tenhamos utilizado as mesmas amostras para P01 e P02 (SRL+), 11 genes (BID, BIRC2, CASP3, CASP8, CFLAR, FADD, FAS, FASLG, IKBKB, NFKB1 e RELA) apresentaram perfil de expressão diferente dos resultados anteriores (anexo 1 e 2).



Figura 11: HeatMap dos genes envolvidos com a via intrínseca e extrínseca da apoptose. Tons de vermelho representam alta expressão e tons verdes representam baixa expressão. Tons próximos ao preto apresentam expressão normal. Cinza representam análise não realizada.

Dos genes quantificados neste *array* temos os da família CARD, os quais encontramos alterados o *APAF1*, *BCL10* (*B Cell CLL/Lymphoma 10*), *CARD6* (*Caspase Recruitment Domain Family Member 6*), *CARD9* (*Caspase Recruitment Domain Family Member 9*) e *PYCARD* (*PYD And CARD Domain Containing*). *APAF1* e *BCL10* mostraram um perfil de hipoexpressão e *CARD6* muito hipoexpresso em P01. Para P03, os genes *BCL10* e *CARD6* estavam muito hipoexpressos, mas *APAF1*, *CARD9* e *PYCARD* mostraram-se muito hiperexpressos. Enquanto P02 (SRL+) não apresentou desregulação nesta família de genes. Quando avaliamos P02 SRL-, encontramos leve hipoexpressão em *CARD6* (tabelas 8-11 e anexo 2).

E os genes da família Bcl-2 mostraram-se desregulados em todos os pacientes. Em P01 BAD (BCL2 associated agonist of cell death), BAK1(BCL2 Antagonist/Killer 1), BCL2L11 (BCL2 Like 11), BCL2L13 (BCL2 Like 13), BCL2L14, BCL2L1 e BNIP3L (BCL2 Interacting Protein 3 Like) são hiperexpressos ou muito hiperexpressos, e BCL2A1 (BCL2 Related Protein A1) e BCL2 hipoexpressos e muito hipoexpressos, respectivamente. Em P02 (SRL+) temos uma predominância de hiperexpressão ou muito hiperexpressão com BAK1, BCL2A1, BCL2L1, BCL3 (B Cell CLL/Lymphoma 3) e BNIP3L. Apenas o gene BOK foi muito hipoexpresso nesta família de genes para P02 (SRL+). O mesmo paciente sem a droga (P02) também apresentou predominância de hiperexpressão com BAX, BCL2L11, BCL2L13 e BNIP3L, exceto o gene BOK que se mostrou muito hipoexpresso. Quando avaliamos P03 também encontramos uma predominância do perfil alto, com BAD, BAX, BBC3 (BCL2 Binding Component 3), BCL2L11, BCL2L13, BCL2L14, BCL3, BID e BNIP3L, apenas 2 genes desta família foram muito hipoexpressos, BAK1 e BNIP3 (BCL2 Interacting Protein 3) (tabelas 8-11 e anexo 2).

Avaliando os genes da via de sinalização NFκB, encontramos poucas alterações em P01, onde RELA e NFKBIZ (NFKB Inhibitor Zeta) foram hipoexpressos. Em P02 NFKBIZ, RELB (RELB Proto-Oncogene, NF-KB Subunit) e NFKB2 estavam hiperexpressos e CHUK muito hipoexpresso. No entanto, o paciente P03 mostrou um perfil de expressão completamente elevado de genes da via de sinalização NFκB, com IKBKG, NFKB1, NFKB2, NFKBIA, NFKBIE (NFKB Inhibitor Epsilon) e RELB muito hiperexpressos e RELA e REL foram hiperexpressos, entretanto CHUK muito hipoexpresso (FC-27,03) (tabelas 8-11 e anexo 2).

Os genes da família IAP foram alterados principalmente em P01 e P03. Em P01 BIRC2, BIRC5 (Baculoviral IAP Repeat Containing 5) e BIRC8 são muito hiperexpressos e hiperexpressos respectivamente, enquanto BIRC3 e BIRC6 (Baculoviral IAP Repeat Containing 6) são hipoexpressos. Em P03, seis genes desta família mostraram-se desregulados, BIRC3 hipoexpresso e BIRC2, BIRC8 e XIAP (X-Linked Inhibitor Of Apoptosis) muito hipoexpressos. BIRC5 apresentou muito hiperexpresso e BIRC6 hiperexpresso. Enquanto no P02 (SRL+) apenas o BIRC8 mostrou-se muito hiperexpresso. Para P02 apenas um gene da família IAP apresentou desregulação, o BIRC3 que foi hiperexpresso (tabelas 8-11 e anexo 2).

As caspases apresentam um perfil de expressão normal em PO2 (SRL+). Em PO2 apenas CASP9 apresentou hiperexpressão. Em PO1 foi observada uma mudança na expressão gênica, CASP5 (Caspase 5) foi muito hipoexpresso, CASP7 muito hiperexpresso e CASP8 foi hipoexpresso. O PO3 mostrou-se mais alterado para as Caspases com CASP1 (Caspase 1), CASP2, CASP7, CASP9, CASP10 (Caspase 10) e CFLAR muito hiperexpressos e CASP3, CASP5, CASP8AP2 e CASP8 muito hipoexpressos e CASP4 (Caspase 4) hipoexpresso (tabelas 8-11 e anexo 2).

Quando analisamos genes relacionados à via do receptor de morte (TNFR), encontramos FAS e TRADD (TNFRSF1A Associated Via Death Domain) hiperexpressos em PO1, porém FASLG hipoexpresso e TNFRSF21 muito hipoexpresso. FASLG apresentou-se muito hipoexpresso em PO2 com ou sem a droga, entretanto TRADD mostrou-se desregulado (hiperexpresso) apenas em PO2 (SRL+). Semelhante ao PO1, o PO2 apresentou TNFRSF21 com expressão muito baixa. Dois outros genes foram muito hiperexpressos em PO2 são TNFRSF10A e TNFRSF10B. Quando observamos o perfil de PO3 para a via do receptor do receptor (TNFR), encontramos muitos genes alterados, sendo FAS, FASLG, LTB (Lymphotoxin Beta), TNF, TNFRSF1B (TNF Receptor Superfamily Member 1B), TNFSF10 e TRADD com expressão acima do normal. E LTA (Lymphotoxin Alpha), TNFRSF10B, TNFRSF1A e TNFRSF21 mostraram expressão abaixo do normal (tabelas 8-11 e anexo 2).

A família NLR apresentou desregulação em P01, P02 e P03, sendo NOD1 (Nucleotide Binding Oligomerization Domain Containing 1) e NOD2 (Nucleotide Binding Oligomerization Domain Containing 2) hiperexpressos e muito hiperexpressos respectivamente para P02 e NAIP (NLR Family Apoptosis Inhibitory Protein), NOD1 e NOD2 também em níveis elevados para P03. Em P01 o NLRP1 (NLR Family Pyrin Domain Containing 1) mostrou-se hipoexpresso e o NOD2 hiperexpresso (tabelas 8-11 e anexo 2).

Outros genes relacionados à apoptose, como BCAP31(B Cell Receptor Associated Protein 31), DAPK1 (Death Associated Protein Kinase 1), DEDD2 (Death Effector Domain Containing 2), DEDD (Death Effector Domain Containing), DIABLO, CRADD (CASP2 And RIPK1 Domain Containing Adaptor With Death Domain), HIP1 (Huntingtin Interacting Protein 1), HTRA2 (HtrA Serine Peptidase 2), IFT57 (Intraflagellar Transport 57), LRDD (P53-Induced Death Domain Protein 1), PEA15 (Proliferation And Apoptosis Adaptor Protein 15) e PMAIP1 (Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1) também foram avaliados. Encontramos desregulação em DAPK1 e IFT57 no paciente P02 (SRL+) e DAPK1, DIABLO e PMAIP1 no P02; DEDD e PMAIP1 para P01; BCAP31, DEDD, DEDD2, LRDD, RIPK1 (Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 1) e RIPK2 (Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 2) para P03 (tabelas 8-11 e anexo 2).

| P01 | | | | | |
|------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | Muito Hiperexpresso (≥2) | Hiperexpresso (1.5 and 1.99) | Expressão Normal (-1.49 a 1.49) | Hipoexpresso (-1.5 a -1.99) | Muito Hipoexpresso (≤-2) |
| CARD family | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 |
| Bcl-2 family | 5 | 2 | 9 | 1 | 1 |
| Caspases | 1 | 0 | 9 | 1 | 0 |
| NFkB signaling pathway | 0 | 0 | 12 | 2 | 0 |
| TNF and TNFR pathway | 0 | 2 | 10 | 1 | 1 |
| NLR family | 0 | 1 | 2 | 1 | 0 |
| IAP family | 2 | 1 | 1 | 2 | 0 |
| Outros | 0 | 1 | 12 | 1 | 0 |
| Total | 8 | 7 | 57 | 11 | 4 |

Tabela 8: Expressão gênica das via extrínseca e intrínseca da apoptose no paciente PO1 separado por famílias de genes.

| P02 (SRL+) | | | | | |
|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| | Muito Hiperexpresso (≥2) | Hiperexpresso (1.5 and 1.99) | Expressão Normal (-1.49 a 1.49) | Hipoexpresso (-1.5 a -1.99) | Muito Hipoexpresso (≤- 2) |
| CARD family | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 |
| Bcl-2 family | 1 | 4 | 12 | 0 | 1 |
| Caspases | 0 | 0 | 12 | 0 | 0 |
| NFkB signaling pathway | 0 | 0 | 14 | 0 | 0 |
| TNF and TNFR | 0 | 1 | 12 | 0 | 1 |
| pathway NLR family | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 |
| IAP family | 1 | 0 | 5 | 0 | 0 |
| Outros | 0 | 1 | 12 | 0 | 1 |
| Total | 2 | 6 | 76 | 0 | 3 |

Tabela 9: Expressão gênica das vias extrínseca e intrínseca da apoptose no paciente PO2 (SRL+) separado por famílias de genes.

| P02 | | | | | |
|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | Muito Hiperexpresso (≥2) | Hiperexpresso (1.5 and 1.99) | Expressão Normal (-1.49 a 1.49) | Hipoexpresso (-1.5 a -1.99) | Muito Hipoexpresso (≤-2) |
| CARD family | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 |
| Bcl-2 family | 0 | 4 | 13 | 0 | 1 |
| Caspases | 0 | 1 | 11 | 0 | 0 |
| NFkB signaling pathway | 2 | 1 | 10 | 0 | 1 |
| TNF and TNFR pathway | 0 | 2 | 10 | 0 | 2 |

| NLR family | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 |
|------------|---|----|----|---|---|
| IAP family | 0 | 1 | 5 | 0 | 0 |
| Outros | 0 | 0 | 11 | 2 | 1 |
| Total | 3 | 10 | 66 | 3 | 5 |

Tabela 10: Expressão gênica das vias extrínseca e intrínseca da apoptose no paciente PO2 separado por famílias de genes.

| P03 | | | | | |
|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | Muito Hiperexpresso (≥2) | Hiperexpresso (1.5 and 1.99) | Expressão Normal (-1.49 a 1.49) | Hipoexpresso (-1.5 a -1.99) | Muito Hipoexpresso (≤-2) |
| CARD family | 3 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Bcl-2 family | 6 | 3 | 7 | 0 | 2 |
| Caspases | 6 | 0 | 1 | 1 | 4 |
| NFkB signaling pathway | 6 | 2 | 5 | 0 | 1 |
| TNF and TNFR pathway | 5 | 2 | 3 | 1 | 3 |
| NLR family | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| IAP family | 1 | 1 | 0 | 1 | 3 |
| Outros | 0 | 4 | 8 | 0 | 2 |
| Total | 29 | 13 | 25 | 3 | 17 |

Tabela 11: Expressão gênica das vias extrínseca e intrínseca da apoptose no paciente PO3 separado por famílias de genes.

Dos 30 genes desregulados em P01, os genes BAD, BAK1, BCL2L11, BCL2L13, BCL2L14, BCL2L1, BIRC2, BIRC5, BIRC8, BNIP3L, CASP7, DEDD, FAS, NOD2 e TRADD mostraram expressão acima do normal. E os genes com expressão abaixo do normal foram: APAF1, BCL10, BCL2A1, BCL2, BIRC3, BIRC6, CARD6, CASP5, CASP8, FASLG, NFKBIZ, NLRP1, PMAIP1, RELA e TNFRSF21 (tabela 7 e anexo 2).

E dos 11 genes desregulados em PO2 (SRL +), os genes *BAK1, BCL2A1, BCL2A1, BCL3, BIRC8, BNIP3L, IFT57* e *TRADD* apresentaram expressão acima do normal. Enquanto, apenas *BOK, DAPK1* e *FASLG* apresentaram expressão abaixo do normal (tabela 7 e anexo 2).

Dos 21 genes desregulados no paciente P02, os genes *BAX, BCL2L11, BCL2L13, BIRC3, BNIP3L, CASP9, NFKB2, NFKBIZ, NOD1, NOD2, RELB, TNFRSF10A* e *TNFRSF10B* mostraram expressão acima do normal e os genes *BOK, CARD6, CHUK, DAPK1, DIABLO, FASLG, PMAIP1* e *TNFRSF21* estavam com expressão abaixo do normal (tabela 7 e anexo 2).

O paciente P03 apresentou grande quantidade de genes desregulados, totalizando 62 genes, sendo os genes APAF1, BAD, BAX, BBC3, BCAP31, BCL2L11, BCL2L13, BCL2L14, BCL3, BID, BIRC5, BIRC6, BNIP3L, CARD9, CASP10, CASP1, CASP2, CASP7, CASP9, CFLAR, DEDD2, DEDD, FAS, FASLG, IKBKG, LRDD, LTB, NAIP, NFKB1, NFKB2, NFKBIA, NFKBIE, NOD1, NOD2, PYCARD, RELA, RELB, REL, TNF, TNFRSF1B, TNFSF10 e TRADD com expressão acima do normal e os genes BAK1, BCL10, BIRC2, BIRC3, BIRC8, BNIP3, CARD6, CASP3, CASP4, CASP5, CASP8AP2, CASP8, CHUK, LTA, RIPK1, RIPK2, TNFRSF10B, TNFRSF1A, TNFRSF21 e XIAP com expressão abaixo do normal (tabela 7 e anexo 2).

Apenas os genes BCL2L2 (BCL2 Like 2), BIK (BCL2 Interacting Killer), CASP6, CRADD, FADD, HIP1, HTRA2, IFT57, IKBKB, IKBKE (Inhibitor Of Nuclear Factor Kappa B Kinase Subunit Epsilon), MCL1 (MCL1 apoptosis regulator, BCL2 family member), NFKBIB (NFKB Inhibitor Beta), PEA15, TBK1 (TANK Binding Kinase 1) e TNFRSF25 apresentaram expressão normal em todos os pacientes (anexo 2).

Apenas dois genes foram igualmente desregulados nos três pacientes sem SRL *BCL2L11* e *TNFRSF21* (anexo 2).

Nenhum gene foi igualmente desregulado quando comparamos o paciente P02 (SRL +) com P01 e P03 (anexo 2).

Avaliamos também quanto a concordância e discordância da expressão dos genes e verificamos que em PO2 (SRL +) e PO2, encontramos o maior índice de genes concordantes (63 genes - 71,6%), todos esses genes concordantes apresentaram expressão normal exceto *BNIP3L* (hiperexpresso), *BOK* (muito hipoexpresso), *DAPK1* (muito hipoexpresso), *FASLG* (muito hipoexpresso) (figura 12 e anexo 2).

Quando avaliamos a expressão gênica nos três pacientes sem interferência da droga, encontramos discrepância na expressão de 71 genes (80,7%). Dos 17 genes (19,3%) concordantes, 15 apresentaram expressão normal, podendo-se concluir que esses genes não são afetados pela mutação no *TNFRSF13B*. Apenas *BCL2L11* e *TNFRSF21* apresentaram perfil de expressão alterado igualmente entre os três indivíduos, sendo hiperexpresso e muito hipoexpresso, respectivamente (figura 12 e anexo 2).

O índice de concordância entre PO1 e PO2 foi de 55,7%, equivalente a 49 genes, sendo também maior prevalência de perfil normal (figura 12), exceto *BCL2L11* (hiperexpresso), *TNFRSF21* (muito hipoexpresso) e *PMAIP1* (hipoexpresso) (figura 12 e anexo 2).

Comparando dois pacientes com fenótipos muito diferentes, PO2 fenótipo grave e PO3 fenótipo leve, há discordância de expressão gênica em 72,7% (64 genes) (figura 12). Apenas 24 genes foram concordantes entre eles, porém somente 4 genes apresentaram perfil igualmente alterado, BCL2L11 (hiperexpresso), CHUK (muito hipoexpresso), NOD2 (muito hiperexpresso) e TNFRSF21 (muito hipoexpresso) (anexo 2).

A comparação entre P01 (fenótipo moderado) e P03 (fenótipo leve) mostrou um índice de discordância menor, 65,9% (58 genes) (figura 12). Dos 30 genes (34,1%) concordantes na comparação de P01 e P03, 11 não apresentaram perfil de expressão normal. São eles: *BCL2L11* (hiperexpresso), *BCL2L13* (muito hiperexpresso), *BCL2L14* (muito hiperexpresso), *BIRC3* (hipoexpresso), *BIRC5* (muito hiperexpresso), *BNIP3L* (muito hiperexpresso), *CASP5* (muito hipoexpresso), *CASP7* (muito hiperexpresso), *DEDD* (hiperexpresso) e *TNFRSF21* (muito hipoexpresso) (anexo 2).

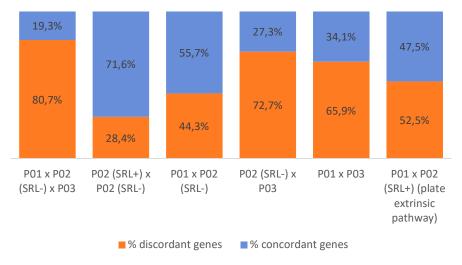


Figura 12: Avaliação da concordância e discordância na expressão gênica entre os pacientes no *array* da via intrínseca e extrínseca da apoptose.

Quando os genes foram agrupados de acordo com sua função e estrutura, encontramos maior concordância entre os genes da via de sinalização NFkB (29%) e outros genes (36%) em P01 x P02 x P03 (figura 13A).

Porém, em PO2 x PO2 (SRL+) a maior concordância ocorreu na família das caspases (92%), seguida da família CARD (80%) (figura 13B).

Entre os pacientes com perfil moderado (P01) e grave (P02) o maior índice de discordância ocorreu na família IAP (83%) e NRL (75%). E maior concordância no grupo outros genes, com 79% (figura 13C).

Na comparação dos pacientes com fenótipos extremos, PO2 (grave) e PO3 (leve) verificamos 100% de discordância na expressão dos genes das famílias CARD e IAP, além da família das Caspases que também mostraram índices elevados de discordância (92%) (figura 13D).

Paciente com perfil moderado (P01) comparado com o de perfil leve (P03) mostraram altos índices de discordância na família de genes NLR (100%), CARD (80%) e Caspases (75%) (figura 13E).

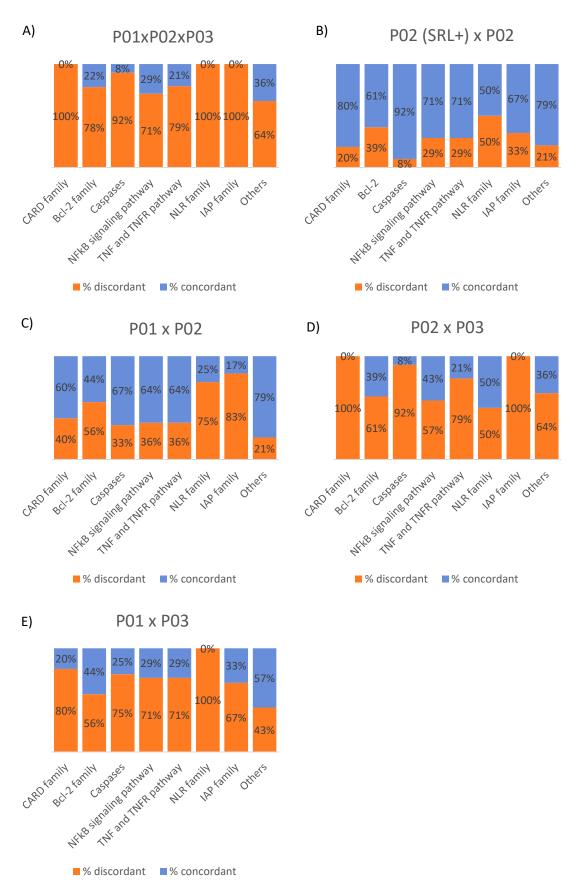


Figura 13: Resultados dos índices de concordância e discordância da expressão gênica entre os pacientes avaliados por famílias de genes no *array* da via intrínseca e extrínseca da apoptose. A) P01 x P02 x P03. B) P02 (SRL+) x P02. C) P01 x P02. D) P02 x P03. E) P01 x P03.

4.6. EXPRESSÃO GÊNICA ÚNICA (SINGLE GENE EXPRESSION)

Selecionamos alguns genes com expressão alterada no array para analisarmos a sua expressão individualmente.

A Figura 14 mostra os resultados das expressões relativas de *APAF1, CASP2, FAS, FASLG, IL10, IL10RA, BCL2, BCL2L1*(L), *BCL2L14*(S), *BIRC8, BOK, TNFRSF21, TNFRSF13B* e *TP53*, para os pacientes P01, P02 (SRL+), P02 e P03 comparados com grupo controle. Hipoexpressão foi definido quando os valores estavam abaixo de 50% dos valores do grupo controle. E hiperexpressão quando os valores estavam acima de 50% dos valores do grupo de controle. Além disso, diferenças significativas entre os pacientes e o controle também foram consideradas hiperexpressos ou hipoexpressos. Para a análise de quantificação relativa do mRNA, os dados do paciente foram comparados aos grupos controle (n = 5). Usamos a combinação de *GAPDH* e *HPRT1* como gene de referência.

P01 apresentou hiperexpressão dos genes próapoptóticos *BCL2L14*, e *BOK* e o gene antiapoptóticos *BCL2L1* e *BIRC8*; os genes próapoptóticos hipoexpressos foram TP53, *TNFRSF21* e o gene antiapoptótico *BCL2* além de *TNFRSF13B* (gene próapoptótico e antiapoptótico). Estes resultados foram condizentes com o ensaio de array para os seguintes genes: *BCL2L14*, *BCL2L1*, *BIRC8*, *TNFRSF21* e *BCL2* (figura 14 e anexos 1 e 2).

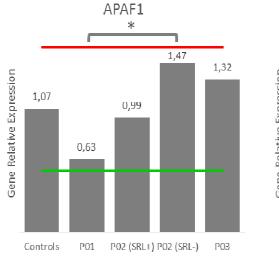
P02 (SRL+) mostrou hiperexpressão em *TP53* (próapoptótico), *BCL2L1* (antiapoptótico) e BIRC8 (anti apoptótico); e hipoexpressão dos genes próapoptóticos *FASLG*, *BOK* e *TNFRSF21*. Estes resultados foram condizentes com o ensaio de array para os seguintes genes: *BCL2L1*, *BIRC8*, *FASLG* e *BOK* (figura 14 e anexos 1 e 2).

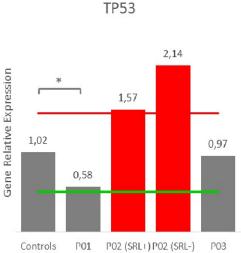
P02 apresentou hiperexpressão de *TP53* (próapoptótica), *IL10* (pró-apoptótica), *BCL2L1* (antiapoptótica) e *BIRC8* (antiapoptótica); além de hipoexpressão dos genes próapoptóticos *IL10RA* e *BOK*. Apenas o gene *BOK* apresentou expressão no ensaio de array, entretanto não foram testados no array os genes *TP53*, *IL10* e *IL10RA* (figura 14 e anexo 2).

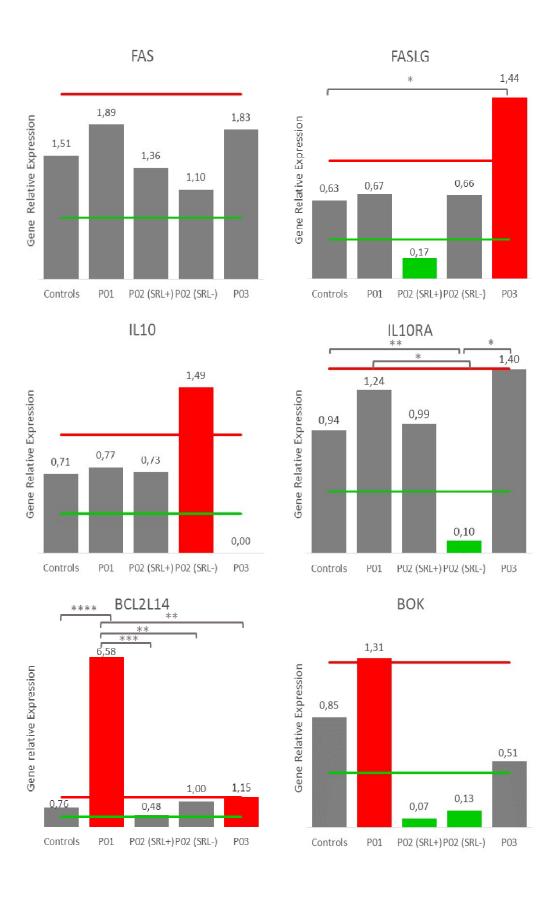
E paciente P03, observamos hiperexpressão nos seguintes genes próapoptóticos, *FASLG* e *BCL2L14*; e foi observado que o gene *IL10* próapoptótico estava hipoexpresso (figura 14). Ambos os genes, *FASLG* e *BCL2L14* também analisados por array mostraram o mesmo resultado (figura 14 e anexo 2).

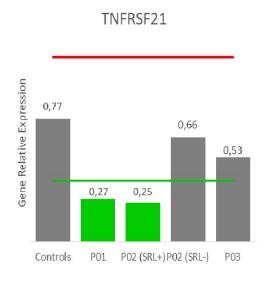
Embora todos os pacientes em nosso estudo tivessem uma mutação *TNFRSF13B*, curiosamente apenas em P01, que apresenta o fenótipo moderado, mostrou a expressão deste gene hipoexpresso (figura 14).

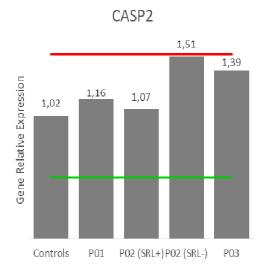
Genes próapoptóticos



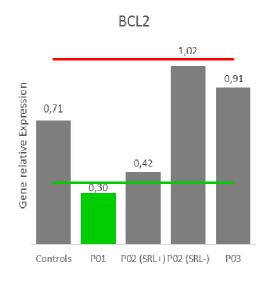


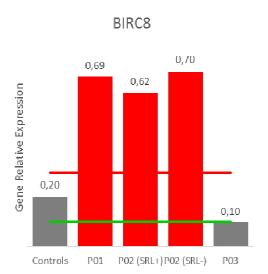


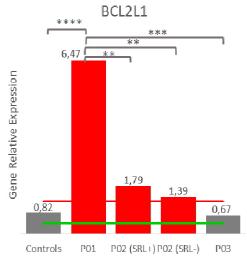




Genes antiapoptóticos







Gene próapoptótico e antiapoptótico

TNFRSF13B

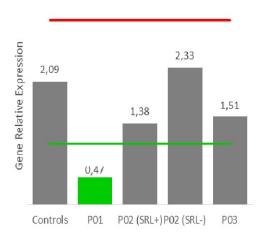
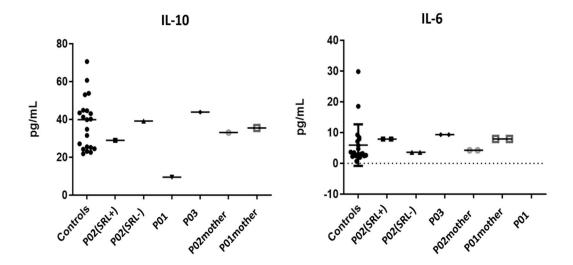


Figura 14: Expressão relativa dos genes *APAF1, TP53, FAS, FASLG, IL10, IL10RA, BCL2, BCL2L1, BCL2L14, BIRC8, BOK, TNFRSF21, CASP2* e *TNFRSF13B.* A cor vermelha representa genes hiperexpressos, a cor cinza representa genes com expressão normal e a cor verde representa hipoexpressão. As linhas vermelha e verde são os pontos de corte para hiperexpressão e hipoexpressão respectivamente. * P<0,05; ** P<0,01; ***P<0,001; ****P<0.0001.

4.7. DOSAGEM DE CITOCINAS

A Figura 15 mostra os dados dos níveis plasmáticos de citocinas em pacientes com mutação no gene *TNFRSF13B* e seu respectivo grupo controle.

Das 6 citocinas analisadas (IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 e TGF- β) apenas 3 delas detectaram diferenças significativas, IL-8, IL-2 e IL-5. Observamos que o P01 apresentou baixa dosagem de IL-8, o que diferiu significativamente dos controles (P=0,0079) e da mãe (P01 Mother) (P=0,0282). Níveis inferiores ao esperado também ocorreram com P02 na dosagem de IL-2, que diferiu significativamente do grupo controle (P=0,0167), de P03 (P=0,0235), além da própria mãe (P02 Mother) (P=0,0235). Por fim, IL-5, em que P01 apresentou resultados bem abaixo do grupo controle (P=0,0124) (figura 15).



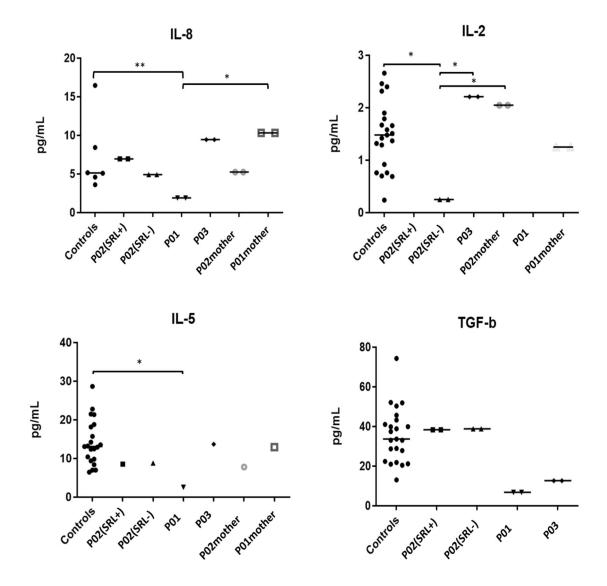


Figura 15: Níveis de citocinas plasmáticas nos pacientes e em suas mães com mutação no gene *TNFRSF13B*. Dados são apresentados como mediana. Valores limite de detecção em pg/mL: IL-2, 0.19; IL-5, 0.12; IL-6, 0.11; IL-8, 0.13; IL-10, 0.56; TGF-beta, 31. Ø: não detectado ou abaixo do limite de detecção. * P<0.05; ** P<0.01; ***P<0.001.

5. DISCUSSÃO

Nos erros inatos da imunidade, além da etiologia monogênica fenômenos genéticos como epigenética, epistasia, tipos de mutação, ganhos ou perdas de função, haploinsuficiência, mosaicismo, mutações somáticas, mutações de novo e outros interferem no fenótipo da doença. As três famílias estudadas possuem seis indivíduos com a mesma variante em *TNFRS13B* mas com expressão clínica heterogênea.

A haploinsuficiência ocorre quando a quantidade reduzida do gene "normal" não é suficiente para produzir um fenótipo normal. Assim, indivíduos com o mesmo genótipo podem ter desde formas mais leves até graves. Esse fenômeno é conhecido como expressão variável. Além disso, quando portadores do gene mutado não expressam o fenótipo da doença (assintomáticos), determina-se a penetrância incompleta ⁴⁴, fenômeno que constata ou não a presença da doença, independente da expressividade dela.

É plausível que a interação entre esses fatores explique melhor porque uma mutação idêntica pode resultar em diferentes condições clínicas que trazem grande complexidade a esse fenômeno. Mesmo com o enorme progresso na compreensão da genética dos EIIH, várias

questões permanecem desconhecidas ⁴⁵. Entretanto, os mecanismos pelos quais essas mutações no estado heterozigoto afetam a função do TACI não são conhecidos ²⁹.

Estudos anteriores propuseram duas opções para explicar o efeito deletério da mutação heterozigótica p.C104R na função dos linfócitos B. Um refere-se a haploinsuficiência porque uma cópia normal do TACI pode não ser suficiente para o funcionamento adequado ³, conforme já foi sugerido por Lee JJ; *et al.* 2010 em seu estudo ²⁹. No entanto, von Bulow, GU; *et al.* 2001, mostraram que camundongos com uma única cópia do gene TACI têm um fenótipo normal ⁴⁶, argumentando fortemente que a haploinsuficiência de TACI pode não causar disfunção de linfócitos B ⁴⁵. Alternativamente, o mutante p.C104R pode atuar como um dominante negativo e interferir na função do alelo normal ⁴⁵, sugerindo um padrão de herança autossômica dominante ³².

A haploinsuficiência com expressividade variável explica como os pacientes P01, P02 e P03, apesar de apresentarem o mesmo genótipo, possuem fenótipos bem diferentes, sendo P01 fenótipo moderado, P02 grave e P03 leve. Entretanto, as mães assintomáticas podem ser justificadas pela penetrância incompleta, onde apresentam o mesmo genótipo dos filhos, entretanto com fenótipos normais, independentemente se a herança é autossômica recessiva ou dominante.

Já foi descrito que a mutação p.C104R no gene *TNFRSF13B* é considerada haploinsuficiente ²⁹, com penetrância incompleta e expressão variável ³².

TACI regula a função de BCR (Breakpoint Cluster Region), TLR7 (Toll Like Receptor 7) e TLR9 (Toll Like Receptor 9). Estes podem estar envolvidos no reconhecimento de autoantígenos e tolerância central de linfócitos B. Portanto, as mutações do gene TNFRSF13B prejudicam a tolerância central de linfócitos B, resultando em uma incapacidade de remover linfócitos B autorreativos por meio de mecanismos de tolerância central. Adicionalmente, pacientes com ICV, apresentam anormalidades nos mecanismos de tolerância periférica. Nos pacientes com ICV que carregam mutações alélicas no gene TNFRSF13B, a tolerância periférica é incapaz de compensar os defeitos na tolerância central, facilitando assim o caminho para o desenvolvimento de doenças autoimunes nesses indivíduos ²⁵. Alterações homozigóticas nos alelos TACI resultam em uma perda completa da função TACI e na incapacidade de manter a produção contínua de anticorpos autorreativos. Em contraste, as mutações heterozigotas em alelos TACI prejudicam apenas a função TACI. Mas, a função TACI não é completamente perdida e é suficiente para manter a produção contínua de anticorpos autorreativos. Portanto, os pacientes com ICV que são heterozigotos para mutações em TACI são propensos a doenças autoimunes, enquanto os homozigotos parecem experimentar um efeito preventivo autoimune da doença ²⁵.

Autoimunidade e linfoproliferação são as principais manifestações clínicas dos pacientes com mutações em *TNFRSF13B*, o gene que codifica TACI (CD267), que funciona como um receptor específico linfocitário. Dessa forma, avaliamos a expressão da proteína TACI nos pacientes e suas respectivas mães assintomáticas. A expressão de TACI é regulada por uma variedade de fatores e exibe constantemente mudanças dinâmicas ²⁵. Compreender os efeitos mutacionais de TACI nos pacientes pode nos fornecer importantes dados sobre a expressividade variável nesses pacientes.

A expressão de TACI na membrana celular pode inclusive estar relacionada à idade. Schatorjé et. al., descobriram que em adolescentes, a porcentagem de linfócitos B TACI+ está correlacionada positivamente com a idade ^{25; 47}. E Zhang, Y. et al.; 2015 afirmaram que a expressão de TACI aumenta com a idade antes da idade adulta ²⁵. Portanto, nossos dados são condizentes com a literatura, pois as amostras dos pacientes foram analisadas entre 15 e 20 anos, ou seja, ainda adolescentes, momento em que há aumento na expressão de TACI. Enquanto as mães, já na fase adulta, mostraram expressão de CD267 menor que dos pacientes.

A expressão proteica de TACI ainda mais elevada em PO2 (figura 6), pode estar relacionada com o uso de SRL por 18 meses, e após dois meses de interrupção do SRL, foi

realizado o ensaio de expressão proteica. A variabilidade na expressão de TACI na membrana celular revela a haploinsuficiência deste gene.

Estudos com células 293T transfectadas demonstraram que a variante p.C104R é expressa normalmente na membrana celular. Portanto, ela não interfere na expressão de TACI de tipo selvagem (WT) e nem com sua capacidade de se ligar ao ligante. Mais uma vez, esses resultados sugerem fortemente que a função de TACI em heterozigotos p.C104R humanos é prejudicada por meio de haploinsuficiência ²⁹.

Valores em porcentagem dos subtipos de linfócitos B em PO2 se encontravam acima dos observados nos demais pacientes como também a porcentagem de CD19+CD27+CD267+ que mostrou diferença significativa entre PO2 e PO3 (p=0,0337). Lembrando que o fenótipo de linfoproliferação é intenso em PO2 e ausente em PO3. Mais significativa foi a diferença entre PO2 e sua mãe (p=0,0096) assintomática. Estes dados fornecem suporte para explicar a persistente linfoproliferação nos linfonodos cervicais, constatadas em PO2.

Alguns autores afirmam que o aumento de apoptose em linfócitos B e T podem implicar em linfopenia, elevação no número de linfócitos B imaturos na circulação, redução do número de linfócitos B maduros circulantes e diminuição na produção de imunoglobulinas nos pacientes com ICV ^{9; 48; 49}. Outros estudos sugerem que o aumento da apoptose é limitado à subgrupos especiais de linfócitos B em pacientes com ICV e sIgAD ⁹. Possivelmente, se tivéssemos isolado os linfócitos B ao invés de utilizar PBMC (figura 8) teríamos obtido mais evidências de alterações nos ensaios de apoptose.

Retornando ao nosso objetivo principal de investigar as relações das manifestações de autoimunidade e linfoproliferação com expressão de TACI (CD267+) nos pacientes e suas mães assintomáticas, uma proteína com funções antagônicas, sobrevida e morte de linfócitos B, sinalizadas pelo mesmo receptor, contribuiu para reforçar a importância de se investigar o comportamento de expressão gênica das vias intrínseca e extrínseca da apoptose na regulação da resposta imune nesses pacientes.

Com base em nossos resultados, além do cenário monogênico da variante *TNFRSF13B*, a contribuição das vias de apoptose parece bastante óbvia como um modelo de explicação da expressividade clínica variável da doença. O sequenciamento completo do exoma mostrou que todos os genes avaliados na via de apoptose intrínseca e extrínseca não apresentavam mutação, mas os ensaios de estudo da sua expressão evidenciaram um profundo comprometimento.

A perturbação da via de sinalização de apoptose identificada em nossos pacientes, sugere claramente uma correlação com a expressividade variável clínica dos pacientes, fortalecendo os relatos anteriores de pacientes com ICV associados a *TNFRSF13B* e outras IDPs (Imunodeficiência Primária) ou EIIH ^{32;50}. Estudos anteriores relataram a análise da expressão de alguns genes que medeiam a apoptose em ICV e sIgAD, entretanto, nenhum estudo analisou especificamente na mutação de *TNFRSF13B*. Além disso, não englobou tantos genes envolvidos com sinalização de apoptose. Saxon *et al.*, 1995 e Iglesisas *et al.*, 1999 encontraram que a expressão de *FAS* em linfócitos B e T de indivíduos com ICV estava aumentada ^{51;52}. Di Renzo *et al.*, 2001 avaliaram e expressão de TNFRS em linfócitos T CD4+ ⁵³. Clemente *et al.*, 2013 verificaram a expressão de TNFSF10 em linfócitos B de memória ⁵⁴.

Nosso estudo, em três probandos não relacionados, mostra a mutação *TNFRSF13B* como única causa conhecida para as diferentes intensidades de perturbação da via de sinalização de apoptose, com repercussões singulares na evolução clínica. Especulamos que, a desregulação na expressão gênica observada nos nossos pacientes seja um mecanismo compensatório positivo do organismo, na tentativa de controlar a doença. Assim, quanto maior for a desregulação na expressão dos genes das vias da apoptose, maior será a capacidade do organismo de controlar as manifestações e consequentemente será menos sintomático.

Verificamos que o P03, com um fenótipo mais leve, mostrou um perfil mais desregulado da expressão gênica (71,1% genes desregulados). Ao contrário, P02 com fenótipo mais grave da doença apresentou menos genes desregulados (32,6% genes desregulados) e P01 com fenótipo moderado, mostrou 34,4% dos genes desregulados (tabela 7). A placa de *array* da via extrínseca

também confirma esta hipótese, com 39% dos genes desregulados em PO1, e apenas 29% em PO2 (tabela 4).

O resultado da análise comparativa da expressão gênica entre os três pacientes mostrou uma concordância de 17 genes (19,3%) (figura 12), sendo que 15 genes, *BCL2L2*, *BIK*, *CASP6*, *CRADD*, *FADD*, *HIP1*, *HTRA2*, *IFT57*, *IKBKB*, *IKBKE*, *MCL1*, *NFKBIB*, *PEA15*, *TBK1* e *TNFRSF25* apresentaram expressão normal, indicando que estes genes, provavelmente, não são influenciados pela mutação em TACI. Apenas dois genes *BCL2L11* (hiperexpresso) e *TNFRSF21* (muito hipoexpresso) foram igualmente desregulados nos três pacientes, independentemente do fenótipo. Entretanto, o SRL parece intervir na expressão destes genes, pois nenhum gene foi igualmente desregulado, quando comparamos P02 SRL+ com P01 e P03, notando-se todos os genes concordantes com expressão normal (anexo 2). No entanto, se avaliarmos a concordância dos genes acima da expressão normal, independente se é hiperexpresso ou muito hiperexpresso, temos nos 3 pacientes os genes *BCL2L11*, *BCL2L13*, *BNIP3L* e *NOD2*. E ao analisarmos a concordância dos genes abaixo da expressão normal, independente se é hipoexpresso ou muito hipoexpresso, temos *CARD6* e *TNFRSF21*.

A análise comparativa de P02 (SRL+) e P02, revelou que o SRL exerce um papel relevante nas vias da apoptose. P02 (SRL+) mostrou redução de 50% no número de genes desregulados (12,6%) em relação a P02 (24%) (tabela 7), havendo apenas 4 genes *BNIP3L* (hiperexpresso), *BOK* (muito hipoexpresso), *DAPK1* (muito hipoexpresso) e *FASLG* (muito hipoexpresso), igualmente desregulados (anexo 2).

Contudo, a comparação de P01 com P03 mostrou 58 genes (65,9%) em discordância (figura 12), e 11 genes, *BCL2L11 e DEDD* (hiperexpresso), *BCL2L13*, *BCL2L14 BIRC5*, *BNIP3L* (muito hiperexpresso), *BIRC3* (hipoexpresso), *CARD6*, *CASP5*, *CASP7 e TNFRSF21* (muito hipoexpresso), concordantes e desregulados. No entanto, se avaliarmos a concordância dos genes acima da expressão normal, independente se é hiperexpresso ou muito hiperexpresso, adicionamos os genes *BAD*, *FAS*, *NOD2* e *TRADD*. E os genes em concordância considerados abaixo da expressão normal para P01 e P03, adicionamos *BCL10* e *CASP8* (anexo 2).

A mutação em *TNFRSF13B* no P03 (fenótipo leve) mostrou mais desregulação na família BCL2, Caspases e TNF and TNFR, todas com 11 genes desregulados (tabela 11). No paciente com fenótipo moderado (P01), verificamos também mais desregulação na família BCL2, com 9 genes desregulados (tabela 8). O paciente com fenótipo grave (P02), mostrou maior desregulação na família BCL2, com 5 genes desregulados (tabela 10). Portanto, independente da expressividade clínica da doença, os genes da família BCL2 são os mais alterados nesta doença.

Em relação ao número dos genes próapoptóticos com expressão elevada, PO1 apresentou dez genes (BAD, BAK1, BCL2L11, BCL2L13, BCL2L14, BNIP3L, CASP7, DEDD, FAS e TRADD), PO2 oito genes (BAX, BCL2L11, BCL2L13, BNIP3L, CASP9, NOD1, TNFRSF10A e TNFRSF10B) e PO3, 26 genes (APAF1, BAD, BAX, BCAP31, BCL2L11, BCL2L13, BCL2L14, BID, BNIP3L, CARD9, CASP10, CASP1, CASP2, CASP7, CASP9, CFLAR, DEDD2, DEDD, FAS, FASLG, LRDD, NOD1, PYCARD, TNF, TNFSF10 e TRADD). Foram identificados nove genes (APAF1, BCL10, CARD6, CASP5, CASP8, FASLG, NLRP1, PMAIP1 e TNFRSF21) próapoptóticos com baixa expressão em PO1, seis genes (BOK, CARD6, DAPK1, DIABLO, FASLG, PMAIP1 e TNFRSF21) em PO2, e 12 (BAK1, BCL10, BNIP3, CARD6, CASP3, CASP4, CASP5, CASP8AP2, CASP8, TNFRSF10B, TNFRSF1A e TNFRSF21) em PO3. Ao contrário, quatro genes antiapoptóticos (BCL2L1, BIRC2, BIRC5 e BIRC8) com elevada expressão foram identificados no PO1, apenas um gene (BIRC3) em PO2, e 11 genes (BBC3, BCL3, BIRC5, BIRC6, CFLAR, LRDD, NAIP, RELA, RELB, REL e TNFRSF1B) em PO3. Genes antiapoptóticos com baixa expressão também foram identificados, sendo cinco (BCL2A1, BCL2, BIRC3, BIRC6 e RELA) em PO1, apenas um (CHUK) em PO2 e sete (BIRC2, BIRC3, BIRC8, CHUK, RIPK1, RIPK2 e XIAP) em PO3 (anexo 2).

Di renzo *et al.*, 2001 investigaram a expressão de *TNFRSF1B* em linfócitos T de pacientes com ICV, e descobriram que os linfócitos T têm expressão significativamente mais alta de *TNFRSF1B* do que o grupo controle, entretanto não foi significativamente diferente da expressão de *FAS* ⁵³, bem como encontramos em P03, com *FAS* e *TNFRSF1B* elevados. Com estes achados,

os autores concluíram que o aumento da expressão de TNF-Rs pode estar relacionado com o aumento da apoptose espontânea na via Fas-FasL em alguns pacientes com ICV ⁵³.

No desequilíbrio da expressão gênica predominou a hiperexpressão de genes próapoptóticos, reforçando que a mutação p.C104R no gene *TNFRSF13B* exerce forte impacto na regulação das vias de apoptose, no sentido de reconstruir uma homeostasia entre sobrevida e morte celular nos linfócitos T e B.

É relevante destacar, que o maior número de genes próapoptóticos e antiapoptóticos desregulados concentraram-se no P03, cuja história se iniciou aos 14 anos por um achado de plaquetopenia moderada (52.000/mm³) no hemograma, deficiência seletiva de IgA e 5 anos após, surgiu deficiência de IgG, mantendo-se sempre assintomático. Mas ao contrário de P03, P02 com início dos sintomas aos 9 anos, tem um fenótipo mais grave de linfoproliferação resistente ao MMF, melhora com SRL e recidiva com a sua interrupção. A plaquetopenia grave (16.000/mm³) e a hipogamaglobulinemia foram responsivas ao tratamento com MMF e reposição de IgG humana por via IV, a cada 21-28 dias, respectivamente, e os ensaios de expressão gênica revelou um número menor de genes próapoptóticos e antiapoptóticos desregulados.

Outro destaque é a elevada expressão dos genes *BCL2L11*, *BCL2L13*, *BNIP3L* e *NOD2* e baixa expressão de *CARD6* e *TNFRSF21* nos três pacientes sem SRL, indicando que independente da intensidade das manifestações clínicas, esses genes podem ser considerados biomarcadores da variante p.C104R *TNFRSF13B*. Exceto para *NOD2*, as proteínas codificadas pelos demais genes estão envolvidas na regulação do processo apoptótico (*BCL2L11*, *BCL2L13*, *BNIP3L*), possivelmente através de uma via mediada por caspase e têm como alvo direto as mitocôndrias. Os genes *CARD6* e *TNFRSF21* também promovem regulação do processo de apoptose, pelas vias que envolve a ativação de NFKB e a via mediada por BAX com liberação de citocromo c da mitocôndria para o citoplasma (anexo 2).

Quando excluímos PO2 da comparação e incluímos PO2 (SRL+), os genes próapoptóticos BNIP3L e TRADD se apresentaram com elevada expressão nos três pacientes. Além de atuarem na regulação da apoptose, estes genes codificam proteínas que degradam proteínas alteradas na mitocôndria (BNIP3L) e ativa NF-kappa-B (TRADD). Contudo PO2 SRL+ apresenta concordância com PO1 na elevada expressão dos genes BAK1, com papel no processo de apoptose mitocondrial, e dos genes antiapoptóticos BCL2L1, potente inibidor da morte celular e BIRC8, inibidor da apoptose mediada por BAX. No PO3, a concordância de PO2 (SRL+) é com a elevada expressão de BCL3, que regula a ativação transcricional dos genes alvo NF-kappa-B. Desse modo o tratamento com SRL levou o PO2 a ter expressão de alguns genes similar aos PO1 e PO3. Nos chama a atenção a maior concordância entre PO1 e PO3 na baixa expressão dos genes próapoptóticos BCL10, CASP5 e CASP8 enquanto entre PO1 e PO2 a concordância está na baixa expressão dos genes próapoptóticos, FASLG e PMAIP1 (anexo 2).

Analisamos também, individualmente, alguns genes, os quais separamos segundo sua atividade na via de sinalização da apoptose. Os genes próapoptóticos foram: *APAF1, TP53, FAS, FASLG, IL10, IL10RA, BCL2L14, BOK, TNFRSF21* e *CASP2*. Os genes antiapoptóticos foram: *BCL2, BIRC8* e *BCL2L1*. O *TNFRSF13B* é considerado pró e antiapoptótico (figura 14).

O STE mostrou que todos os genes avaliados individualmente não apresentavam mutação, entretanto os ensaios evidenciaram alterações na expressão da maioria deles. Os genes próapoptóticos *APAF1*, *FAS* e *CASP2* apresentaram expressão normal em todos os indivíduos, apesar de mostrarem-se alterados no ensaio de *array* (*APAF1*-hipoexpresso para P01; *FAS* e *CASP2*-muito hiperexpresso P03). Essa diferença pode ter ocorrido devido a diferença entre as técnicas utilizadas ou a forma de cálculo de cut-off.

Apaf-1 é uma molécula chave na via intrínseca da apoptose. Após a ligação do citocromo C e dATP, atua na ativação da caspase 9, quando ativada estimula a cascata de caspase subsequente que leva a célula à apoptose ⁵⁵. A hipoexpressão de *APAF1* reduz a apoptose celular podendo levar a linfoproliferação, enquanto que a hiperexpressão pode aumentar o número de células em apoptose. Apesar de a análise individual do gene nos mostrar todos os indivíduos

com expressão normal, é possível verificarmos que, concordantemente com o *array* (anexo 1 e 2), a expressão de *APAF1* em P01 é mais baixa do que nos demais, porém em P03 é alta (figura 14). Era esperado que P02 apresentasse baixa expressão de APAF1 também, entretando, não foi o encontrado. Provavelmente o SRL, utilizado durante 18 meses provocou aumento na expressão deste gene.

A caspase-2 demonstra funções pró-apoptóticas e supressoras de tumor e desempenha um papel essencial na manutenção do ciclo celular ao induzir resposta ao estresse genotóxico, ativando ou inativando proteínas necessárias para apoptose ou sobrevivência celular. Esta enzima é capaz de desencadear a cascata da caspase por meio da clivagem de Bid, seguida da permeabilização da membrana mitocondrial e formação do apoptossomo. Apesar da análise individual do gene mostrar expressão normal em todos os indivíduos, P03, o qual apresentou hiperexpressão no *array*, também apresentou junto com P02 expressão mais alta, ambos próximos do limite superior da normalidade. Estes dados evidenciam, mais uma vez desregulação da via intrínseca como mecanismo compensatório desta mutação ⁵⁶ (figura 14).

O Fas é um receptor de morte (DR, *Death Receptor*) próapoptótico da via extrínseca, localizado na membrana celular. Desempenha um papel central na regulação da apoptose e está implicado na patogênese de várias doenças malignas do sistema imunológico. A interação de Fas com seu ligante FasL regula vários processos fisiológicos e patológicos que são mediados pela apoptose. O envolvimento Fas com o ligante FasL induz o recrutamento e a ativação das proteases que iniciam a apoptose, como a caspase-8 e a caspase-10. A deficiência desta via de sinalização em humanos é frequentemente manifestada pela anemia hemolítica autoimune, trombocitopenia ou leucocitopenia, causada pela produção de autoanticorpos. Assim, as interações FasL/Fas desempenham um papel crítico na regulação da produção de autoanticorpos patogênicos⁵⁷. Defeitos na apoptose mediada por Fas pode levar à oncogênese, bem como à resistência aos medicamentos em tumores existentes. Aumentos na sinalização mediada por Fas foram implicados na patologia de síndromes mielodisplásicas (SMD) de baixo risco ⁵⁸ e glioblastoma ⁵⁹.

Vários estudos, de pacientes com ICV, têm relatado um aumento na expressão de *FAS* em linfócitos B e T ^{9; 51; 52}. Em nosso estudo, o gene *FAS* em P03 mostrou-se hiperexpresso no *array*. Contudo, a análise individual da expressão do FAS foi normal em todos os pacientes. Atribuimos essa discrepância de resultados entre array e single gene expression, às diferenças entre as técnicas utilizadas, ao modo de calcular o cutoff, e ao fato de termos utilizado PBMC ao invés de linfócitos B e T separadamente.

Iglesias *et al.*, 1999 demonstraram expressão elevada de *FAS* em linfócitos T de paciente com ICV e linfopenia de T, enquanto que a expressão de *FAS* foi normal em pacientes ICV sem linfopenia de T, sugerindo que o aumento da expressão pode ter um papel importante na linfopenia de T ⁹. Em outros estudos demonstrou-se que há uma correlação inversa entre aumento da expressão de *FAS* e a contagem absoluta de linfócitos em paciente com ICV ^{9; 52}. Como em nosso estudo todos apresentaram expressão normal, não foi possível observarmos esta correlação. Em relação ao FASL em PO2, observamos que o SRL parece agir reduzindo a sua expressão e como consequência temos linfoproliferação. Ao contrário, em PO3, a hiperexpressão de *FASLG* (*p*=0,0354) indica maior efeito protetor da linfoproliferação e oncogênese (figura 14). Outro gene próapoptótico que se mostrou hipoexpresso com a ação do SRL (PO2 (SRL+)) e também em PO1 é o *TNFRSF21* (figura 14). É um DR, o qual promove a apoptose, possivelmente por meio de uma via que envolve a ativação de NF-kappa-B. *TNFRSF21* induz apoptose quando é hiperexpresso, portanto nossos achados são condizentes com a clínica de linfoproliferação observada em PO1 e o SRL mostrou-se ineficiente na contenção da linfoproliferação em PO2 (SRL+).

A proteína BOK, representa um membro próapoptótico da família BCL2. Regula positivamente o processo apoptótico intrínseco de uma maneira dependente ou independente de BAX e BAK1. Altos níveis de BOK podem induzir apoptose ⁶⁰. PO1 apresentou hiperexpressão de BOK e PO2 hipoexpressão, notando-se que SRL não alterou a expressão deste gene. Estes

resultados reforçam a nossa hipótese de que a desregulação dos genes das vias de sinalização da apoptose, principalmente os da via intrínseca, surge no sentido de compensar o organismo para alcançar uma homeostasia através de redução dos sintomas clínicos da doença. É o caso por exemplo de P01 que mostra menor índice de linfoproliferação que P02 e P03 que até agora está isento de manifestação linfoproliferativa.

Assim como *BOK*, o gene próapoptótico *BCL2L14* também apresentou hiperexpressão em P01 e P03 sem fenótipo de linfoproliferação. *BCL2L14* é um membro da família BCL2, cuja hiperexpressão induz a apoptose nas células (12/10/2021; https://www.genecards.org/) e consequentemente reduz a linfoproliferação. Em contrapartida P02, com fenótipo de linfoproliferação persistente, mostrou-se com expressão normal de *BCL2L14*, porém o SRL parece ter reduzido a sua expressão, chegando próximo do limite inferior da normalidade (figura 14).

A proteína TP53 responde a diversos estresses celulares para regular a expressão de genes alvo, induzindo assim a parada do ciclo celular, apoptose, senescência, reparo de DNA ou alterações no metabolismo ⁶¹. O gene *TP53* desempenha um papel crucial na prevenção da formação de câncer, portanto mutações neste gene estão associadas a uma variedade de cânceres humanos ⁶². Cinquenta por cento (50%) dos canceres tem mutação em TP53, mas em nossos pacientes não encontramos mutação, portanto seu papel supressor é eficiente. Identificamos hiperexpressão deste gene em PO2 com e sem SRL, nos sugerindo que PO2 é pouco propenso ao desenvolvimento de malignidade, enquanto PO1 mostrou hipoexpressão de *TP53* (*p*=0,0117), sugerindo tendência ao desenvolvimento de malignidades (figura 14).

A proteína codificada pelo gene *IL10* é uma citocina produzida principalmente por monócitos e em menor extensão por linfócitos. Atua na imunorregulação e inflamação, também aumenta a sobrevivência, proliferação e produção de anticorpos dos linfócitos B ⁶³. IL10RA é um receptor para a IL-10. Medeia o sinal imunossupressor da IL-10 e, portanto, inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias. Promove a sobrevivência de células mielóides progenitoras (12/10/2021; https://www.genecards.org/). Observamos que a expressão destes 2 genes (*IL10* e *IL10RA*) podem compartilhar mecanismos de compensação entre si, onde, em P02, a hiperexpressão de *IL10* foi compensada pela hipoexpressão de *IL10RA*. Bem como em P03, onde a hipoexpressão de *IL10* causou alta expressão de *IL10RA* (quase hiperexpressão) (figura 14). Essa compensação de expressão gênica teve impacto na concentração sérica de IL-10 nesses pacientes, mostrando resultados similares e equilibrados em relação ao grupo controle (figura 15).

Ao analisarmos os genes antiapoptóticos encontramos o perfil oposto em PO2. Ou seja, dois dos três genes antiapoptóticos analisados apresentaram altas expressões em PO2 (figura 14). Também podemos observar hiperexpressão em PO1, exceto o *BCL2 que foi* hipoexpresso.

O gene BCL2 codifica uma proteína integral da membrana mitocondrial externa que bloqueia a morte apoptótica de algumas células, como os linfócitos (12/10/2021; https://www.genecards.org/). A hiperexpressão de BCL2 bloqueia a morte apoptótica. O BCL2 é único entre os protooncogenes, estando localizado na mitocôndria e interferindo na morte celular programada independente de promover a divisão celular 64. P01 apresentou hipoexpressão de BCL2, resultado condizente com ambos os arrays realizados. Estudos relatam que a expressão de *BCL2* pode ser induzida por IL-2 65 e IL10 63. Ausência de IL-2 causa fragmentação do DNA e apoptose. Deng, G. et. al.; 1993 e Di Renzo, et al., 2000, relataram que a expressão de BCL2 foi regulada negativamente após a retirada de IL-2. E a adição de IL-2 induziu a expressão endógena de BCL2 65; 66. Além disso, a IL-2 exerce atividades biológicas pleiotrópicas fundamentais atuando como fator de crescimento responsável por induzir a proliferação de linfócitos T CD4 + e CD8 +, Natural Killer e linfócitos B além de promover a produção de anticorpos ^{67; 68}. IL-2 é essencial para a manutenção da homeostase imunológica através do seu papel supressor contribuindo para a prevenção de doenças autoimunes e linfoproliferativas ^{67; 68}. Pudemos constatar em nosso estudo que a ausência de IL-2 em PO1 e PO2 (SRL+) (figura 15), provocou redução da expressão de BLC2, sendo PO1 hipoexpresso e PO2

(SRL+) normal, porém bem abaixo dos controles e demais pacientes, contribuindo assim para o fenótipo de linfoproliferação e autoimunidade observados nestes pacientes. Além disso, IL-10 pode prevenir a apoptose através da ativação do gene *BCL2* e inibir a apoptose dos linfócitos B ^{63 9}. De fato, P01 com baixa expressão de *BCl2* apresentou baixa dosagem de IL-10 (apesar da expressão gênica ser normal). O resultado final destes eventos é a redução da apoptose dos linfócitos B.

BIRC8 exerce um papel inibitório sobre as proteínas apoptóticas (IAPs), através de sua ação negativa sobre as caspases (proteínas apoptóticas), promovendo inibição da apoptose mediada por BAX que se liga à caspase 9 e APAF1 ^{69; 70}, mas não exerce esse efeito sobre a apoptose induzida por Fas ⁷⁰. Em nosso estudo encontramos este gene hiperexpresso em ambos os pacientes com fenótipo de linfoproliferação, P01 e P02 e observamos também que o SRL não interferiu na expressão de BIRC8 (figura 14), sugerindo que a hiperexpressão de BIRC8 pode ter relevante papel no fenótipo de proliferação celular observado em P01 e P02.

As proteínas codificadas pelo gene *BCL2L1* estão localizadas na membrana mitocondrial, são responsáveis pela abertura regular do canal da membrana mitocondrial externa, cuja função conhecida é promover a sobrevida celular através da regulação da homeostase elétrica e osmótica mitocondrial⁷¹. Portanto, a hiperexpressão *de BCL2L1* pode causar aumento da sobrevida celular e consequentemente linfoproliferação, exatamente como nos fenótipos de P01 e P02 (figura 14).

A comparação da expressão do gene *TNFSRF13B* (figura 14) com a expressão da proteína (figura 6) mostrou uma correlação, onde a hipoexpressão gênica em P01 refletiu em baixa expressão de TACI (TNFRSF13B). Contudo, em relação aos controles, a diferença na expressão de TACI não foi significativa. Embora P02 tenha mostrado alta expressão de *TNFSRF13B* em ambas as análises e P03 expressão intermediária, não foi possível relacionar as expressões gênica e proteica de TNFRSF13B com os fenótipos clínicos da doença. Para a caracterização dos fenótipos clínicos, o nível de desregulação das vias de sinalização da apoptose, parece ser o melhor indicador.

P02, com linfoproliferação marcante, do total de 14 genes analisados (figura 14) apresentou 2 genes próapoptóticos hiperexpressos (*TP53* e *IL10*), 4 genes próapoptóticos hipoexpressos (*FASLG, IL10RA, BOK* e *TNFRSF21*), e 2 genes antiapoptóticos (*BIRC8* e *BCL2L1*) hiperexpressos (figura 14). Enquanto P01, com moderada linfoproliferação mostrou hiperexpressão de 2 genes próapoptóticos (*BCL2L14* e *BOK*), hipoexpressão de um gene próapoptótico (*TNFRSF21*), similar ao P02 (SRL+) e hiperexpressão de 2 genes antiapoptóticos (*BIRC8* e *BCL2L1*) porém, *BCL2* apresentou-se hipoexpresso (figura 14). Todavia, P03, cujo fenótipo é leve e sem características linfoproliferativas, apresentou hiperexpressão de 2 genes próapoptóticos (*FASLG* e *BCL2L14*), e hipoexpressão de IL10. Contudo, os genes de sobrevida apresentaram expressão normal (figura 14). Estes resultados concordam com os fenótipos dos indivíduos.

De grande relevância em nosso estudo foi o resultado obtido em P03, com hiperexpressão dos genes *IKBKG*, *NFKB1*, *RELA*, *REL*, *NFKBIA*, *NFKBIE* e *NFKB2*, os quais estão envolvidos com a via de sinalização canônica de NFκB e hipoexpressão do gene *CHUK*, um inibidor da via canônica. A via NF-kB desempenha um papel importante na regulação da apoptose ⁷², além de ser responsável por coordenar as respostas inflamatórias; imunidade inata e adaptativa; e diferenciação, proliferação e sobrevivência celular em quase todos os organismos multicelulares. Se NFκB induz uma resposta antiapoptótica ou pró-apoptótica, depende do tipo celular e do estímulo. Enquanto o NF-κB previne predominantemente a apoptose nos linfócitos B e promove a ativação dos linfócitos B, seu efeito nos linfócitos T é variável e dependente do tipo de estímulo ⁷³.

Além disso, já foi relatado que NF-kB é um importante regulador de FasL, ele atua diretamente na indução da transcrição do FasL quando ativado por danos ao DNA ⁷². De fato, estas informações condizem com nosso estudo, pois PO3, o qual apresentou hiperexpressão da maioria dos genes da via NF-kB também mostrou hiperexpressão do gene *FASLG*, enquanto

todos os outros pacientes mostraram-se hipoexpressos para este gene. Desta forma, o gene próapoptótico FASLG aumenta a apoptose celular, reduzindo a inflamação, autoimunidade e linfoproliferação.

A baixa produção de IL-8, IL-2 e IL-5 observada nos nossos pacientes pode contribuir para a falha da maturação e diferenciação de linfócitos B. Além disso, CSR é induzida por uma combinação de estímulos mediados por TGF, IL-10 e IL-2 9; 74; 75. Aqui, é importante destacar o papel regulador chave de NFκB das respostas imunológicas, especialmente como via de sinalização para a produção de interleucinas. Consequentemente, a ativação desregulada do NF-κB é uma marca registrada das doenças inflamatórias crônicas 76; 77, como a manifestação de plaquetopenia apresentada pelos três pacientes. A via canônica de NFκB está envolvida em quase todos os aspectos das respostas imunes, enquanto a via NF-κB não canônica parece estar evoluindo como um eixo de sinalização suplementar que coopera com a via NF-κB canônica na regulação de funções específicas do sistema imune adaptativo. É muito provável que a desregulação na via canônica causada pela variante TACI desvie a resposta para a via não canônica, causando muita ativação de células T, com respostas autoimunes e inflamatórias 77, como descrito para doença pulmonar intersticial nos pacientes com ICV por mutação em *TNFRSF13B* 78.

A interleucina-8 (IL-8) desempenha papel crucial na sobrevivência celular, na manutenção da homeostase celular 79 , participa com outras citocinas na cascata de sinalização pró-inflamatória, como um fator quimiotático, guiando os neutrófilos até o local da infecção 80 . TGF- β regula a expressão de citocinas, incluindo IL-8 79 e é o fator substancial para a produção de IgA 81 . Apesar de não significativo, os baixos níveis de TGF- β encontrados nos pacientes P01 e P03 podem estar relacionados com a ausência de IgA nesses indivíduos. TGF- β induz a apoptose em linfócitos B, impedindo sua proliferação. Camundongos deficientes em TGF- β apresentam hiperproliferação e autoimunidade desregulada 82 .

Encontramos que os níveis de IL-6 estavam semelhantes aos controles e sabendo do seu papel na inibição da apoptose, na inflamação e câncer, e na maturação das células B ^{83; 84}, consideramos que a sua contribuição na patogênese da inflamação nos pacientes parece ser irrelevante. IL-5 atua como fator de crescimento e diferenciação para células B e eosinófilos. Mainou-Fowler, T. *et al.*; 1994 relataram que a IL-5 induziu apoptose em linfócitos B por uma via que é independente da expressão de bcl-2 ⁸⁵. Os níveis séricos de IL-5 foram negativamente correlacionados com a expressão de FasL. Em cultura de células, a exposição de T CD4 + à IL-5 suprimiu a expressão de FasL e aumentou a expressão de Bcl2L12. IL-5 aumentou os níveis de Bcl2L12 em células T CD4 + ⁸⁶.

Tomados em conjunto, nossos resultados apontam para as seguintes conclusões:

6. CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, nossos resultados apontam para as seguintes conclusões:

- Nosso estudo ajuda a detectar as principais vias relacionadas ao desenvolvimento da doença causada pela variante p.C104R no gene TNFRSF13B, contribuindo assim para um melhor entendimento de sua fisiopatologia.
- A variante p.C104R em TNFRSF13B pode derivar com outros cenários mais complexos a
 penetrância e variação fenotípica dentro das famílias, como foi observado entre nossos
 pacientes em relação à intensidade das manifestações autoimunes e linfoproliferação.
- A expressão da proteína TACI na membrana celular não está correlacionada com a expressividade da doença, uma vez que o fenótipo grave (P02) apresentou maior expressão de TACI, o fenótipo moderado (P01) menor expressão de TACI entre os pacientes, e o grupo controle apresentou expressão maior que P01 e P03. A expressão desta proteína está relacionada à idade, onde encontramos expressões mais altas nos

adolescentes e expressões mais baixas nas mães. O uso de SRL por tempo prolongado pode ter interferido no resultado da expressão de TACI. Portanto, a mutação p.C104R não interfere na expressão da proteína TACI sugerindo que toda essa variabilidade na expressão de TACI ocorra por meio da haploinsuficiência deste gene.

- Em relação às vias desreguladas de sinalização de apoptose em nossos pacientes, concluímos que quanto maior o número de genes desregulados, melhor o curso clínico em relação à linfoproliferação e à autoimunidade.
- Em todos os probandos, os genes próapoptóticos BCL2L11, BCL2L13, BNIP3L, NOD2 regulados positivamente e CARD6 e TNFRSF21 regulados negativamente, poderiam ser utilizados como biomarcadores da doença causada pela variante p.C104R, uma vez que contribuem para reforçar o esforço do sistema para controlar os fenômenos de sobrevivência e morte celular.
- A expressão normal, em todos os pacientes, em 15 genes (BCL2L2, BIK, CASP6, CRADD, FADD, HIP1, HTRA2, IFT57, IKBKB, IKBKE, MCL1, NFKBIB, PEA15, TBK1 e TNFRSF25) envolvidos em ambas as vias da apoptose indica que estes genes, provavelmente, não são influenciados pela mutação em TACI.
- Independente da expressividade da doença, a expressão dos genes da família BCL2 são os mais alterados na mutação p.C104R do gene TNFRSF13B.
- O SRL interfere na expressão dos genes nas vias da apoptose, reduzindo a desregulação de vários genes.
- Portanto, o nível de desregulação das vias de sinalização da apoptose pode ser o melhor indicador para a caracterização dos fenótipos clínicos. A expressão do gene TNFRSF13B e da proteína TACI não auxilia nessa caracterização clínica.
- A hiperexpressão de vários genes da via canônica de NF-kB pode regular positivamente a expressão do gene FASLG, provocando aumento na apoptose celular, reduzindo os principais sintomas clínicos de autoimunidade e linfoproliferação em pacientes com mutação em TNFRSF13B.

7. REFERÊNCIAS

- YONG, P. F. et al. Common variable immunodeficiency: an update on etiology and management. **Immunol Allergy Clin North Am,** v. 28, n. 2, p. 367-86, ix-x, May 2008. ISSN 0889-8561. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18424338 >.
- BOGAERT, D. J. et al. Genes associated with common variable immunodeficiency: one diagnosis to rule them all? **J Med Genet,** v. 53, n. 9, p. 575-90, 09 2016. ISSN 1468-6244. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27250108 >.
- JANEWAY, C. A.; APT, L.; GITLIN, D. Agammaglobulinemia. Trans Assoc Am Physicians, v. 66, p. 200-2, 1953. ISSN 0066-9458. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13136263 >.
- GITLIN, D.; JANEWAY, C. A. Agammaglobulinemia, congenital, acquired and transient forms. **Prog Hematol,** v. 1, p. 318-29, 1956. ISSN 0079-6301. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13359516>.
- GARIBYAN, L. et al. Dominant-negative effect of the heterozygous C104R TACI mutation in common variable immunodeficiency (CVID). **J Clin Invest,** v. 117, n. 6, p. 1550-7, Jun 2007. ISSN 0021-9738. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17492055 >.
- PARK, M. A. et al. Common variable immunodeficiency: a new look at an old disease. **Lancet,** v. 372, n. 9637, p. 489-502, Aug 2008. ISSN 1474-547X. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18692715>.
- ABOLHASSANI, H. et al. A review on guidelines for management and treatment of common variable immunodeficiency. **Expert Rev Clin Immunol**, v. 9, n. 6, p. 561-74; quiz 575, Jun 2013. ISSN 1744-8409. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23730886>.
- RACHID, R. et al. TACI mutation in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. **Curr Allergy Asthma Rep,** v. 6, n. 5, p. 357-62, Sep 2006. ISSN 1529-7322. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16899196>.
- YAZDANI, R. et al. Role of apoptosis in common variable immunodeficiency and selective immunoglobulin A deficiency. **Mol Immunol,** v. 71, p. 1-9, Mar 2016. ISSN 1872-9142. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26795881 >.
- VAN SCHOUWENBURG, P. A. et al. Application of whole genome and RNA sequencing to investigate the genomic landscape of common variable immunodeficiency disorders. **Clin Immunol**, v. 160, n. 2, p. 301-14, Oct 2015. ISSN 1521-7035. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26122175>.

- MAFFUCCI, P. et al. Genetic Diagnosis Using Whole Exome Sequencing in Common Variable Immunodeficiency. **Front Immunol,** v. 7, p. 220, 2016. ISSN 1664-3224. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27379089 >.
- KIENZLER, A. K.; HARGREAVES, C. E.; PATEL, S. Y. The role of genomics in common variable immunodeficiency disorders. **Clin Exp Immunol**, v. 188, n. 3, p. 326-332, 06 2017. ISSN 1365-2249. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28236292>.
- KOOPMANS, W. et al. Clinical variability of family members with the C104R mutation in transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor (TACI). **J Clin Immunol**, v. 33, n. 1, p. 68-73, Jan 2013. ISSN 1573-2592. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22983507 >.
- SALZER, U. et al. Relevance of biallelic versus monoallelic TNFRSF13B mutations in distinguishing disease-causing from risk-increasing TNFRSF13B variants in antibody deficiency syndromes. **Blood**, v. 113, n. 9, p. 1967-76, Feb 2009. ISSN 1528-0020. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18981294 >.
- BRANDT, D.; GERSHWIN, M. E. Common variable immune deficiency and autoimmunity. **Autoimmun Rev,** v. 5, n. 7, p. 465-70, Aug 2006. ISSN 1568-9972. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16920573 >.
- GLOCKER, E.; EHL, S.; GRIMBACHER, B. Common variable immunodeficiency in children. **Curr Opin Pediatr,** v. 19, n. 6, p. 685-92, Dec 2007. ISSN 1040-8703. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18025937>.
- DE VALLES-IBÁÑEZ, G. et al. Evaluating the Genetics of Common Variable Immunodeficiency: Monogenetic Model and Beyond. **Front Immunol**, v. 9, p. 636, 2018. ISSN 1664-3224. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29867916 >.
- SALZER, U.; UNGER, S.; WARNATZ, K. Common variable immunodeficiency (CVID): exploring the multiple dimensions of a heterogeneous disease. **Ann N Y Acad Sci,** v. 1250, p. 41-9, Feb 2012. ISSN 1749-6632. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22300655 >.
- LEE, J. J. et al. Transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor mutations in common variable immunodeficiency. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, v. 8, n. 6, p. 520-6, Dec 2008. ISSN 1473-6322. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18978466 >.
- SALZER, U.; JENNINGS, S.; GRIMBACHER, B. To switch or not to switch--the opposing roles of TACI in terminal B cell differentiation. **Eur J Immunol,** v. 37, n. 1, p. 17-20, Jan 2007. ISSN 0014-2980. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17171762 >.

- SALZER, U. et al. Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. **Nat Genet,** v. 37, n. 8, p. 820-8, Aug 2005. ISSN 1061-4036. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16007087 >.
- ZHANG, L. et al. Transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor mutations in common variable immunodeficiency: clinical and immunologic outcomes in heterozygotes. J Allergy Clin Immunol, v. 120, n. 5, p. 1178-85, Nov 2007. ISSN 1097-6825. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17983875>.
- SALZER, U.; GRIMBACHER, B. TACItly changing tunes: farewell to a yin and yang of BAFF receptor and TACI in humoral immunity? New genetic defects in common variable immunodeficiency. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, v. 5, n. 6, p. 496-503, Dec 2005. ISSN 1528-4050. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16264328 >.
- PIEPER, K.; GRIMBACHER, B.; EIBEL, H. B-cell biology and development. J Allergy Clin Immunol, v. 131, n. 4, p. 959-71, Apr 2013. ISSN 1097-6825. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23465663>.
- ZHANG, Y. et al. Effect of TACI signaling on humoral immunity and autoimmune diseases. J Immunol Res, v. 2015, p. 247426, 2015. ISSN 2314-7156. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25866827>.
- ROMBERG, N. et al. TNF receptor superfamily member 13b (TNFRSF13B) hemizygosity reveals transmembrane activator and CAML interactor haploinsufficiency at later stages of B-cell development. J Allergy Clin Immunol, v. 136, n. 5, p. 1315-25, Nov 2015. ISSN 1097-6825. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26100089>.
- MARTIN, F.; DIXIT, V. M. Unraveling TACIt functions. **Nat Genet,** v. 37, n. 8, p. 793-4, Aug 2005. ISSN 1061-4036. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16049503>.
- MAK, T. W.; YEH, W. C. Signaling for survival and apoptosis in the immune system. **Arthritis Res,** v. 4 Suppl 3, p. S243-52, 2002. ISSN 1465-9905. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12110144>.
- LEE, J. J. et al. The C104R mutant impairs the function of transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor (TACI) through haploinsufficiency. J Allergy Clin Immunol, v. 126, n. 6, p. 1234-41.e2, Dec 2010. ISSN 1097-6825. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20889194 >.
- FRIED, A. J. et al. Functional analysis of transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor (TACI) mutations associated with common variable immunodeficiency. **J Allergy Clin Immunol**, v. 128, n. 1, p. 226-228.e1, Jul 2011. ISSN 1097-6825. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21419480 >.

- CASTIGLI, E.; GEHA, R. S. TACI, isotype switching, CVID and IgAD. **Immunol Res,** v. 38, n. 1-3, p. 102-11, 2007. ISSN 0257-277X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17917015 >.
- LUCENA, J. M. et al. Incidence of the C104R TACI Mutation in Patients With Primary Antibody Deficiency. **J Investig Allergol Clin Immunol,** v. 25, n. 5, p. 378-9, 2015. ISSN 1018-9068. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26727773 >.
- HENGEVELD, P. J.; KERSTEN, M. J. B-cell activating factor in the pathophysiology of multiple myeloma: a target for therapy? **Blood Cancer J,** v. 5, p. e282, Feb 27 2015. ISSN 2044-5385. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25723853 >.
- SESHASAYEE, D. et al. Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLyS receptor. **Immunity**, v. 18, n. 2, p. 279-88, Feb 2003. ISSN 1074-7613. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12594954 >.
- MOHAMMADI, J. et al. Novel mutations in TACI (TNFRSF13B) causing common variable immunodeficiency. **J Clin Immunol,** v. 29, n. 6, p. 777-85, Nov 2009. ISSN 1573-2592. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19629655>.
- OPFERMAN, J. T. Apoptosis in the development of the immune system. **Cell Death Differ,** v. 15, n. 2, p. 234-42, Feb 2008. ISSN 1350-9047. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17571082 >.
- RENSING-EHL, A. et al. Clinical and immunological overlap between autoimmune lymphoproliferative syndrome and common variable immunodeficiency. **Clin Immunol**, v. 137, n. 3, p. 357-65, Dec 2010. ISSN 1521-7035. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20832369 >.
- TANGYE, S. G. et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. **J Clin Immunol**, v. 40, n. 1, p. 24-64, 01 2020. ISSN 1573-2592. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31953710>.
- FERNANDO, S. L.; JANG, H. S.; LI, J. The Immune Dysregulation of Common Variable Immunodeficiency Disorders. **Immunol Lett,** v. 230, p. 21-26, Feb 2021. ISSN 1879-0542. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33333111 >.
- CHAN, A. Y.; TORGERSON, T. R. Primary immune regulatory disorders: a growing universe of immune dysregulation. **Curr Opin Allergy Clin Immunol,** v. 20, n. 6, p. 582-590, 12 2020. ISSN 1473-6322. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32941318>.

- PATEL, R. K.; JAIN, M. NGS QC Toolkit: a toolkit for quality control of next generation sequencing data. **PLoS One,** v. 7, n. 2, p. e30619, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22312429>.
- LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics,** v. 25, n. 14, p. 1754-60, Jul 15 2009. ISSN 1367-4811. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19451168 >.
- VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol,** v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, Jun 18 2002. ISSN 1474-760X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12184808 >.

⁴⁴ AJF, G. **An Introduction to Genetic**

Analysis. 7th edition. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22090/: New York: W. H. Freeman, 2000. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22090/: New York: W. H.

- GRUBER, C.; BOGUNOVIC, D. Incomplete penetrance in primary immunodeficiency: a skeleton in the closet. **Hum Genet,** v. 139, n. 6-7, p. 745-757, Jun 2020. ISSN 1432-1203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32067110 >.
- TABATA, Y. et al. Rapid detection of intracellular SH2D1A protein in cytotoxic lymphocytes from patients with X-linked lymphoproliferative disease and their family members. **Blood**, v. 105, n. 8, p. 3066-71, Apr 2005. ISSN 0006-4971. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15632210 >.
- SCHATORJÉ, E. J. et al. Age-matched reference values for B-lymphocyte subpopulations and CVID classifications in children. **Scand J Immunol,** v. 74, n. 5, p. 502-10, Nov 2011. ISSN 1365-3083. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21815909 >.
- SAXON, A. et al. Long-term administration of 13-cis retinoic acid in common variable immunodeficiency: circulating interleukin-6 levels, B-cell surface molecule display, and in vitro and in vivo B-cell antibody production. **Immunology**, v. 80, n. 3, p. 477-87, Nov 1993. ISSN 0019-2805. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8288320 >.
- SAXON, A.; SIDELL, N.; ZHANG, K. B cells from subjects with CVI can be driven to Ig production in response to CD40 stimulation. **Cell Immunol**, v. 144, n. 1, p. 169-81, Oct 01 1992. ISSN 0008-8749. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1382864 >.
- AMERATUNGA, R. et al. Epistatic interactions between mutations of TACI (**Clin Transl Immunology**, v. 6, n. 10, p. e159, Oct 2017. ISSN 2050-0068. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29114388>.

- SAXON, A. et al. B cells from a distinct subset of patients with common variable immunodeficiency (CVID) have increased CD95 (Apo-1/fas), diminished CD38 expression, and undergo enhanced apoptosis. **Clin Exp Immunol,** v. 102, n. 1, p. 17-25, Oct 1995. ISSN 0009-9104. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7554385>.
- IGLESIAS, J. et al. CD95 expression and function on lymphocyte subpopulations in common variable immunodeficiency (CVID); related to increased apoptosis. Clin Exp Immunol, v. 117, n. 1, p. 138-46, Jul 1999. ISSN 0009-9104. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10403927>.
- DI RENZO, M. et al. Enhanced T cell apoptosis in common variable immunodeficiency: negative role of the fas/fasligand system and of the Bcl-2 family proteins and possible role of TNF-RS. **Clin Exp Immunol,** v. 125, n. 1, p. 117-22, Jul 2001. ISSN 0009-9104. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11472434 >.
- CLEMENTE, A. et al. CD27+ B cells from a subgroup of common variable immunodeficiency patients are less sensitive to apoptosis rescue regardless of interleukin-21 signalling. **Clin Exp Immunol**, v. 174, n. 1, p. 97-108, Oct 2013. ISSN 1365-2249. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23738704 >.
- SHAKERI, R.; KHEIROLLAHI, A.; DAVOODI, J. Apaf-1: Regulation and function in cell death. **Biochimie,** v. 135, p. 111-125, Apr 2017. ISSN 1638-6183. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28192157 >.
- EGORSHINA, A. Y. et al. [Caspase-2 as an Oncosupressor and Metabolism Regulator: What Life Will Bring over the Long Run?]. **Mol Biol (Mosk),** v. 52, n. 5, p. 750-763, 2018 Sep-Oct 2018. ISSN 0026-8984. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30363050>.
- YAMADA, A. et al. Dual Role of Fas/FasL-Mediated Signal in Peripheral Immune Tolerance. **Front Immunol,** v. 8, p. 403, 2017. ISSN 1664-3224. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28424702>.
- CLAESSENS, Y. E. et al. In vitro proliferation and differentiation of erythroid progenitors from patients with myelodysplastic syndromes: evidence for Fas-dependent apoptosis. Blood, v. 99, n. 5, p. 1594-601, Mar 01 2002. ISSN 0006-4971. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861273>.
- TACHIBANA, O. et al. Expression of Fas/APO-1 during the progression of astrocytomas. **Cancer Res,** v. 55, n. 23, p. 5528-30, Dec 01 1995. ISSN 0008-5472. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7585627>.
- NAIM, S.; KAUFMANN, T. The Multifaceted Roles of the BCL-2 Family Member BOK. Front Cell Dev Biol, v. 8, p. 574338, 2020. ISSN 2296-634X. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33043006>.

- AUBREY, B. J. et al. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? **Cell Death Differ,** v. 25, n. 1, p. 104-113, 01 2018. ISSN 1476-5403. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29149101 >.
- SURGET, S.; KHOURY, M. P.; BOURDON, J. C. Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. **Onco Targets Ther,** v. 7, p. 57-68, Dec 19 2013. ISSN 1178-6930. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24379683 >.
- ITOH, K.; HIROHATA, S. The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation, and differentiation. **J Immunol,** v. 154, n. 9, p. 4341-50, May 01 1995. ISSN 0022-1767. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7722292>.
- HOCKENBERY, D. et al. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. **Nature,** v. 348, n. 6299, p. 334-6, Nov 22 1990. ISSN 0028-0836. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2250705 >.
- DENG, G.; PODACK, E. R. Suppression of apoptosis in a cytotoxic T-cell line by interleukin 2-mediated gene transcription and deregulated expression of the protooncogene bcl-2. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 90, n. 6, p. 2189-93, Mar 15 1993. ISSN 0027-8424. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8460122>.
- DI RENZO, M. et al. Enhanced apoptosis of T cells in common variable immunodeficiency (CVID): role of defective CD28 co-stimulation. **Clin Exp Immunol**, v. 120, n. 3, p. 503-11, Jun 2000. ISSN 0009-9104. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10844530>.
- OROZCO VALENCIA, A. et al. Interleukin-2 as immunotherapeutic in the autoimmune diseases. Int Immunopharmacol, v. 81, p. 106296, Apr 2020. ISSN 1878-1705. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32058934>.
- YE, C.; BRAND, D.; ZHENG, S. G. Targeting IL-2: an unexpected effect in treating immunological diseases. **Signal Transduct Target Ther,** v. 3, p. 2, 2018 2018. ISSN 2059-3635. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29527328 >.
- SALEEM, M. et al. Inhibitors of apoptotic proteins: new targets for anticancer therapy. Chem Biol Drug Des, v. 82, n. 3, p. 243-51, Sep 2013. ISSN 1747-0285. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23790005>.
- RICHTER, B. W. et al. Molecular cloning of ILP-2, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. **Mol Cell Biol,** v. 21, n. 13, p. 4292-301, Jul 2001. ISSN 0270-7306. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390657 >.

- VANDER HEIDEN, M. G. et al. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. **Cell,** v. 91, n. 5, p. 627-37, Nov 28 1997. ISSN 0092-8674. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9393856 >.
- LIN, B. et al. NF-kappaB functions as both a proapoptotic and antiapoptotic regulatory factor within a single cell type. **Cell Death Differ,** v. 6, n. 6, p. 570-82, Jun 1999. ISSN 1350-9047. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10381655 >.
- WU, M. et al. Inhibition of NF-kappaB/Rel induces apoptosis of murine B cells. **EMBO J**, v. 15, n. 17, p. 4682-90, Sep 02 1996. ISSN 0261-4189. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8887559 >.
- BORTE, S. et al. Interleukin-21 restores immunoglobulin production ex vivo in patients with common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. **Blood,** v. 114, n. 19, p. 4089-98, Nov 2009. ISSN 1528-0020. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19738033>.
- HUMMELSHOJ, L. et al. Class switch recombination in selective IgA-deficient subjects. Clin Exp Immunol, v. 144, n. 3, p. 458-66, Jun 2006. ISSN 0009-9104. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16734615>.
- MITCHELL, S.; VARGAS, J.; HOFFMANN, A. Signaling via the NFκB system. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, v. 8, n. 3, p. 227-41, 05 2016. ISSN 1939-005X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26990581 >.
- ⁷⁷ LIU, T. et al. NF-κB signaling in inflammation. **Signal Transduct Target Ther,** v. 2, 2017 2017. ISSN 2095-9907. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29158945 >.
- MAGLIONE, P. J. et al. BAFF-driven B cell hyperplasia underlies lung disease in common variable immunodeficiency. **JCI Insight,** v. 4, n. 5, 03 07 2019. ISSN 2379-3708. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30843876 >.
- KUMAR, S. et al. Hsp60 and IL-8 axis promotes apoptosis resistance in cancer. **Br J Cancer**, v. 121, n. 11, p. 934-943, 11 2019. ISSN 1532-1827. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31673102>.
- WAUGH, D. J.; WILSON, C. The interleukin-8 pathway in cancer. **Clin Cancer Res,** v. 14, n. 21, p. 6735-41, Nov 01 2008. ISSN 1078-0432. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18980965 >.
- BAGHERI, Y. et al. IL-10 induces TGF- β secretion, TGF- β receptor II upregulation, and IgA secretion in B cells. **Eur Cytokine Netw,** v. 30, n. 3, p. 107-113, 09 01 2019. ISSN 1952-4005. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31957700 >.

- KULKARNI, A. B. et al. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 90, n. 2, p. 770-4, Jan 15 1993. ISSN 0027-8424. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8421714 >.
- LICHTENSTEIN, A. et al. Interleukin-6 inhibits apoptosis of malignant plasma cells. **Cell Immunol,** v. 162, n. 2, p. 248-55, May 1995. ISSN 0008-8749. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7743552>.
- KUMARI, N. et al. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. **Tumour Biol,** v. 37, n. 9, p. 11553-11572, Sep 2016. ISSN 1423-0380. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27260630>.
- MAINOU-FOWLER, T. et al. Interleukin-5 (IL-5) increases spontaneous apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells in vitro independently of bcl-2 expression and is inhibited by IL-4. **Blood,** v. 84, n. 7, p. 2297-304, Oct 01 1994. ISSN 0006-4971. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7919349>.
- LUO, X. Q. et al. Interleukin-5 induces apoptotic defects in CD4. J Leukoc Biol, v. 105, n.
 4, p. 719-727, 04 2019. ISSN 1938-3673. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30694585>.

8. ANEXOS

Anexo 1: Genes via extrínseca da apoptose com seus respectivos valores de expressão em FC

| , | | | | <u> </u> |
|--------|-------|------------|--------------------------------|------------------------------|
| | P01 | P02 (SRL+) | | |
| APAF1 | -1,87 | -1,08 | CARD family | Próapoptótico |
| BAX | 1,03 | -1,20 | Bcl-2 family-regulated pathway | Próapoptótico |
| BCL2 | -2,62 | 1,25 | Bcl-2 family-regulated pathway | Antiapoptótico |
| BID | 1,23 | 2,35 | Bcl-2 family-regulated pathway | Próapoptótico |
| BIRC2 | 1,35 | -2,00 | IAP family | Antiapoptótico |
| BIRC3 | -1,70 | 1,00 | IAP family | Antiapoptótico |
| CASP2 | 1,05 | -1,14 | Caspases | Próapoptótico |
| CASP3 | 2,30 | 1,49 | Caspases | Próapoptótico |
| CASP7 | 1,57 | -1,15 | Caspases | Próapoptótico |
| CASP8 | -2,86 | -1,97 | Caspases | Próapoptótico |
| CASP9 | -1,06 | -1,02 | Caspases | Próapoptótico |
| CFLAR | -1,79 | -1,35 | Caspases | Próapoptótico/Antiapoptótico |
| СНИК | 1,16 | 1,45 | NFkB signaling pathway | Antiapoptótico |
| DAXX | -1,03 | -1,08 | Others | Antiapoptótico |
| DIABLO | 1,05 | -1,17 | Others | Próapoptótico |
| FADD | -1,41 | -1,99 | TNF and TNFR pathway | Próapoptótico |
| FAS | -1,34 | -1,73 | TNF and TNFR pathway | Próapoptótico |
| FASLG | -2,17 | -5,64 | TNF and TNFR pathway | Próapoptótico |
| IKBKB | -1,63 | -1,37 | NFkB signaling pathway | - |

| IKBKG | 1,22 | 1,16 | NFkB signaling pathway | |
|-----------------|-------|---------|------------------------------|------------------------------|
| МАРЗК5 | 1,44 | 1,53 | MAPK signaling cascade genes | - |
| МАРК8 | -1,64 | | MAPK signaling cascade genes | Próapoptótico/Antiapoptótico |
| МАРК9 | -1,52 | -1,43 | MAPK signaling cascade genes | Próapoptótico/Antiapoptótico |
| NFKB1 | -2,22 | -1,29 | NFkB signaling pathway | - |
| NFKB2 | -1,14 | 1,35 | NFkB signaling pathway | - |
| NFKBIA | -1,23 | 1,22 | NFkB signaling pathway | - |
| NGFR | -1,08 | -1,77 | NFkB signaling pathway | Antiapoptótico |
| PARP1 | -1,48 | -1,67 | Others | Antiapoptótico |
| RELA | -1,99 | -149,41 | NFkB signaling pathway | Antiapoptótico |
| TNF | -1,28 | 1,47 | TNF and TNFR pathway | Próapoptótico |
| TNFRSF10A | -1,13 | 1,01 | TNF and TNFR pathway | Próapoptótico |
| TNFRSF10B | -1,25 | 1,06 | TNF and TNFR pathway | Próapoptótico |
| TNFRSF10C | -1,90 | 1,08 | TNF and TNFR pathway | Antiapoptótico |
| TNFRSF10D | -2,06 | 1,57 | TNF and TNFR pathway | Antiapoptótico |
| TNFRSF1A | -1,20 | -1,46 | TNF and TNFR pathway | Próapoptótico |
| TNFRSF21 | -3,89 | 1,03 | TNF and TNFR pathway | Próapoptótico |
| TNFRSF25 | -1,06 | -1,36 | TNF and TNFR pathway | Antiapoptótico |
| TNFRSF6B- RTEL1 | -1,33 | 1,13 | TNF and TNFR pathway | - |
| TNFSF10 | 1,05 | -1,06 | TNF and TNFR pathway | Próapoptótico |
| TP53 | -1,26 | 1,14 | Others | Próapoptótico |
| TRAF2 | 1,03 | -1,22 | Others | Antiapoptótico |

Anexo 2: Genes via intrínseca e extrínseca da apoptose com seus respectivos valores de expressão em FC

| <u> </u> | JO CITITO | | | | | |
|----------|-----------|------------|-------|--------|--------------------------------|----------------|
| Genes | P01 | P02 (SRL+) | P02 | P03 | Família de genes | |
| APAF1 | -1,75 | 1,02 | 1,37 | 3,02 | CARD family | Próapoptótico |
| BAD | 1,54 | 1,08 | 1,05 | 2,84 | Bcl-2 family-regulated pathway | Próapoptótico |
| BAK1 | 2,57 | 4,28 | 1,01 | -4,31 | Bcl-2 family-regulated pathway | Próapoptótico |
| BAX | 1,27 | 1,25 | 1,57 | 2,95 | Bcl-2 family-regulated pathway | Próapoptótico |
| BBC3 | -1,28 | -1,36 | 1,35 | 1,76 | Bcl-2 family-regulated pathway | Antiapoptótico |
| BCAP31 | 1,09 | -1,01 | 1,17 | 1,79 | Others | Próapoptótico |
| BCL10 | -1,51 | 1,22 | 1,31 | -11,36 | CARD family | Próapoptótico |
| BCL2A1 | -1,86 | 1,69 | 1,26 | -1,11 | Bcl-2 family-regulated pathway | Antiapoptótico |
| BCL2 | -2,63 | 1,19 | 1,20 | -1,13 | Bcl-2 family-regulated pathway | Antiapoptótico |
| BCL2L11 | 1,56 | 1,49 | 1,69 | 1,89 | Bcl-2 family-regulated pathway | Próapoptótico |
| BCL2L13 | 3,91 | 1,24 | 1,58 | 2,07 | Bcl-2 family-regulated pathway | Próapoptótico |
| BCL2L14 | 6,44 | -1,29 | -1,12 | 2,44 | Bcl-2 family-regulated pathway | Próapoptótico |
| BCL2L1 | 7,83 | 1,55 | 1,07 | -1,38 | Bcl-2 family-regulated pathway | Antiapoptótico |
| BCL2L2 | -1,08 | -1,23 | -1,05 | -1,03 | Bcl-2 family-regulated pathway | Antiapoptótico |
| BCL3 | -1,02 | 1,65 | 1,20 | 2,78 | Bcl-2 family-regulated pathway | Antiapoptótico |
| BID | -1,19 | 1,47 | 1,20 | 1,80 | Bcl-2 family-regulated pathway | Próapoptótico |
| BIK | 1,13 | 1,30 | 1,16 | 1,29 | Bcl-2 family-regulated pathway | • |
| BIRC2 | 2,36 | -1,27 | -1,12 | -6,62 | IAP family | Antiapoptótico |
| BIRC3 | -1,57 | 1,15 | 1,56 | -1,53 | IAP family | Antiapoptótico |

| BIRC5 | 2,43 | -1,25 | -1,10 | 2,74 | IAP family | Antiapoptótico |
|----------|-------|-------|-------|--------|--------------------------------|------------------------------|
| BIRC6 | -1,58 | -1,10 | 1,45 | 1,86 | IAP family | Antiapoptótico |
| BIRC8 | 1,94 | 5,26 | 1,18 | -13,16 | IAP family | Antiapoptótico |
| BNIP3 | -1,06 | 1,33 | -1,39 | -4,93 | Bcl-2 family-regulated pathway | Próapoptótico |
| BNIP3L | 5,47 | 1,70 | 1,97 | 2,94 | Bcl-2 family-regulated pathway | Próapoptótico |
| BOK | 1,41 | -8,85 | -6,99 | 1,14 | Bcl-2 family-regulated pathway | Próapoptótico |
| CARD6 | -2,57 | 1,23 | -1,58 | -7,14 | CARD family | Próapoptótico |
| CARD9 | -1,13 | 1,04 | 1,17 | 2,51 | CARD family | Próapoptótico |
| CARD9 | -1,28 | -1,34 | -1,27 | 2,17 | Caspases | Próapoptótico |
| CASP1 | 1,09 | 1,07 | -1,01 | 2,14 | Caspases | Próapoptótico |
| CASP2 | -1,05 | 1,11 | 1,09 | 2,37 | Caspases | Próapoptótico |
| CASP3 | 1,44 | -1,07 | -1,42 | -3,73 | Caspases | Próapoptótico |
| CASP4 | 1,02 | 1,46 | -1,28 | -1,67 | Caspases | Próapoptótico |
| CASP5 | -2,31 | 1,11 | -1,38 | -7,41 | Caspases | Próapoptótico |
| CASP6 | 1,13 | -1,17 | -1,39 | 1,21 | Caspases | Próapoptótico |
| CASP7 | 2,00 | -1,09 | -1,01 | 2,04 | Caspases | Próapoptótico |
| CASP8AP2 | -1,47 | -1,17 | 1,48 | -5,78 | Caspases | Próapoptótico |
| CASP8 | -1,53 | -1,09 | -1,16 | -4,90 | Caspases | Próapoptótico |
| CASP9 | 1,29 | 1,13 | 1,62 | 2,73 | Caspases | Próapoptótico |
| CFLAR | -1,30 | 1,01 | 1,26 | 2,58 | Caspases | Próapoptótico |
| CHUK | -1,41 | 1,05 | -2,08 | -27,03 | NFkB signaling pathway | Antiapoptótico |
| CRADD | 1,31 | 1,02 | -1,07 | 1,05 | Others | Próapoptótico |
| DAPK1 | 1,08 | -2,21 | -2,92 | 1,29 | Others | Próapoptótico |
| DEDD2 | 1,35 | 1,01 | 1,24 | 1,73 | Others | Próapoptótico |
| DEDD | 1,53 | 1,29 | 1,15 | 1,88 | Others | Próapoptótico |
| DIABLO | 1,22 | -1,00 | -1,57 | 1,36 | Others | Próapoptótico |
| FADD | 1,07 | -1,15 | -1,10 | 1,39 | TNF and TNFR pathway | Próapoptótico |
| FAS | 1,70 | 1,11 | 1,10 | 2,24 | TNF and TNFR pathway | Próapoptótico |
| FASLG | -1,56 | -3,69 | -2,09 | 2,04 | TNF and TNFR pathway | Próapoptótico |
| HIP1 | -1,27 | 1,05 | 1,46 | 1,32 | Others | - |
| HTRA2 | -1,09 | -1,06 | 1,24 | 1,05 | Others | Próapoptótico |
| IFT57 | -1,01 | 1,51 | 1,14 | -1,28 | Others | Próapoptótico |
| IKBKB | -1,16 | -1,01 | -1,05 | -1,36 | NFkB signaling pathway | - |
| IKBKE | -1,13 | 1,02 | 1,25 | -1,28 | NFkB signaling pathway | - |
| IKBKG | 1,39 | 1,34 | 1,31 | 2,10 | NFkB signaling pathway | - |
| LRDD | -1,00 | -1,16 | -1,03 | 1,77 | Others | Próapoptótico/Antiapoptótico |
| LTA | -1,15 | -1,04 | -1,45 | -2,03 | TNF and TNFR pathway | - |
| LTB | 1,26 | 1,20 | -1,13 | 2,41 | TNF and TNFR pathway | - |
| MCL1 | -1,41 | -1,08 | -1,37 | -1,33 | Bcl-2 family-regulated pathway | Antiapoptótico |
| NAIP | -1,43 | -1,14 | -1,07 | 1,87 | NLR family | Antiapoptótico |
| NFKB1 | -1,19 | 1,10 | 1,17 | 2,57 | NFkB signaling pathway | - |
| NFKB2 | -1,13 | 1,30 | 1,82 | 2,90 | NFkB signaling pathway | - |
| NFKBIA | -1,08 | 1,25 | 1,47 | 3,24 | NFkB signaling pathway | - |
| NFKBIB | 1,17 | 1,18 | 1,12 | 1,05 | NFkB signaling pathway | - |
| NFKBIE | -1,02 | 1,01 | 1,04 | 2,36 | NFkB signaling pathway | - |

| NFKBIZ | -1,85 | 1,21 | 2,34 | 1,41 | NFkB signaling pathway | |
|-----------|-------|-------|-------|--------|------------------------|----------------|
| NLRP1 | -1,62 | -1,05 | 1,14 | 1,20 | NLR family | Próapoptótico |
| NOD1 | 1,43 | 1,06 | 1,57 | 5,34 | NLR family | Próapoptótico |
| NOD2 | 1,64 | 1,42 | 2,24 | 4,59 | NLR family | - |
| PEA15 | 1,03 | 1,08 | -1,12 | 1,18 | Others | Antiapoptótico |
| PMAIP1 | -1,70 | -1,15 | -1,70 | -1,09 | Others | Próapoptótico |
| PYCARD | 1,12 | 1,23 | 1,09 | 2,52 | CARD family | Próapoptótico |
| RELA | -1,61 | 1,29 | -1,12 | 1,89 | NFkB signaling pathway | Antiapoptótico |
| RELB | 1,07 | 1,40 | 2,10 | 6,40 | NFkB signaling pathway | Antiapoptótico |
| REL | -1,17 | 1,27 | 1,23 | 1,64 | NFkB signaling pathway | Antiapoptótico |
| RIPK1 | -1,14 | 1,11 | 1,43 | -3,02 | Others | Antiapoptótico |
| RIPK2 | 1,04 | 1,13 | 1,18 | -37,04 | Others | Antiapoptótico |
| TBK1 | 1,25 | -1,00 | 1,36 | 1,04 | NFkB signaling pathway | |
| TNF | -1,28 | 1,29 | 1,36 | 1,55 | TNF and TNFR pathway | Próapoptótico |
| TNFRSF10A | -1,30 | -1,08 | 1,55 | 1,07 | TNF and TNFR pathway | Próapoptótico |
| TNFRSF10B | -1,23 | 1,04 | 1,70 | -1,81 | TNF and TNFR pathway | Próapoptótico |
| TNFRSF1A | -1,33 | 1,19 | -1,17 | -3,48 | TNF and TNFR pathway | Próapoptótico |
| TNFRSF1B | -1,36 | 1,04 | 1,31 | 3,66 | TNF and TNFR pathway | Antiapoptótico |
| TNFRSF21 | -2,62 | 1,03 | -2,38 | -3,69 | TNF and TNFR pathway | Próapoptótico |
| TNFRSF25 | -1,40 | -1,28 | 1,16 | -1,11 | TNF and TNFR pathway | Antiapoptótico |
| TNFSF10 | 1,41 | 1,30 | 1,38 | 1,73 | TNF and TNFR pathway | Próapoptótico |
| TRADD | 1,50 | 1,60 | 1,06 | 3,97 | TNF and TNFR pathway | Próapoptótico |
| XIAP | -1,27 | 1,16 | -1,41 | -3,97 | IAP family | Antiapoptótico |