

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.
	1. 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

Titulo 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 Margues 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 do 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- κB 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 PO1 e PO2 (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 PO1 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

μΙ	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 Member 7)	Marcador de linfócitos B de memória (Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily,	
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	
lgM	Imunoglobulina M	

lgG	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*	MCL1 apoptosis regulator, BCL2 family member	
MAP3K5*	'3K5* Mitogen-Activated Protein Kinase kinase kinase 5	
МАРК8*	APK8* Mitogen-Activated Protein Kinase 8	
МАРК9*	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	
РВМС	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 Disorders)	Distúrbios Imunológicos Primários Regulatórios (Primary Immune Regulatory	
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	D3 Paciente 3	
P03mother	'03mother Mãe do paciente 3	
PI	l lodeto de Propídio (<i>Propidium lodide</i>)	
RQ	Quantificação Relativa	
REL*	REL Proto-Oncogene, NF-KB Subunit	
RELA*	LA* v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A	
RELB*	LB* 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	
slgAD	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
-------	---------------------

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. IN	ITRODUÇÃO	19
2. O	BJETIVOS	24
2.1.	GERAL	24
2.2.	ESPECÍFICOS	24
3. N	IATERIAL E MÉTODOS	25
3.1.	SUJEITOS	25
3.2.	COLETAS DE SANGUE	25
3.3.	ESTUDO MOLECULAR	25
3.3.1.	EXTRAÇÃO DE DNA	25
3.3.2.	STE E ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA	25
3.3.3.	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)	26
3.3.4.	SEQUENCIAMENTO SANGER	26
3.3.5.	EXTRAÇÃO DO ÁCIDO RIBONUCLÉICO (RNA) TOTAL	27
3.3.6.	QUANTIFICAÇÃO, PUREZA E INTEGRIDADE DO RNA	27
3.3.7.	REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA (RT-PCR)	27
3.3.8.	EXPRESSÃO GÊNICA – PLACAS DE ARRANJO GÊNICO (<i>ARRAY</i>)	28
3.3.9.	QUANTIFICAÇÃO RELATIVA (RT-qPCR) – EXPRESSÃO GÊNICA ÚNICA (SINGLE GENE	24
EXPRE		34
3.4.		35
3.4.1.	EXPRESSÃO DA PROTEINA DE MEMBRANA CD267 (TACI)	35
3.4.2.		35
3.5.	DOSAGEM DE CITOCINAS NO PLASMA	35
3.5.1.		35
3.6.	ANALISE DE DADOS	36
4. R		36
4.1. IDENT	DESCRIÇAO CLINICA DOS PACIENTES COM MUTAÇAO GERMINATIVA EM <i>TNFRSF13B</i> IFICADA POR STE	36
4.2. CITOM	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA CD267 (TACI) EM LINFÓCITOS B ATRAVÉS D IETRIA DE FLUXO	A 37
4.3.	ANÁLISE DE APOPTOSE POR CITOMETRIA DE ELUXO	39
4.4.	EXPRESSÃO GÊNICA ARRAY VIA EXTRÍNSECA	40
4.5	EXPRESSÃO GÊNICA ARRAY VIA INTRÍNSECA E EXTRÍNSECA	43
4.6.	EXPRESSÃO GÊNICA ÚNICA (<i>SINGLE GENE EXPRESSION</i>)	52
4.7.	DOSAGEM DE CITOCINAS	55

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 humana¹.

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-21⁹. 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 ICV². 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 Receptor superfamily*) (OMIM ID 604907 - 18/10/2021)^{14; 19}.

A expressão de TACI varia em diferentes subpopulações de linfócitos B²⁰. 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 ICV².

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.; 2015²⁵ 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 ICV²⁵. A grande maioria dos pacientes com as mutações p.C104R e A181E são heterozigotos²⁹.

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 TNFR¹⁴. 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 BAFF²⁹ (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.





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 TACI²².



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 doença²⁵.

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 B³⁵. 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 tempo²².

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 porcessos 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 \leq 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 μ L contendo 100 ng de DNA; 0,4 μ L de dNTPs (catálogo: 11615-010; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc.); 3,0 μ L de solução tampão 10X (10X PCR Buffer); 0,6 μ L de cada primer; 1,2 μ l de MgCl2 e 0,2 μ L 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 (P01) e paciente 2 (P02) 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).

	Símbolo, nome aprovado	Função
1	ACTA1	Cell motility
	actin, alpha 1, skeletal muscle	
2	АСТВ	Cell motility
	actin, beta	
2	APAF1	Apoptosis induction by
5	apoptotic peptidase activating factor 1	CASP3 activation
1	BAX	Apoptosis induction by
-	BCL2-associated X protein	CASP3 activation
5	BCL2	Apontocic inhibition
	B-cell CLL/lymphoma 2	
6	BID	Anastasis industion
	BH3 interacting domain death agonist	Apoptosis induction
_	BIRC2	A construction for the first second
/	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		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	
	-	

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

	caspase 8	Most upstream protease of the activation cascade of caspases responsible for the FAS mediated and TNFRSF1A induced cell death	
13	CASP9	Involved in the activation cascade of caspases responsible for apoptosis execution	
14		Apoptosis regulator protein as FAS mediated apoptosis inhibitor	
	CASP8 and FADD like apoptosis regulator		
15	CHUK conserved helix-loop-helix ubiquitous	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]	
	DIABLO		
17	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	
	ІКВКВ		
21	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta	NFkB activator	
	IKBKG		
22	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	Stressed cell apoptosis promoter through TP53 and YAP1	
	MAPK9		
25		Stressed cell apoptosis promoter through TP53 and YAP1	
	mitogen-activated protein kinase 9		
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		
77		Subunit of the transcription factor NEVR	
21	gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)		
	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	
	PARP1		
31		DNA repair pathway initiation; apoptosis promoter in response to genotoxic stress	
	poly(ADP-ribose) polymerase 1		
32	v-rel avian reticuloendotheliosis viral	Subunit of the transcription factor NFkB	

oncogene homolog A

tumor necrosis factor 34 TNFRSF10A 34 tumor necrosis factor receptor superfamily member 10a 35 TNFRSF10B 35 tumor necrosis factor receptor superfamily member 10b 35 tumor necrosis factor receptor superfamily member 10b 36 TNFRSF10C 36 tumor necrosis factor receptor superfamily member 10c 36 TNFRSF10C 36 Decoy receptor for TNFSF10; apoptosis inhibitor 36 TNFRSF10D	3	
34 TNFRSF10A Receptor with death domain for TNFSF10; NFkB activator 34 tumor necrosis factor receptor superfamily member 10a Receptor with death domain for TNFSF10; NFkB activator 35 TNFRSF10B Receptor with death domain for TNFSF10; ER stress-induced apoptosis promoter; NFkB activator 35 tumor necrosis factor receptor superfamily member 10b Receptor with death domain for TNFSF10; ER stress-induced apoptosis promoter; NFkB activator 36 TNFRSF10C Decoy receptor for TNFSF10; apoptosis inhibitor 36 TNFRSF10D Decoy receptor for TNFSF10; apoptosis inhibitor		
TNFRSF10B Receptor with death domain for TNFSF10; ER stress-induced apoptosis promoter; 35 tumor necrosis factor receptor superfamily member 10b Receptor with death domain for TNFSF10; ER stress-induced apoptosis promoter; 36 TNFRSF10C Decoy receptor for TNFSF10; apoptosis inhibitor 36 tumor necrosis factor receptor superfamily member 10c Decoy receptor for TNFSF10; apoptosis inhibitor	Receptor with death domain for TNFSF10; NFkB activator	
 35 tumor necrosis factor receptor superfamily member 10b TNFRSF10C 36 tumor necrosis factor receptor superfamily member 10c TNFRSF10D 	tor	
TNFRSF10C 36 tumor necrosis factor receptor superfamily member 10c TNFRSF10D	NFkB activator	
36 tumor necrosis factor receptor superfamily Decoy receptor for TNFSF10; apoptosis inhibitor member 10c TNFRSF10D		
TNFRSF10D		
 tumor necrosis factor receptor superfamily Decoy receptor for TNFSF10; apoptosis inhibitor member 10d 		
TNFRSF1A Recentor with death domain for TNE and LTA (lymphotoxin alpha): NEkB activato	ator	
³⁸ tumor necrosis factor receptor superfamily apoptosis mediator, and inflammation regulator member 1A	utor,	
TNFRSF21		
39 tumor necrosis factor receptor superfamily Receptor with death domain; apoptosis promoter member 21		
TNFRSF25 Recentor with death domain for TNESE12: mediator of NEKB activation and		
40 tumor necrosis factor receptor superfamily apoptosis promoter member 25		
TNFRSF6B		
41 tumor necrosis factor receptor superfamily Decoy receptor for FASLG; apoptosis inhibitor member 6b		
TNFSF10		
 42 tumor necrosis factor superfamily member Cytokine ligand for TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF10C, and TNFRSF10D 10 	Cytokine ligand for TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF10C, and TNFRSF10D	
Tumor suppressor, growth arrest, or apoptosis promoter depending on the		
43 tumor protein p53 physiological circumstances and cell type		
TRAF2 Mediator of the antiapoptotic signals from TNF receptors; NFkB and JNK activatio	ation	
TNF receptor associated factor 2 regulator	regulator	

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

	Símbolo, nome aprovado	Função
1	BIRC2	Anontoris inhibition
	baculoviral IAP repeat containing 2	Apoptosis inhibition
2	APAF1	Apoptosis induction by
	apoptotic peptidase activating factor 1	CASP3 activation
3	BAD	Anontonis industion
	BCL2 associated agonist of cell death	Apoptosis induction
4	BAK1	Anontosis 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	BCI 2A1	
	BCI 2 Related Protein A1	Apoptosis inhibition
11	BCI211	
11		Apoptosis inhibition
	BCLZ LIKE I	
12	BCL2L10	Promotes cell survival Suppresses apontosis induced by RAX but not RAK
	BCI 2 Like 10	
13	BCL2L11	Apoptosis induction
	BCL2 Like 11	
14	BCL2L13	Apoptosis induction
	BCL2 Like 13	h.h
15	BCL2L14	Anontosis induction
	BCL2 Like 14	
16	BCL2L2	Dremetes cell survival
	BCL2 Like 2	
17	BCL3	Contributes to the regulation of transcriptional activation of NF-kappa-B
17	B Coll CI I / Ivmphoma 2	target genes.Contributes to the regulation of cell proliferation
10		
то	PU2 interacting domain death accorded	Apoptosis induction
	BH3 Interacting domain death agonist	
19	BIK	Accelerates programmed cell death
	BCL2 Interacting Killer	
20	NAIP	Anti-apoptotic protein which acts by inhibiting the activities of CASP3,
	NLR Family Apoptosis Inhibitory Protein	CASP7 and CASP9
21	BIRC3	
	baculoviral IAP repeat containing 3	Apoptosis inhibition
22	XIAP	
	X-Linked Inhibitor Of Apoptosis	Apoptosis inhibition
23	BIRC5	
20	Baculoviral IAP Repeat Containing 5	Apoptosis inhibition
	Bacaloviral IAF Repeat containing 5	
24	BIRC6	Anti-apoptotic protein which can regulate cell death by controlling
		inhibitor of CASP3. CASP7 and CASP9.
	Baculoviral IAP Repeat Containing 6	
		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
		activity
	Baculoviral IAP Repeat Containing 7	
26	BIRC8	Protects against apoptosis mediated by BAX
	Baculoviral IAP Repeat Containing 8	
27	BNIP3	Apoptosis-inducing protein that can overcome BCL2 suppression
	BCL2 Interacting Protein 3	
28	BNIP3L	
-	BCL2 Interacting Protein 3 Like	induces apoptosis.
29	BOK	
-	BOK, BCL2 Family Apoptosis Regulator	Apoptosis induction
30	NOD2	
50	Nucleotide Binding Oligomerization Domain	Involved in gastrointestinal immunity.
	Containing 2	5 • • •
31	NOD1	
	Nucleotide Binding Oligomerization Domain	Enhances caspase-9-mediated apoptosis.
	Containing 1	
32	CARD6	
52	Casnase Recruitment Domain Family Momber 6	
	cuspuse neurunnent bomain raining member o	
33	CARD9	Plays an important regulatory role in cell apontosis
	Caspase Recruitment Domain Family Member 9	
	CASP1	Induce cell apontosis and may function in various developmental stores
34		matter ten apoptosis and may function in various developmental stages.

	Caspase 1	
35	CASP10	Involved in the activation cascade of caspases responsible for apoptosis
	Caspase 10	execution.
36	CASP14	
	Caspase 14	Non-apoptotic caspase involved in epidermal differentiation.
37	CASP2	Involved in the activation cascade of caspases responsible for apoptosis
	caspase 2	execution
38	CASP3	Involved in the activation cascade of caspases responsible for apoptosis
	caspase 3	execution
39	CASP4	Plays a central role in the execution-phase of cell apoptosis.
	Caspase 4	· / · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
40	CASP5	Mediator of programmed cell death (apoptosis).
	Caspase 5	
41	CASP6	Involved in the signaling pathways of apoptosis, necrosis and
	Caspase 6	inflammation.
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
	caspase 8	for 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	
	CASP8 and FADD like apoptosis regulator	Apoptosis regulator protein as FAS mediated apoptosis inhibitor
47	СНИК	
	conserved helix-loop-helix ubiguitous kinase	Serine kinase. Essential role in the NFkB signaling pathway
48	CRADD	Apontatic adapter malagula specific for seconds 2 and EASU/TNE recentor
	CASP2 And RIPK1 Domain Containing Adaptor With	interacting protein RIP
	Death Domain	
49	DAPK1	Involved in multiple cellular signaling pathways that trigger cell survival,
	Death Associated Protein Kinase 1	apoptosis, and autophagy.
50	DEDD	A scaffold protein that directs CASP3 to certain substrates and facilitates
	Death Effector Domain Containing	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	
54	FADD	CASP8 and CASP10 apoptotic adaptor recruiter to activated FAS and
	Fas associated via death domain	
55	FAS	Receptor with death domain for FASLG
56	FASIG	
	Fas ligand	Cytokine ligand for FAS
57	HIP1	May act as a proapoptotic protein that induces cell death by acting
57	Huntingtin Interacting Protein 1	through the intrinsic apoptosis pathway
58	HRK	
50	Harakiri. BCL2 Interacting Protein	Promotes apoptosis.
50		
59	HIKAZ	Promotes or induces cell death
60		
60		Inhibits generation of IL-1-beta by interacting with caspase-1 and
	Caspase Recruitment Domain Family Member 18	preventing its association with RIP2.

61	IKBKB	
	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta	NFkB activator
62	IKBKE	
	Inhibitor Of Nuclear Factor Kappa B Kinase Subunit Epsilon	infection
63	IKBKG	
	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma	NFkB activator
		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.
65	LTA	This protein also mediates a large variety of inflammatory, immunostimulatory, and antiviral responses, is involved in the formation of secondary lymphoid organs during development and plays a role in aportoric
	Lymphotoxin Alpha	
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
	MCL1, BCL2 Family Apoptosis Regulator	maintenance of viability but not of proliferation.
68	NLRP1	Plays a crucial role in innate immunity and inflammation
	NLR Family Pyrin Domain Containing 1	riays a crucial role in finate infinitity and fination.
69	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)
70	NFKB2	
	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)	Subunit of the transcription factor NFkB
71	NFKBIA nuclear factor of kappa light polypeptidegene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	NFkB inhibitor
72	NEKBIB	
, -	NFKB Inhibitor Beta	Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm
72	NEVDIE	
/5	NEKB Inhibitor Epsilon	Inhibits NF-kappa-B by complexing with and trapping it in the cytoplasm.
74	NFKBIZ	Involved in regulation of NF-kappa-B transcription factor complexes.
	NFKB Inhibitor Zeta	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
75	PEA15	Inhibits both TNFRSF6- and TNFRSF1A-mediated CASP8 activity and
	Proliferation And Apoptosis Adaptor Protein 15	apoptosis.
76	PMAIP1	Promotes activation of caspases and apoptosis.
	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1	· · · · · · · · · ·
77	PYCARD	Eurotions as low modiator in anostosis and inflammation
	PYD And CARD Domain Containing	runctions as key mediator in apoptosis and inflammation.
78	REL	Proto-oncogene plays a role in the survival and proliferation of B
-	REL Proto-Oncogene, NF-KB Subunit	lymphocytes.
79	RELA	
	v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A	Subunit of the transcription factor NFkB
80	RELB RELB Proto-Oncogene, NF-KB Subunit	Is required for both T and B lymphocyte maturation and function
81	кичкі Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 1	pathogen recognition, and as part of developmental regulation.
82	RIPK2 Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 2	Plays an essential role in modulation of innate and adaptive immune responses.

83	ТВК1	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	Describen with death density for TNIFCF10, FD stress is durand an extension	
	tumor necrosis factor receptor superfamily _member 10b	promoter; NFkB activator	
87	TNFRSF1A	Recentor with death domain for TNE and LTA (lymphotoxin alpha): NE/R	
	tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A	activator, apoptosis mediator, and inflammation regulator	
88	TNFRSF1B	Mediates the recruitment of two anti-apoptotic proteins, c-IAP1 and c-	
	TNF Receptor Superfamily Member 1B	IAP2	
89	TNFRSF21	Dromotos apontosis	
	TNF Receptor Superfamily Member 21		
		Receptor for TNFSF12/APO3L/TWEAK. Interacts directly with the adapter	
90	TNFRSF25	TRADD. Mediates activation of NF-kappa-B and induces apoptosis. May	
	TNF Receptor Superfamily Member 25	play a role in regulating lymphocyte homeostasis.	
91	TNFSF10	Cutoking ligand for TNEPSE10A TNEPSE10B TNEPSE10C and TNEPSE10D	
	tumor necrosis factor superfamily member 10		
92	TRADD		
		The nuclear form acts as a tumor suppressor.	
	TNEPSE1A Associated Via Death Domain		

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 μ L de TaqMan[®] Gene Expression Master Mix (catálogo: 4369016; Thermo Fisher Scientific Inc.); 0,625 μ L do respectivo primer mix; 0,625 μ L de água livre de nuclease e 5 μ L contendo 10 ng de amostra de cDNA diluído em água livre de nucleases, resultando em um volume total de 12,5 μ L. Os experimentos foram realizados no equipamento Applied Biosystems StepOnePlusTM Real-Time PCR Systems (Thermo Fisher Scientific Inc.) utilizando-se o desvio padrão de Ct (*Cicle Threshold*) de 0,3.

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 $1x10^6$ células/mL. Transferimos 1×10^5 células para cada tubo de citometria. Em seguida, adicionamos 3μ L de Anexina V e 3μ L de lodeto de Propídio (PI, *Propidium Iodide*), homogeneizados e incubados por 15 min em temperatura ambiente, protegido da luz. Finalmente, adicionamos 300μ L 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 ρg/mL para IL-2; 0,12 pg/mL para IL-5; 0,11 ρg/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 P02, 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 PO2 que apresentou alta expressão de CD267 (MFI=794), porém mostrou % de linfócito B de memória inferior a PO3, PO1 Mother, PO2 Mother, PO3 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 PO2 x PO3: p=0,0337; PO2 x PO2 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 P01, 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.



■ % Viable ■ % Initial apoptosis ■ % Late apoptosis or necrosis ■ % Necrosis

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 \ge 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 \le -2).

Embora carreguem a mesma mutação em TNFRSF13B, o perfil de expressão é diferente. Pois 35% dos genes no paciente PO1 são hipoexpressos ou muito hipoexpressos, enquanto no paciente PO2, temos apenas 21% com esse perfil. No paciente PO2 aproximadamente 73% dos genes apresentam expressão normal, enquanto no PO1, 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 \ge 2), hiperexpresso (1,99 \ge FC \ge 1,5), expressão normal (1,49 \ge FC \ge 0,67), hipoexpresso (-1,5 \le FC \ge -1,99) e muito hipoexpresso (FC \le 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 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 PO1 muito hipoexpresso e PO2 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 PO1; e CASP3 (Caspase 3) foi muito hiperexpressos e CASP7 (Caspase 7) foi hiperexpressos para PO1 (tabela 5 e 6 e anexo 1).

Entre os genes da cascata de sinalização MAPK, o gene *MAP3K5* (*Mitogen-Activated Protein 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 P01 e *NGFR*, *RELA* também com hipoexpressão e muita hipoexpressão respectivamente para P02. É importante notar que a expressão de *RELA* no paciente P02 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 PO2 (tabela 5 e 6 e anexo 1).



P01 x P02 (SRL+)

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 P01 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 96well 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 PO1 e PO2 (SRL+), o perfil é semelhante ao ensaio anterior da via extrínseca. PO1 tem uma quantidade maior de genes desregulados (34,4%) em relação à PO2 (SRL+) (12,6%). Há uma incidência maior de genes hipoexpressos ou muito hipoexpressos no PO1 (18%) do que em PO2 (SRL +) (3%) (tabela 7).

	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%)

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.

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 \ge 2), hiperexpresso (1,99 \ge FC \ge 1,5), expressão normal (1,49 \ge FC \ge 0,67), hipoexpresso (-1,5 \le FC \ge -1,99) e muito hipoexpresso (FC \le 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, NFKBIA, 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, 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 hipoexpressos. 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 NFĸB, 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 NFĸB, 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*, *CASP8*, *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 P01, porém FASLG hipoexpresso e TNFRSF21 muito hipoexpresso. FASLG apresentou-se muito hipoexpresso em P02 com ou sem a droga, entretanto TRADD mostrou-se desregulado (hiperexpresso) apenas em P02 (SRL+). Semelhante ao P01, o P02 apresentou TNFRSF21 com expressão muito baixa. Dois outros genes foram muito hiperexpressos em P02 são TNFRSF10A e TNFRSF10B. Quando observamos o perfil de P03 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 P01 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 pathway	0	1	12	0	1
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 P03 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*, *BCL2L1*, *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 PO2 (SRL +) com PO1 e PO3 (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), *CARD6* (muito hipoexpresso), *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 PO1 x PO2 x PO3 (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).





A)

C)

E)

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.

71%

29%

NIR Family

% concordant

21%

79%

NIR Family

% concordant

IAP Family

1AP Family

others

36%

64%

others

100%

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 PO1, que apresenta o fenótipo moderado, mostrou a expressão deste gene hipoexpresso (figura 14).





Genes próapoptóticos





















CASP2

Genes antiapoptóticos





Gene próapoptótico e antiapoptótico

BIRC8





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 PO1 apresentou baixa dosagem de IL-8, o que diferiu significativamente dos controles (*P* = 0,0079) e da mãe (PO1 Mother) (*P* = 0,0282). Níveis inferiores ao esperado também ocorreram com PO2 na dosagem de IL-2, que diferiu significativamente do grupo controle (*P* = 0,0167), de PO3 (*P* = 0,0235), além da própria mãe (PO2 Mother) (*P* = 0,0235). Por fim, IL-5, em que PO1 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 indivíduos²⁵. 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 slgAD, 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 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 P01, e apenas 29% em P02 (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 PO2 (SRL+) e PO2, revelou que o SRL exerce um papel relevante nas vias da apoptose. PO2 (SRL+) mostrou redução de 50% no número de genes desregulados (12,6%) em relação a PO2 (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, P01 apresentou dez genes (*BAD, BAK1, BCL2L11, BCL2L13, BCL2L14, BNIP3L, CASP7, DEDD, FAS* e *TRADD*), P02 oito genes (*BAX, BCL2L11, BCL2L13, BNIP3L, CASP9, NOD1, TNFRSF10A* e *TNFRSF10B*) e P03, 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 P01, seis genes (*BOK, CARD6, DAPK1, DIABL0, FASLG, PMAIP1* e *TNFRSF21*) em P02, e 12 (*BAK1, BCL10, BNIP3, CARD6, CASP3, CASP4, CASP5, CASP8AP2, CASP8, TNFRSF10B, TNFRSF1A* e *TNFRSF21*) em P03. Ao contrário, quatro genes antiapoptóticos (*BCL2L1, BIRC2, BIRC5* e *BIRC8*) com elevada expressão foram identificados no P01, apenas um gene (*BIRC3*) em P02, e 11 genes (*BBC3, BCL3, BIRC5, BIRC6, CFLAR, LRDD, NAIP, RELA, RELB, REL* e *TNFRSF1B*) em P03. Genes antiapoptóticos com baixa expressão também foram identificados, sendo cinco (*BCL2A1, BCL2, BIRC3, BIRC5, BIRC6, CFLAR, LRDD, NAIP, RELA, RELB, REL* e *TNFRSF1B*) em P03. Genes antiapoptóticos com baixa expressão também foram identificados, sendo cinco (*BCL2A1, BCL2, BIRC3, BIRC5, BIRC6, CFLAR, LRDD, NAIP, RELA, RELB, REL* e *TNFRSF1B*) em P03. Genes antiapoptóticos com baixa expressão também foram identificados, sendo cinco (*BCL2A1, BCL2, BIRC3, BIRC5, BIRC6, CFLAR, LRDD, NAIP, RELA, RELB, REL* e *TNFRSF1B*) em P03. Genes antiapoptóticos com baixa expressão também foram identificados, sendo cinco (*BCL2A1, BCL2, BIRC3, BIRC6, CFLAR, LRDD, NAIP, RELA, RELB, REL* e *TNFRSF1B*) em P03. Genes antiapoptóticos com baixa expressão também foram identificados, sendo cinco (*BCL2A1, BCL2, BIRC3, BIRC6, CFLAR*) em P03 (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 P02 da comparação e incluímos P02 (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 P02 SRL+ apresenta concordância com P01 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 P03, a concordância de P02 (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 P02 a ter expressão de alguns genes similar aos P01 e P03. Nos chama a atenção a maior concordância entre P01 e P03 na baixa expressão dos genes próapoptóticos BCL10, CASP5 e CASP8 enquanto entre P01 e P02 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 PO1 é mais baixa do que nos demais, porém em PO3 é alta (figura 14). Era esperado que PO2 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, PO3, o qual apresentou hiperexpressão no *array*, também apresentou junto com PO2 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 mediado nor 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 P02, observamos que o SRL parece agir reduzindo a sua expressão e como consequência temos linfoproliferação. Ao contrário, em P03, 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 (P02 (SRL+)) e também em P01 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 em P02 (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; <u>https://www.genecards.org/</u>) 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 B⁶³. 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; <u>https://www.genecards.org/</u>). 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-2⁶⁵ e IL10⁶³. 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 P02 (SRL+) (figura 15), provocou redução da expressão de BLC2, sendo P01 hipoexpresso e P02

(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, PO1 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 Fas⁷⁰. Em nosso estudo encontramos este gene hiperexpresso em ambos os pacientes com fenótipo de linfoproliferação, PO1 e PO2 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 PO1 e PO2.

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 PO1 refletiu em baixa expressão de TACI (TNFRSF13B). Contudo, em relação aos controles, a diferença na expressão de TACI não foi significativa. Embora PO2 tenha mostrado alta expressão de *TNFSRF13B* em ambas as análises e PO3 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 PO1 e PO3 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

- ¹ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18424338</u> >.
- ² 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27250108</u> >.
- ³ JANEWAY, C. A.; APT, L.; GITLIN, D. Agammaglobulinemia. Trans Assoc Am Physicians, v. 66, p. 200-2, 1953. ISSN 0066-9458. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13136263</u> >.
- ⁴ GITLIN, D.; JANEWAY, C. A. Agammaglobulinemia, congenital, acquired and transient forms. **Prog Hematol**, v. 1, p. 318-29, 1956. ISSN 0079-6301. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13359516</u> >.
- ⁵ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17492055</u> >.
- ⁶ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18692715</u> >.
- 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 >.
- ⁸ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16899196</u> >.
- ⁹ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26795881</u> >.
- ¹⁰ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26122175</u> >.

- ¹¹ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27379089</u> >.
- ¹² 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28236292</u> >.
- ¹³ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22983507</u> >.
- ¹⁴ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18981294</u> >.
- ¹⁵ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16920573</u> >.
- ¹⁶ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29867916</u> >.
- ¹⁸ 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 >.
- ¹⁹ 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: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18978466</u> >.
- 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 >.

- ²¹ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16007087</u> >.
- ²² 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17983875</u> >.
- ²³ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16264328</u> >.
- 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23465663</u> >.
- ²⁵ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25866827</u> >.
- ²⁶ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26100089</u> >.
- 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 >.
- ²⁸ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12110144</u> >.
- ²⁹ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20889194</u> >.
- ³⁰ FRIED, A. J. et al. Functional analysis of transmembrane activator and calciummodulating 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21419480</u> >.

- ³¹ 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 >.
- ³² 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: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26727773</u> >.
- ³³ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25723853</u> >.
- ³⁴ 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 >.
- ³⁵ 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: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19629655</u> >.
- ³⁶ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17571082</u> >.
- ³⁷ 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: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20832369</u> >.
- ³⁸ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33333111</u> >.
- ⁴⁰ 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 >.

- ⁴¹ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22312429</u> >.
- ⁴² 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19451168</u> >.
- ⁴³ 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. <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22090/</u>: New York: W. H. Freeman, 2000. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22090/</u> >.

- ⁴⁵ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32067110</u> >.
- ⁴⁶ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15632210</u> >.
- 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21815909</u> >.
- 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 >.
- ⁴⁹ 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 >.
- ⁵⁰ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29114388</u> >.

- ⁵¹ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7554385</u> >.
- ⁵² 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10403927</u> >.
- ⁵³ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11472434</u> >.
- ⁵⁴ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23738704</u> >.
- ⁵⁵ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28192157</u> >.
- ⁵⁶ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30363050</u> >.
- ⁵⁷ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28424702</u> >.
- ⁵⁸ 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 >.
- ⁵⁹ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7585627</u> >.
- ⁶⁰ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33043006</u> >.

- ⁶¹ AUBREY, B. J. et al. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53mediated tumour suppression? **Cell Death Differ,** v. 25, n. 1, p. 104-113, 01 2018. ISSN 1476-5403. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29149101</u> >.
- ⁶² 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24379683</u> >.
- ⁶³ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7722292</u> >.
- ⁶⁴ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2250705</u> >.
- ⁶⁵ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8460122</u> >.
- ⁶⁶ 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 >.
- ⁶⁷ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32058934</u> >.
- 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29527328</u> >.
- ⁶⁹ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23790005</u> >.
- ⁷⁰ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390657</u> >.
- ⁷¹ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9393856</u> >.
- ⁷² 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10381655</u> >.
- 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 >.
- ⁷⁴ 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 >.
- ⁷⁵ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16734615</u> >.
- ⁷⁶ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26990581</u> >.
- 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 >.
- ⁷⁸ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30843876</u> >.
- ⁷⁹ 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 >.
- ⁸⁰ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18980965</u> >.
- ⁸¹ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31957700</u> >.

- 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 >.
- ⁸³ 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7743552</u> >.
- 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 >.
- ⁸⁵ MAINOU-FOWLER, T. et al. Interleukin-5 (IL-5) increases spontaneous apoptosis of Bcell 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: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7919349</u> >.
- ⁸⁶ 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

Γ

	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
ІКВКВ	-1.63	-1.37	NFkB signaling pathway	-

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

ІКВКС	1,22	1,16	NFkB signaling pathway	-
MAP3K5	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

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
ВІК	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
ВОК	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
CASP10	-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
СНИК	-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
ІКВКВ	-1,16	-1,01	-1,05	-1,36	NFkB signaling pathway	-
ІКВКЕ	-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