



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

THAÍS DE ANDRADE EUGÊNIO QUINTEIRO

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA SINALIZAÇÃO DE
RECEPTORES TOLL-LIKE EM PACIENTES COM AGAMAGLOBULINEMIA
LIGADA AO CROMOSSOMO X

CAMPINAS
2023

THAÍS DE ANDRADE EUGÊNIO QUINTEIRO

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA SINALIZAÇÃO DE
RECEPTORES TOLL-LIKE EM PACIENTES COM AGAMAGLOBULINEMIA
LIGADA AO CROMOSSOMO X

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

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCELO TEOCCHI

COORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA MARLUCE DOS SANTOS VILELA

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA THAÍS DE
ANDRADE EUGÊNIO QUINTEIRO, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. MARCELO TEOCCHI.

CAMPINAS

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Eu44a Eugênio, Thaís de Andrade, 1991-
Análise da expressão de genes envolvidos na sinalização de receptores Toll-like em pacientes com Agamaglobulinemia ligada ao cromossomo X / Thaís de Andrade Eugênio Quinteiro. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Marcelo Teocchi.
Coorientador: Maria Marluce dos Santos Vilela.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Agamaglobulinemia. 2. Linfócitos B. 3. Síndromes de imunodeficiência. 4. Receptores Toll-like. 5. Expressão gênica. 6. Inflamação. I. Teocchi, Marcelo, 1980-. II. Vilela, Maria Marluce dos Santos, 1947-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Analysis of Toll-like receptor signaling pathway gene expression in patients with X-linked Agamaglobulinemia

Palavras-chave em inglês:

Agamaglobulinemia
B lymphocytes
Immunologic deficiency syndromes
Toll-like receptors
Gene expression
Inflammation

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Títuloção: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Marcelo Teocchi [Orientador]
Pérsio Roxo Júnior
Fernando Augusto de Lima Marson

Data de defesa: 29-09-2023

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

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0009-0000-0847-5535>

- Currículo Lattes do autor: <https://lattes.cnpq.br/6837107582441875>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO
THAÍS DE ANDRADE EUGÊNIO QUINTEIRO

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCELO TEOCCHI

COORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA MARLUCE DOS SANTOS VILELA

MEMBROS

1. PROF. DR. MARCELO TEOCCHI

2. PROF. DR. FERNANDO AUGUSTO DE LIMA MARSON

3. PROF. DR. PÉRSIO ROXO JÚNIOR

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: 29/09/2023

Dedico aos meus amados pais, Antônio Carlos e Luciene, meus maiores
conselheiros e incentivadores.

Muito obrigada!

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.”

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A Deus pela vida e saúde,

À Profa. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela pela confiança, por dividir valiosos ensinamentos ao longo desse trabalho, resultados da paixão e respeito pela profissão. Aprendi muito com a senhora. Muito obrigada!

Ao meu querido Professor Dr. Marcelo Teocchi pela orientação, confiança e paciência. Um exemplo de empenho em tudo na vida. Obrigada por tudo e pela amizade!

Aos meus amados pais Antônio e Luciene pelo incentivo em todos os momentos,

A todos que contribuíram, de modo direto ou indireto, para o desenvolvimento deste trabalho e processo de aprendizagem.

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

À equipe do Ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Hospital de Clínicas da Unicamp e a todos os profissionais pela contribuição nesta pesquisa.

Aos funcionários do CIPED, que sempre me auxiliaram desde o meu estágio em biomedicina. Dentre eles as meninas da limpeza, estagiários, técnicos, enfermeira, biólogistas, equipe de administração, etc., por todo o auxílio.

Às amigadas geradas no Laboratório de Imunologia Pediátrica,

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

Ao Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD) e ao Laboratório Multiusuário – FCM.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro, processo nº #2011/50589-5 e #2012/06194-9.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pelo financiamento da minha bolsa de estudos - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A agamaglobulinemia ligada ao X (XLA) é uma imunodeficiência primária ou erro inato da imunidade com herança ligada ao cromossomo X, caracterizada principalmente por susceptibilidade aumentada a infecções em um quadro de hipogamaglobulinemia ou agamaglobulinemia e grave redução no número de linfócitos B CD19+. É causada por variantes patogênicas em *Bruton tyrosine kinase* (BTK), cuja proteína é fundamental para maturação dos linfócitos B nos estágios de célula pré-B na medula óssea. A amplitude e gravidade das manifestações clínicas, que também incluem distúrbios autoinflamatórios e autoimunes, são incompreendidas até o momento em virtude das inúmeras funções de BTK e da heterogeneidade de suas variantes, já que nenhuma mutação única representa mais de 3% dos pacientes. Além disso, mutações *missense* parecem impactar mais gravemente os pacientes com XLA. Assim, uma vez que BTK regula negativamente os receptores Toll-like (TLRs) – importantes sensores da modulação da resposta inflamatória – objetivamos identificar alvos gênicos críticos envolvidos na fisiopatologia molecular da XLA pela expressão seletiva da via de sinalização dos TLRs. Através da RT-qPCR, a quantificação de dez genes foi efetuada a partir de células mononucleares do sangue periférico de oito pacientes com XLA (três deles portadores de mutações *missense* de BTK; e cinco, *nonsense*) e 17 indivíduos saudáveis pareados por idade. *BTK*, *IRAK2*, *PIK3R4*, *REL*, *TFRC* e *UBE2N* foram predominantemente hiperexpressos enquanto *RIPK2*, *TLR3*, *TLR10*, hipoexpressos, com *TLR6* regulado positivamente. O grupo dos pacientes *missense* revelou uma possível assinatura de expressão gênica caracterizada pela significativa diminuição da expressão de *IRAK2*, *PIK3R4*, *REL* e *TFRC*, e expressão positiva de *TLR3* e/ou *TLR6*. A hipoexpressão de *TLR3*, *TLR6* e *TLR10* pode estar associada a uma maior suscetibilidade a infecções bacterianas ou virais, enquanto sua hiperexpressão pode estar envolvida na suscetibilidade a condições inflamatórias crônicas, como artrite ou doença inflamatória intestinal.

Palavras-Chave: Agamaglobulinemia, Linfócitos B, imunodeficiência humoral, Receptores Toll-like, Expressão gênica, inflamação.

ABSTRACT

X-linked agammaglobulinemia (XLA) is a primary immunodeficiency or innate error of immunity with X-linked inheritance, characterized mainly by increased susceptibility to infections in the context of hypogammaglobulinemia or agammaglobulinemia and severe reduction in the number of CD19⁺ B lymphocytes. It is caused by pathogenic variants in Bruton tyrosine kinase (BTK), whose protein is crucial for the maturation of B lymphocytes at the pre-B cell stages in the bone marrow. The breadth and severity of clinical manifestations, which also include autoinflammatory and autoimmune disorders, are not yet fully understood due to the numerous functions of BTK and the heterogeneity of its variants, as no single mutation accounts for more than 3% of patients. Additionally, missense mutations appear to have a more severe impact on XLA patients. Therefore, since BTK negatively regulates Toll-like receptors (TLRs) - important sensors of inflammatory response modulation - we aimed to identify critical gene targets involved in the molecular pathophysiology of XLA through selective expression of the TLR signaling pathway. Using RT-qPCR, the quantification of ten genes was performed from peripheral blood mononuclear cells of eight XLA patients (three of them carrying missense mutations in *BTK*; and five, nonsense) and 17 age-matched healthy individuals. *BTK*, *IRAK2*, *PIK3R4*, *REL*, *TFRC*, and *UBE2N* were predominantly overexpressed, while *RIPK2*, *TLR3*, *TLR10* were underexpressed, with *TLR6* being positively regulated. The missense patient group revealed a possible gene expression signature characterized by a significant decrease in the expression of *IRAK2*, *PIK3R4*, *REL*, and *TFRC*, and positive expression of *TLR3* and/or *TLR6*. The underexpression of *TLR3*, *TLR6*, and *TLR10* may be associated with increased susceptibility to bacterial or viral infections, while their overexpression may be involved in susceptibility to chronic inflammatory conditions such as arthritis or inflammatory bowel disease.

Key words: Agammaglobulinemia, B lymphocytes, humoral immunodeficiency, Toll-like receptors, Gene expression, inflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1, proteína ativadora-1 (*activating protein-1*);

ARA, agamaglobulinemia autossômica recessiva (*autosomal recessive agammaglobulinemia*);

BTK, tirosina quinase de Bruton (*Bruton tyrosine kinase*);

CHUK, *component of inhibitor of nuclear factor kappa B kinase complex*;

CVID, imunodeficiência variável comum (*common variable immunodeficiency*);

ER, retículo endoplasmático;

HCT, transplante alogênico de células hematopoiéticas (*hematopoietic cell transplantation*);

HTI, hipogamaglobulinemia transitória da infância;

IBD, doença inflamatória intestinal (*inflammatory bowel disease*);

IEI, erro inato da imunidade (*inborn error of immunity*);

IFN, interferon;

IgA, imunoglobulina A;

IgG, imunoglobulina G;

IgM, imunoglobulina M;

IgRT, terapia de reposição com imunoglobulina (*immunoglobulin replacement therapy*);

IL, interleucina;

IL-1, interleucina 1;

IRAK, quinase associada ao receptor de interleucina 1 (*interleukin 1 receptor associated kinase*);

IRFs, fatores reguladores de interferon (*interferon regulatory factors*);

IVIG, imunoglobulina intravenosa (*intravenous immunoglobulin*);

KRECs, círculos de excisão de recombinação de deleção de imunoglobulina kappa (*immunoglobulin kappa-deleting recombination excision circles*);

LLA, leucemia linfoblástica aguda;

LPS, lipopolissacarídeos;

MAP3K7, *mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7*;

MAPKs, *mitogen-activated protein kinases*;

MDCs, células dendríticas mieloides (*myeloid dendritic cells*);

MoAbs, anticorpos monoclonais;

MyD88, *MYD88 innate immune signal transduction adaptor*;

NF-κB, fator nuclear para o potencializador da cadeia leve kappa nas células B (*nuclear factor (NF) for the kappa (k) light chain enhancer in B cells*);

NK, *natural killer*;

PAD, imunodeficiência humoral primária (*primary antibody deficiencies*);

PAMPs, padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*);

PBMCs, células mononucleares do sangue periférico (*peripheral blood mononuclear cells*);

PCR, reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*);

PDCs, células dendríticas plasmocitoides (*plasmacytoid dendritic cells*);

PH, homologia pleckstrina (*pleckstrin homology*);

PID, imunodeficiência primária (*primary immunodeficiency*);

PRR, receptores de reconhecimento de padrão (*pattern recognition receptor*);

PTKs, proteínas tirosina quinases (*protein tyrosine kinases*);

pTyr, tirosina fosforilada (*tyrosine-phosphorylated*);

RNA_m, RNA mensageiro;

SCID, imunodeficiência combinada grave (*severe combined immunodeficiency*);

SCIG, imunoglobulina subcutânea (*subcutaneous immunoglobulin*);

SH2, homologia Src 2 (*Src homology 2*);

SH3, homologia Src 3 (*Src homology 3*);

SNC, sistema nervoso central;

SOCS, supressor de proteínas de sinalização de citocinas (*suppressor of cytokine signaling*);

SPP1, fosfoproteína 1 secretada (*secreted phosphoprotein 1*);

TBK1, *tank-binding kinase 1*;

TCAR, tomografia computadorizada de alta resolução;

TGF, *transforming growth factor*;

TH, homologia Tec (*Tec homology*);

Th1, T *helper* tipo 1;

Th2, T *helper* tipo 2;

TICAM, domínio TIR contendo o adaptador indutor de IFN-beta (*TIR domain containing adaptor molecule*);

TIR, *Toll-interleukin 1 receptor*;

TIRAP, proteína adaptadora contendo domínio TIR (*TIR domain containing adaptor protein*);

TK, tirosina quinase (*tyrosin kinase*);

TLRs, receptores toll-like (*toll-like receptors*);

TNF, fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor*);

TRAF, fator associado ao receptor de TNF (*TNF receptor associated factor*);

TRECs, círculos de excisão de receptores de células T (*T-cell receptor excision circles*);

UNC93B1, *unc-93 homolog B1, TLR signaling regulator*;

WAO, Organização Mundial de Alergia (*World Allergy Organization*);

XLA, agamaglobulinemia ligada ao cromossomo X ou agamaglobulinemia ligada ao X (*X-linked agammaglobulinemia*).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Agamaglobulinemia ligada ao cromossomo X	15
1.1.1. Genética e fisiopatologia	15
1.1.2. Apresentação e manifestações clínicas.....	16
1.1.2.1. Infecções bacterianas	18
1.1.2.2. Infecções virais, fúngicas e parasitárias	20
1.1.2.3. Neoplasias.....	21
1.1.2.4. Autoimunidade e doença inflamatória	21
1.1.3. XLA atípica.....	21
1.1.4. Achados laboratoriais	22
1.1.5. Diagnóstico.....	23
1.1.6. Triagem neonatal.....	24
1.1.7. Detecção de portador	25
1.1.8. Diagnóstico diferencial.....	26
1.1.9. Indicações para encaminhamento, avaliação inicial e gestão clínica	27
1.1.10. Terapia de reposição de imunoglobulina e antibiótica	27
1.1.11. Medidas para evitar o contágio.....	28
1.1.12. Monitoramento do estado pulmonar	29
1.1.13. Transplante de células hematopoiéticas e terapia gênica para XLA.....	29
1.1.14. Prognóstico.....	30
1.2. Receptores toll-like (RTLs).....	30
1.2.1. Estrutura e função dos TLRs	32
1.2.2. Distribuição celular e tecidual.....	33
1.2.3. Sinalização	34
1.2.4. Regulação	34
1.2.5. Respostas celulares induzidas por TLRs.....	35
2. OBJETIVOS.....	37
2.1. Objetivos específicos	37
3. MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
3.1. <i>Dysregulation of TLR Signaling-Associated Gene Expression in X-linked Agamaglobulinemia: Implications for Clinical Phenotypes and Therapeutic Target</i> 38	
3.1.1. <i>Title Page</i>	38
3.1.2. <i>Abstract</i>	38
3.1.3. <i>Introduction</i>	39
3.1.4. <i>Methods</i>	41
3.1.4.1. <i>Subjects</i>	41

3.1.4.2. Experiments.....	41
• Gene expression by Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR).....	41
• Total RNA extraction from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and complementary DNA (cDNA) synthesis.....	41
• Absolute and relative quantifications	42
3.1.4.3. Data analyses.....	42
3.1.5. Results.....	43
3.1.5.1. Single gene expression	43
3.1.6. Discussion.....	45
3.1.7. Acknowledgements	49
3.1.8. List of abbreviations	49
3.1.9. Conflict of interest.....	49
3.1.10. Funding	50
3.1.11. Figures and Tables.....	51
3.1.12. References.....	55
4. REFERÊNCIAS	60
5. APÊNDICES.....	72
6. ANEXOS	79

1. INTRODUÇÃO

1.1. Agamaglobulinemia ligada ao cromossomo X

A agamaglobulinemia ligada ao cromossomo X (XLA, do inglês, *X-linked agammaglobulinemia*; OMIM 300300) ou simplesmente agamaglobulinemia ligada ao X é uma imunodeficiência primária (PID, *primary immunodeficiency*) ou erro inato da imunidade (IEI, *inborn error of immunity*) categorizada como uma imunodeficiência humoral primária (PAD, *primary antibody deficiencies*) [1]. É causada por variantes patogênicas em uma proteína de transdução de sinal chamada tirosina quinase de Bruton (BTK, *Bruton tyrosine kinase*) [2, 3]. Os pacientes sintomáticos geralmente manifestam importante hipogamaglobulinemia ou agamaglobulinemia e a quase ausência de linfócitos B CD19+. Apresentam suscetibilidade aumentada à infecção, normalmente notada pela primeira vez em bebês do sexo masculino entre três e 18 meses de idade [4- 7]. Estudos moleculares capazes de reconhecer uma variante patogênica em *BTK* confirmam o diagnóstico [8]. A base do tratamento para a XLA é a terapia de reposição com imunoglobulina (IgRT, *immunoglobulin replacement therapy*) [8-10].

Com relação à epidemiologia, a estimativa da incidência ou prevalência da XLA é incompleta porque a doença é rara e a triagem populacional/neonatal não é realizada. No entanto, os resultados de um registro dos Estados Unidos da América de pacientes com XLA forneceram uma estimativa mínima de aproximadamente um (1) em 379.000 nascidos vivos (um em 190.000 nascimentos do sexo masculino) [4, 5].

1.1.1. Genética e fisiopatologia

A XLA é causada por variantes patogênicas em *BTK*, gene localizado na porção média do braço longo do cromossomo X (Xq22.1) e nomeado em homenagem ao clínico que descreveu o primeiro caso em 1952 [2, 3, 8, 11]. Tal gene é composto por 21 éxons e pertence à família Tec de proteínas tirosina quinases (PTKs, *protein tyrosine kinases*) citoplasmáticas (ou não receptoras). As proteínas Tec geralmente têm um domínio N-terminal de homologia pleckstrina (PH, *pleckstrin homology*), seguido por um domínio de homologia Tec (TH, *Tec homology*), um domínio de homologia Src 3 (SH3, *Src homology 3*), um domínio SH2 e um domínio catalítico (TK, *tyrosin kinase*). Assim, são cinco os domínios conservados na BTK: PH, TH, SH3, SH2 e TK [6, 12- 14].

O domínio PH da BTK se liga ao fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato e responde à sinalização via fosfatidilinositol 3-quinase. A descoberta de uma mutação patogênica em um

resíduo crítico de arginina no domínio PH da BTK confirmou o envolvimento deste no processo de ancoragem de membrana [15]. Os domínios SH3 interagem com ligantes ricos em prolina com afinidade e seletividade moderadas. São domínios de interação proteica e desempenham papéis versáteis e diversos, que incluem a regulação enzimática, sendo capazes de alterar a localização de componentes subcelulares da via de sinalização e mediar a formação de conjuntos de complexos multiproteicos [16].

Em geral, os domínios SH2 estão envolvidos na transdução de sinal. Eles normalmente interagem com ligantes que contêm tirosina fosforilada (pTyr, *tyrosine-phosphorylated*) por meio de dois bolsões de superfície, uma pTyr e um bolsão de ligação hidrofóbico, permitindo que proteínas com domínios SH2 se localizem em sítios de pTyr [17]. Já as PTKs catalisam a transferência do grupo gama-fosforil do ATP para resíduos de tirosina em substratos proteicos. Elas têm similaridade com as quinases Src pelo fato de conterem domínios de interação de proteína de homologia Src (SH3, SH2) N-terminal para o domínio catalítico de TK [18].

A BTK é expressa em todos os estágios de desenvolvimento da linhagem de células B, bem como em células mieloides e eritroides [13, 19]. Dentre suas diversas funções, um dos seus principais papéis está na promoção da expansão de células pré-B no estágio pré-B1 para pré-B2 [6]. Como consequência da falha no desenvolvimento de células B, os pacientes afetados por uma variante patogênica em *BTK* têm quantidade significativamente reduzida de linfócitos B teciduais e periféricos, incapazes de gerar células plasmáticas. Dessa forma, apresentam níveis extremamente diminuídos de todas as classes de imunoglobulinas e respostas humorais marcadamente defeituosas [5, 6, 8, 20, 21]. Portanto, os pacientes com XLA são muito suscetíveis a infecções por bactérias encapsuladas e certos vírus difundidos pelo sangue [5, 6, 8, 20-23], o que reflete a importante função humoral na opsonização de bactérias encapsuladas e neutralização de enterovírus.

O comprometimento também é observado nas respostas das células T de memória a bactérias colonizadoras da mucosa (por exemplo, *Neisseria meningitidis*), mas não a patógenos respiratórios obrigatórios (por exemplo, vírus influenza) [24]. O repertório de células T é alterado em comparação com pessoas sem defeitos imunológicos (imunocompetentes), evidenciando diversidade restrita [25].

1.1.2. Apresentação e manifestações clínicas

Existe apenas um achado físico característico da XLA, que é a ausência ou quase ausência de amígdalas e adenoides, ambas ricas em células B [6, 22]. Infecções bacterianas

recorrentes, especialmente das vias aéreas, estão entre as manifestações mais comuns da XLA [6, 26].

As infecções recorrentes, apresentadas pela maioria dos pacientes, têm um papel preponderante no diagnóstico, embora alguns sejam diagnosticados em um estágio anterior devido a uma história familiar positiva [5]. Contudo, dois terços dos pacientes, mesmo com histórico familiar positivo, não são diagnosticados no nascimento ou logo após, mas sim depois de apresentarem manifestações clínicas. Na Itália, o diagnóstico de XLA foi semelhante entre casos esporádicos e familiares (67 meses e 64 meses, respectivamente) [27]. Uma pesquisa da Organização Mundial de Alergologia (WAO, *World Allergy Organization*) que incluiu 783 pacientes com XLA de 40 centros em todo o mundo revelou um atraso entre as manifestações clínicas e o diagnóstico superior a 24 meses em mais de um terço dos centros participantes [28].

O recém-nascido a termo com XLA é protegido pela imunoglobulina G (IgG) materna que é ativamente transportada através da placenta durante o último trimestre da gravidez. A hipogamaglobulinemia e uma maior suscetibilidade à infecção se desenvolvem à medida que a IgG adquirida pela mãe é catabolizada após o nascimento e o bebê é incapaz de produzir a sua própria. Por conseguinte, os pacientes geralmente não apresentam sintomas clínicos até os três meses de idade [5]. Quase 50% dos pacientes apresentam manifestações clínicas por volta de um ano de idade, e bem mais de 95% desenvolvem sintomas por volta dos cinco anos de idade [5, 6]. Aproximadamente 50% dos pacientes são diagnosticados aos dois anos de idade. Existem raros relatos (casos clínicos individuais) bem documentados de pacientes com XLA que não apresentaram sintomas clínicos suficientes para serem diagnosticados com agamaglobulinemia até a vida adulta [29-34].

A hipótese diagnóstica de XLA ou qualquer outro IEI pode ser complexa porque, individualmente, são distúrbios raros [1, 5], mas muitas das manifestações clínicas dos IEI – particularmente da XLA –, como infecções, são relativamente comuns na população em geral. Aproximadamente 40% dos pacientes com XLA possuem um histórico familiar [5], o qual reitera a importância da hipótese diagnóstica em pacientes com fenótipo compatível com XLA, pois aproximadamente 60% dos pacientes apresentam uma variante espontânea (*de novo*). Portanto, a obtenção da história familiar detalhada de qualquer paciente é essencial, uma vez que uma minoria deles teve um membro da família masculino afetado. É fundamental questionar especificamente sobre parentes do sexo masculino que foram hospitalizados quando crianças, que tiveram doenças significativas ou morreram na infância, pois essas são indicações cruciais quanto à presença de distúrbios hereditários importantes.

Em pacientes com histórico familiar positivo, pode-se fazer o diagnóstico antes que o paciente tenha qualquer infecção.

A maioria dos pacientes com XLA, no entanto, não tem uma história familiar positiva, e nesse cenário as habilidades clínicas do pediatra, imunologista ou outro médico especialista relacionado são fundamentais. Não existe uma correlação entre o número de infecções e a suspeita de um IEI. No entanto, existem situações clínicas em que o diagnóstico deve ser considerado. O principal deles é quando o clínico suspeita que o paciente tenha uma suscetibilidade aumentada a infecções, conforme definido por infecções recorrentes (ou seja, otite média), infecções incomumente graves, como pneumonia que requer hospitalização ou infecções que são atípicas em sua apresentação ou organismo causador [22].

Os sinais e sintomas clínicos de infecções sinopulmonares recorrentes e crônicas e suas sequelas incluem tosse crônica, rinite crônica e gotejamento pós-nasal, e baqueteamento digital (hipocratismo digital) [35]. Os gráficos de crescimento devem ser examinados em busca de evidências de falha ou atraso no crescimento.

1.1.2.1. Infecções bacterianas

As infecções bacterianas são as manifestações clínicas mais comuns de XLA antes e depois do diagnóstico [5, 6, 8, 20-23]. São geralmente causadas por bactérias piogênicas encapsuladas, microrganismos para os quais a opsonização (por anticorpos) é uma defesa primária (mecanismo inato) do hospedeiro.

Streptococcus pneumoniae, *Haemophilus influenzae* tipo B, *Streptococcus pyogenes*, espécies de *Pseudomonas* são algumas das várias espécies bacterianas responsáveis pela maioria dos episódios de sepse, osteomielite, artrite séptica e infecções do sistema nervoso central (SNC) em pacientes com XLA [5, 20, 22]. Também, esses mesmos microrganismos são os principais causadores das infecções das vias aéreas inferiores. No entanto, a etiologia infecciosa específica das infecções respiratórias em XLA frequentemente é desconhecida [5]. As espécies de *Salmonella* e *Campylobacter* podem causar gastroenterite [5]. Organismos do gênero *Helicobacter* podem causar bacteremia crônica característica e/ou infecções linfáticas [36].

Antes do diagnóstico, a otite média recorrente é a infecção do trato respiratório mais comum, seguida de pneumonia e sinusite [5, 21, 22]. Em um estudo com 254 crianças com pneumonia adquirida na comunidade (131 meninos e 123 meninas, idade média de 4,5 anos) que foram rastreadas para PID/IEI, dois dos 131 meninos foram diagnosticados com XLA [37]. Após o diagnóstico, pneumonia e sinusite aguda e crônica são as mais comuns das



Figura 1. (A) Máculas eritematosas em mãos e pernas no início do tratamento (julho de 2018). (B) A lesão na perna direita evoluiu para placa violácea e crostas necróticas (setas) (fevereiro de 2019). (C) Estas lesões progrediram, apesar do tratamento, para úlcera tipo pioderma gangrenoso (junho de 2019). Figura extraída de Romo-Gonzalez et al, 2022 [43, All rights reserved to *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*].

infecções do trato respiratório, mesmo após IgRT [5]. A bronquite e a pneumonia requerem especial atenção, pois podem levar à doença pulmonar crônica (bronquiectasia e obstrução do fluxo aéreo) e insuficiência pulmonar [5, 20, 21, 23, 26, 38, 39]. Especial atenção se deve dar à artrite, especialmente séptica.

Infecções bacterianas sistêmicas difundidas pelo sangue, como bacteremia/sepsse, osteomielite, artrite séptica e meningite, eram mais comuns nas primeiras décadas após a descrição inicial da doença por Bruton em 1952 [20, 21]. De fato, o primeiro paciente descrito apresentava episódios recorrentes de sepsse [11]. As infecções bacterianas sistêmicas tornaram-se menos frequentes com o advento de adequada IgRT, embora essas infecções ainda ocorram [5, 21].

Infecção intravascular/linfática causada por organismos do gênero *Helicobacter* (que incluem os táxons *Flexispira*) foi descrita em pacientes com XLA [36, 40-44]. São infecções bacteriêmicas (difundidas pelo sangue), geralmente persistentes e/ou recorrentes. Um sinal clínico para seu diagnóstico é a presença de lesões cutâneas e subcutâneas características, endurecidas, violáceas nas extremidades, de aspecto semelhante ao pioderma gangrenoso (Figura 1).

Infecções causadas por espécies de *Mycoplasma* e *Ureaplasma* são raras em pacientes com XLA, mas quando ocorrem, podem levar a uma variedade de manifestações clínicas, incluindo infecções do trato respiratório, artrite séptica e infecções do SNC. O diagnóstico dessas infecções pode ser desafiador devido ao crescimento lento e à natureza exigente desses organismos, e seu manejo pode ser complicado pela resistência antimicrobiana. Apesar desses desafios, o diagnóstico precoce e a terapia antimicrobiana apropriada são fundamentais para melhorar os resultados dos pacientes [6].

1.1.2.2. Infecções virais, fúngicas e parasitárias

Os pacientes com XLA também são mais suscetíveis a certas infecções virais, fúngicas e parasitárias. Infecções por enterovírus, tais como ECHOvirus e coxsackievirus, são mais frequentes em pacientes com XLA [45], e podem se tornar crônicas e ininterruptas [46, 47]. Tais infecções crônicas eram mais comuns no período anterior à disponibilidade da IgRT adequada [5, 20]. Entretanto, ainda há relatos de casos isolados, mesmo diante de níveis adequados de IgG com IgRT [48]. As infecções enterovirais podem assumir a forma de meningoencefalite e/ou hepatite crônicas, ou podem se mascarar como dermatomiosite com infecção direta do músculo e da pele [45- 47].

Os primeiros sinais de meningoencefalite enteroviral podem ser uma mudança no comportamento e/ou regressão do desenvolvimento, que então progride para comprometimento neurológico completo e coma durante um período de meses a anos [49]. A causa mais comum de deterioração neurológica em pacientes com XLA é uma infecção enteroviral [45]. Uma variedade de terapias tem sido testada para esta infecção difícil, incluindo altas doses de imunoglobulina intravenosa (IVIG), imunoglobulina intratecal e drogas antivirais, como pleconaril e pocapavir [45-49]. Infelizmente, nenhuma delas forneceu melhora confiável e consistente ao longo prazo, embora haja casos que sugerem benefícios terapêuticos. Novos medicamentos enterovirais, ainda em estudo, têm se mostrado promissores no tratamento de infecções por enterovírus com risco de morte em IEI [45].

Outras infecções virais, fúngicas e parasitárias menos comuns também ocorrem. Infecções das vias aéreas inferiores causadas por *Pneumocystis jirovecii* (anteriormente *P. carinii*) geralmente são observadas apenas em pacientes debilitados, mas podem ocorrer mesmo sob adequada IgRT [50, 51]. O micoplasma/ureaplasma causa alguns casos de artrite e/ou osteomielite, mais frequentemente em pacientes não tratados ou tratados de forma inadequada [23, 52, 53]. Outros exemplos incluem gastroenterite crônica por rotavírus, descrita em casos isolados, e infecção gastrointestinal por *Giardia lamblia* [5, 6, 8, 21, 54].

Pacientes com XLA também são propensos a desenvolver poliomielite relacionada à vacina após receberem a vacina de poliovírus vivo atenuado diretamente ou, menos comumente, após contato próximo com um indivíduo que recebeu a vacina viva atenuada [5, 55]. A poliomielite relacionada à vacina é caracterizada por um período de incubação relativamente longo, uma encefalomielite crônica e uma alta taxa de mortalidade [47]. Essa complicação não foi observada em pacientes que vivem em países que substituíram a vacina viva atenuada por uma vacina de vírus inativado (morto) [49].

1.1.2.3. Neoplasias

Uma variedade de neoplasias foi relatada em pacientes com XLA [5, 56-60]. Estes incluem cânceres linforreticulares [5, 56], adenocarcinoma gástrico e colorretal [57-60] e carcinoma de células escamosas do pulmão [61]. Em uma coorte de 52 pacientes, o câncer colorretal foi encontrado em três (6%) [59]. No entanto, nenhuma neoplasia foi encontrada em outras duas coortes de 73 e 44 pacientes, respectivamente [21, 23]. Pacientes com XLA parecem ter um risco aumentado para o desenvolvimento de adenomas colorretais ainda quando relativamente muito jovens [62]. Foi descrito um único paciente com XLA e leucemia linfoblástica aguda (LLA) precursora de células B [63]. Devido à variante branda em BTK neste paciente, no entanto, não foi possível concluir se o defeito em BTK levou a um risco aumentado de LLA [63, 64].

A doença oncológica foi relatada em 3,7% dos pacientes com XLA de um registro italiano de PID/IEI, com quatro envolvendo o sistema gastrointestinal, um da tireoide e um do SNC [27]. Mesmo raras, a incidência dessas malignidades em pacientes com XLA foi maior quando comparada ao relatado para homens italianos saudáveis da mesma faixa etária [27]. Portanto, o risco de tumores na XLA é incerto devido aos dados conflitantes. Estudos epidemiológicos são necessários para determinar se os pacientes com XLA apresentam predisposição aumentada para tumores específicos e, em caso afirmativo, em que grau.

1.1.2.4. Autoimunidade e doença inflamatória

Condições inflamatórias estão associadas à XLA. Uma pesquisa da WAO descreveu uma ampla gama de condições autoimunes e inflamatórias, incluindo doença inflamatória intestinal (IBD, *inflammatory bowel disease*) [28]. Embora autoanticorpos não sejam produzidos, até 28% dos pacientes participantes de outro estudo apresentavam queixas consistentes com autoinflamação, e vários foram diagnosticados com artralrias ou artrite, hipotireoidismo e IBD [65]. Casos de doença de Crohn, anemia, trombocitopenia e neutropenia são mais prevalentes na XLA do que o esperado na população em geral [65]. Uma revisão retrospectiva relatou que mais de um terço dos pacientes com XLA apresentavam manifestações gastrointestinais e 11% foram diagnosticados com IBD ou enterite [66]. Os pacientes devem, portanto, ser monitorados quanto ao desenvolvimento de doenças autoimunes e autoinflamatórias, particularmente gastrointestinais.

1.1.3. XLA atípica

Certamente, a forma clássica de XLA acomete a grande maioria dos pacientes, mas formas “atípicas” de XLA, caracterizadas por baixo número de células B, níveis anticorpais reduzidos e doença menos grave, foram descritas [67-70]. Tais pacientes são inicialmente diagnosticados (incorretamente) com outras causas de imunodeficiência humoral, incluindo hipogamaglobulinemia transitória da infância (HTI) [69], deficiência de anticorpos específicos [70] e imunodeficiência variável comum (CVID, *common variable immunodeficiency*) [33]. Contudo, os pacientes com XLA atípica desenvolvem o fenótipo clínico típico (doença mais grave) e as anormalidades laboratoriais características da XLA clássica em uma idade mais tardia. Um paciente com XLA branda foi diagnosticado com 51 anos de idade [68].

1.1.4. Achados laboratoriais

Hipogamaglobulinemia ou agamaglobulinemia, respostas deficientes de anticorpos a imunizações e células B ausentes ou acentuadamente reduzidas no sangue são os principais achados laboratoriais em pacientes com XLA. Porém, a marca registrada consiste em uma redução nítida em todas as classes e subclasses de imunoglobulinas séricas e células B (1, 2, 5, 9-12). Os níveis de IgG, imunoglobulina A (IgA) e imunoglobulina M (IgM) geralmente estão abaixo de 100 mg/dL e podem estar abaixo do nível de detecção em laboratórios clínicos. No entanto, os níveis de IgG podem chegar a 200 a 300 mg/dL em alguns pacientes [5].

Os níveis séricos de anticorpos para antígenos ubíquos (por exemplo, isohemaglutininas e *Escherichia coli*) ou para imunizações (por exemplo, poliomielite, tétano, difteria) são extremamente reduzidos ou indetectáveis [5, 6, 8, 20-23]. Embora o número e a função das células T sejam normais, um estudo de 15 pacientes com XLA mostrou repertório de células T distorcido e limitado [25].

Células B maduras (por exemplo, células B portadoras de imunoglobulina ou células B CD19+ ou CD20+) são marcadamente reduzidas e podem ser tão baixas quanto 0,01% a menos de 2% de células B CD19+ [71], tanto no sangue quanto em tecidos, como folículos linfóides e centros germinativos de linfonodos [5, 6, 8, 20-23]. Da mesma forma, as células plasmáticas estão ausentes no tecido linfóide, na medula óssea e na lâmina própria da mucosa retal [5, 6, 8, 20-23]. Além disso, de 15 a 25% dos pacientes podem ter neutropenia em algum momento, o que pode ser grave [72-75]. A neutropenia está associada à alta carga bacteriana observada na infecção ativa e normalmente se resolve com terapia antimicrobiana e a IgRT.

1.1.5. Diagnóstico

Tabela 1. Critérios diagnósticos para agamaglobulinemia ligada ao X (XLA)

Diagnóstico definitivo*

Paciente do sexo masculino com contagem de células B CD19+ inferior a 2%, acompanhado de pelo menos:

1. Variante patogênica em *BTK*.
2. Ausência de RNAm de *BTK* em monócitos ou neutrófilos através de análises em *Northern blot*.
3. Ausência da proteína BTK em monócitos ou plaquetas.
4. Primos, tios ou sobrinhos com contagem de células B CD19+ inferior a 2%.

Provável diagnóstico*

Paciente do sexo masculino com contagem de células B CD19+ inferior a 2%, acompanhado de pelo menos:

1. Início de recorrentes infecções bacterianas nos primeiros cinco anos de vida.
2. Quantificação de IgG, IgM e IgA maiores que 2 DP abaixo do normal para a idade.
3. Ausência de isohemaglutininas e/ou resposta ruim ou reação às vacinas.
4. Outras causas de hipogamaglobulinemia foram excluídas.

Possível diagnóstico*

Paciente do sexo masculino com contagem de células B CD19+ inferior a 2%, em que outras causas de hipogamaglobulinemia foram excluídas e no mínimo é acompanhado de um desses critérios positivos:

1. Início de recorrentes infecções bacterianas nos primeiros cinco anos de vida.
2. Quantificação de IgG, IgM e IgA maiores que 2 DP abaixo do normal para a idade.
3. Ausência de isohemaglutininas.

CD: *cluster* de diferenciação; BTK: tirosina quinase de Bruton; RNAm: RNA mensageiro; IgG/A/M: imunoglobulina G/A/M; DP: desvio padrão. *Pacientes com diagnóstico definitivo ou provável são considerados com mais de 98% e 85% de probabilidade, respectivamente, de manterem o mesmo diagnóstico em 20 anos. Pacientes com um diagnóstico possível são aqueles que apresentam alguns, mas não todos, os achados clínicos ou laboratoriais característicos de um determinado distúrbio [76, *All rights reserved to Elsevier*].

A combinação de história familiar (se presente), história clínica e exame físico geralmente levanta a hipótese diagnóstica de XLA. A avaliação laboratorial inicial de um paciente do sexo masculino com suspeita de XLA inclui um hemograma completo com diferencial, níveis séricos quantitativos de imunoglobulinas (IgG, IgA e IgM) e títulos de anticorpos séricos específicos em resposta à imunização e/ou infecção (por exemplo, tétano, difteria, *H. influenzae* tipo B e pneumococo). A descoberta de baixos níveis de

imunoglobulina indica a necessidade de testes adicionais, incluindo a determinação de subpopulações de linfócitos (subconjuntos de células T, B e *natural killer* [NK]) por citometria de fluxo para documentar números de células B intensamente reduzidos ou ausentes no sangue periférico. Todo esforço deve ser feito para documentar uma variante em *BTK*, quando encontrados níveis significativamente reduzidos de imunoglobulina e de células B. Em aproximadamente 20% dos pacientes com o fenótipo de XLA não serão encontradas variantes em *BTK*, mas sim variantes patogênicas em outros genes. Esses distúrbios mais raros, em muitos casos diagnosticados como agamaglobulinemia autossômica recessiva (ARA, *autosomal recessive agammaglobulinemia*), podem afetar tanto mulheres quanto homens.

Em 1999, um comitê internacional estabeleceu critérios para o diagnóstico de XLA (Tabela 1) [76]. Um diagnóstico definitivo é feito quando um paciente do sexo masculino apresenta hipogamaglobulinemia ou agamaglobulinemia, menos de 2% de células B CD19+ e um membro da família do sexo masculino de linhagem materna documentado como tendo também agamaglobulinemia e menos de 2% de células B CD19+ ou um diagnóstico molecular confirmado (por DNA, RNA mensageiro [mRNA] ou análise de proteínas) em *BTK* ou na expressão de BTK. Um diagnóstico provável ou possível com base na história clínica, níveis séricos quantitativos baixos de imunoglobulina e resposta ausente às vacinas é feito se esses critérios não forem atendidos, mas outras causas de agamaglobulinemia ou hipogamaglobulinemia forem descartadas.

1.1.6. Triagem neonatal

É possível rastrear defeitos na maturação de células B em recém-nascidos, como diferentes formas de agamaglobulinemia, através dos círculos de excisão de recombinação de deleção de imunoglobulina kappa (KRECs, *immunoglobulin kappa-deleting recombination excision circles*). Eles são formados no processo de maturação de células B durante a exclusão alélica e não são produzidos em pacientes com defeitos de maturação de células B, como XLA, pois ocorrem antes desse estágio [77].

Os KRECs podem ser usados para rastrear defeitos de maturação precoce de células B a partir de manchas de sangue seco em cartões de triagem de recém-nascidos usando a reação em cadeia da polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*), semelhante ao uso de círculos de excisão de receptores de células T (TRECs, *T-cell receptor excision circles*) para rastrear defeitos de células T [77].

A triagem simultânea para deficiências de células T e B usando TRECs e KRECs

tem sido estudada [78, 79]. Um trabalho que analisou os KRECs ao longo do tempo em pacientes com XLA observou KRECs marcadamente baixos ou diminuídos no nascimento, que assim permaneceram ao longo do tempo [78]. Por outro lado, existem relatos de pacientes com variantes hipomórficas de *BTK* que não foram identificados através da triagem neonatal, seja na primeira semana de vida, como em idade infantil [80]. De qualquer forma, a triagem neonatal é valiosa, pois o diagnóstico precoce e o tratamento precoce, incluindo a IgRT, são essenciais para melhorar o prognóstico e a qualidade de vida de pacientes com XLA [77].

1.1.7. Detecção de portador

Existem três técnicas disponíveis para determinar o status de portador de membros femininos da família: (I) detecção da variante relevante em *BTK*, (II) análise de ligação e (III) detecção de inativação alterada do cromossomo X em células B. Embora todas tenham sido utilizadas na prática clínica, o sequenciamento do DNA genômico tornou-se a técnica mais amplamente realizada.

A identificação de uma variante em *BTK* é o método mais direto para detectar uma mulher portadora [81]. A detecção de uma variante heterozigótica é particularmente útil em um membro feminino da família de um paciente afetado com XLA no qual a variante de *BTK* seja conhecida.

A análise de ligação depende da análise de segmentos de DNA polimórficos do cromossomo X intimamente ligados que flanqueiam o gene *BTK* e permitem rastrear a herança de um bloco de DNA genômico em uma família com um membro afetado. Uma variante de *BTK* conhecida não é necessária para a análise de ligação, e as variantes codificantes e não-codificantes podem ser inferidas a partir deste método. Vários loci polimórficos que estão intimamente ligados ao *BTK* foram usados para essa finalidade [82-84].

A análise de inativação alterada do cromossomo X também foi usada para a detecção de portadores e não requer que a variante seja conhecida ou que um membro da família previamente afetado esteja disponível. Esta técnica depende do fato de que mulheres não portadoras têm duas populações de células B em seu sangue, uma na qual o cromossomo X materno está ativo e outra na qual o cromossomo X paterno está ativo (a inativação de um ou outro cromossomo X em cada célula também é chamada de lionização).

Em contraste com as linhagens de células não-B, o cromossomo X ativo em todas as células B de mulheres portadoras de XLA carrega o alelo *BTK* normal [85]. Várias ferramentas ou técnicas estão disponíveis para detectar a inativação não aleatória do

cromossomo X, mas elas são realizadas apenas em laboratórios especializados. Essas técnicas incluem análise de padrões de metilação de genes do cromossomo X [86], exame de híbridos de células somáticas que retiveram seletivamente o cromossomo X ativo [87], e análise de citometria de fluxo da expressão intracelular da proteína BTK em monócitos ou plaquetas [7].

1.1.8. Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial de XLA inclui outras causas de agamaglobulinemia e hipogamaglobulinemia, tais como a HTI, a CVID, a ARA, imunodeficiências combinadas de células T e B com agamaglobulinemia, síndrome hiper IgM, e agamaglobulinemias secundárias.

Resumidamente, na HTI o sistema imunológico dos pacientes melhora com o tempo, ao contrário de pacientes com XLA, com agamaglobulinemia vitalícia. Pacientes com HTI produzirão anticorpos específicos, ao contrário de pacientes com XLA. Quanto à CVID, a idade de apresentação orienta o clínico no diagnóstico diferencial, pois os pacientes com agamaglobulinemia geralmente se manifestam precocemente. Os pacientes com XLA são do sexo masculino, enquanto os pacientes com CVID podem ser tanto do sexo masculino quanto feminino. Na ARA, os exames laboratoriais se assemelham àqueles dos pacientes com XLA; porém, estes são do sexo masculino, em contraste com os pacientes com ARA, que podem ser do sexo masculino ou feminino. A apresentação também varia, dependendo da variante genética que leva à agamaglobulinemia.

Finalmente, nas imunodeficiências combinadas de células T e B com agamaglobulinemia, os linfócitos T e B são afetados, ao contrário da XLA, que é principalmente um distúrbio de linfócitos B. Os pacientes com defeitos combinados podem ser do sexo masculino ou feminino, ao contrário dos pacientes com XLA, que são do sexo masculino.

Como já mencionado no item 1.1.5, a quantificação de linfócitos B e T, níveis de anticorpos em resposta a imunizações e a identificação de uma variante patogênica em *BTK* geralmente leva a um diagnóstico preciso. Os níveis de células B são geralmente normais com a maioria das outras causas de agamaglobulinemia/hipogamaglobulinemia. As exceções são algumas das formas mais incomuns de imunodeficiência combinada grave (SCID, *severe combined immunodeficiency*; T-B-NK+SCID), ARA e CVID.

Um diagnóstico preciso de XLA é importante não apenas para o paciente, mas também para os membros femininos da família do paciente que podem ser portadores. Por exemplo, todas as filhas de um paciente com XLA serão portadoras, e os filhos (meninos) das

portadoras terão 50% de chance de serem afetados. Da mesma forma, quando a mãe é portadora, as irmãs têm 50% de chance de serem portadoras.

1.1.9. Indicações para encaminhamento, avaliação inicial e gestão clínica

Se a história e a apresentação clínica do paciente forem consistentes com o diagnóstico de agamaglobulinemia, a investigação deve incluir quantificação proteica (quadro eletroforético) e imunoglobulinas séricas juntamente com títulos de anticorpos para vacinas e subconjuntos de linfócitos. Os imunologistas clínicos são uma parte essencial da equipe médica e podem ajudar a interpretar os resultados laboratoriais, garantir o tratamento adequado e monitorar o paciente ao longo do tempo para avaliar outras comorbidades.

A tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR) do tórax, juntamente com o teste de função pulmonar em crianças com idade suficiente para concluí-lo, deve ser realizada como parte da avaliação inicial para verificar a presença/extensão de bronquiectasias e avaliar o estado funcional pulmonar [26].

A IgRT é a pedra angular do tratamento para XLA [5, 38, 88]. Os cuidados gerais de suporte incluem medidas para evitar infecções e imunização com vacinas recombinantes e inativadas [89, 90]. A realização de testes como hemograma completo, química sérica e/ou procedimentos radiológicos específicos podem fornecer informações sobre se o paciente tem uma infecção aguda ou crônica, como acontece com qualquer outro paciente [89, 90].

1.1.10. Terapia de reposição de imunoglobulina e antibiótica

Duas formas de IgRT estão disponíveis: IVIG e imunoglobulina subcutânea (SCIG). A dose para cada uma dessas preparações é determinada por uma combinação do peso do paciente, dos níveis “mínimos” ou pré-infusão de IgG após o início do tratamento, e a resposta clínica e condição do paciente [91].

O uso de IgRT em pacientes com XLA não foi analisado em estudos randomizados, sendo improvável que um estudo randomizado seja realizado. A experiência clínica e estudos observacionais em pacientes com XLA e outras formas de agamaglobulinemia/hipogamaglobulinemia, em especial a CVID, indicam que a IgRT reduza a morbidade e a mortalidade [91]. Dados de estudos observacionais mostram que a IgRT diminui a taxa de infecções – particularmente pulmonares, tanto agudas quanto crônicas – e reduz as taxas de hospitalização em pacientes com XLA [5, 38, 88]. A IgRT também ajuda a prevenir o desenvolvimento de insuficiência pulmonar de longo prazo na maioria dos estudos e reduz o risco de infecções sistêmicas por enterovírus [38, 88].

Em uma coorte de 29 pacientes com XLA, uma resposta à dose de IgRT foi observada em relação à incidência de pneumonia e número de dias hospitalizados [87]. Meningite bacteriana, bronquiectasia e doença pulmonar crônica não foram relatadas em pacientes que receberam IVIG, mas ocorreram em pacientes que receberam doses mais baixas de imunoglobulina por via intramuscular. A IVIG foi mais benéfica quando iniciada antes dos cinco anos de idade [87]. Em outra série de 31 pacientes com XLA, a incidência de infecções bacterianas que requerem hospitalização também diminuiu após o início da IVIG (de 0,4 para 0,06 por paciente por ano) [37].

No entanto, apesar dos inúmeros benefícios, a IgRT tem suas limitações. As preparações disponíveis apenas substituem IgG, mas não IgM ou IgA, que possuem algumas funções biológicas exclusivas da IgG [92]. Além disso, as preparações de imunoglobulina disponíveis comercialmente são isoladas de *pools* constituídos por milhares de doadores. Assim, embora possuam títulos significativos de anticorpos contra patógenos comuns, as preparações comerciais podem não ter títulos significativos contra organismos incomuns que os pacientes com XLA podem encontrar [92]. Também pode não proteger contra um novo vírus [92, 93]. Finalmente, a imunidade passiva conferida pela IgRT não replica o aumento normal na produção de anticorpos contra um microrganismo infectante que ocorre em indivíduos imunocompetentes com imunidade ativa [93].

Além da IgRT, os pacientes com XLA requerem terapia antibiótica agressiva para qualquer infecção documentada e/ou suspeita. Em alguns casos, a terapia antibiótica prolongada pode ser indicada como tratamento para infecções pulmonares em curso ou sinusite crônica ou como profilaxia contra essas infecções, particularmente em quadros de bronquiectasia. Vale também ressaltar que a terapia antibiótica prolongada pode estar relacionada à alta frequência de perda auditiva em pacientes com deficiência de anticorpos, inclusive a XLA, e uma avaliação audiológica sistemática deve fazer parte do atendimento clínico desses pacientes [94].

1.1.11. Medidas para evitar o contágio

Outras considerações no cuidado de pacientes com XLA incluem vacinações e prevenção de infecções. Os pacientes com XLA não irão gerar respostas de anticorpos significativas à imunização profilática [9]. No entanto, muitos médicos ainda imunizam esses pacientes com vacinas virais e bacterianas recombinantes (por exemplo, vacina anual contra influenza) na expectativa de que gerem respostas imunes mediadas por células T que possam oferecer alguma proteção adicional além daquela obtida com a IgRT. Vacinas de vírus vivos

são contraindicadas [9, 95], incluindo a vacina oral da poliomielite (Sabin), por ser uma vacina de vírus atenuado (o contato do paciente com XLA com pessoas, especialmente familiares, recentemente vacinadas com a vacina oral da poliomielite deve ser evitado). A imunização contra agentes infecciosos transmissíveis é incentivada para familiares próximos [95].

Com relação à recente epidemia de COVID-19, certamente pacientes com PAD apresentam maior vulnerabilidade à infecção, porém dados de um estudo europeu concluíram que a mortalidade não foi significativamente aumentada nesse grupo de pacientes com IEI. Certamente a administração de anticorpos monoclonais (MoAbs), que demonstraram ser eficazes contra as novas variantes virais, a imunização com doses adicionais de reforço da vacina, e a possibilidade de examinar as respostas imunes de curto e longo prazo e a administração de medicamentos antivirais recém-desenvolvidos tiveram um papel importante no combate à COVID-19 em pacientes com PAD [96].

A proteção passiva contra certas infecções, como tétano e varicela, com globulina hiperimune geralmente não é necessária em pacientes que já recebem IgRT padrão [97, 98]. Abordagens sensatas para reduzir a exposição do paciente a doenças infecciosas transmissíveis, como lavar as mãos e evitar gotículas respiratórias, são recomendadas [97]. Finalmente, os pacientes devem evitar a ingestão de água potável não tratada, se possível [98].

1.1.12. Monitoramento do estado pulmonar

Monitorar o paciente para danos pulmonares subclínicos, mas progressivos, também é importante, uma vez que vários estudos mostraram que esses pacientes podem desenvolver doença pulmonar crônica [5, 20, 21, 23, 26, 38, 39]. Tal monitoramento pode assumir a forma de testes rotineiros de função pulmonar. Exames de TCAR de tórax podem ser valiosos na detecção precoce e progressiva de danos estruturais pulmonares, embora o risco acumulado de radiação deva ser levado em consideração na realização desses exames. Seis pacientes com XLA com bronquiectasia submetidos a transplante pulmonar tiveram resultados ruins ao longo prazo com alta incidência de sepse pulmonar, disfunção crônica do aloenxerto pulmonar e mortalidade em cinco pacientes dentro de três anos após o transplante [99].

1.1.13. Transplante de células hematopoiéticas e terapia gênica para XLA

Os riscos do transplante alogênico de células hematopoiéticas (HCT, *hematopoietic cell transplantation*) ou terapia gênica para XLA há muito são considerados

superiores aos benefícios, particularmente em vista do tratamento bem-sucedido com IgRT e antibióticos. No entanto, o alto custo da imunoglobulina, o acesso limitado à imunoglobulina em alguns países e populações e o desejo do paciente de se livrar de infusões periódicas vitalícias estimularam o interesse por essas possíveis curas. A terapia gênica com células autólogas para corrigir células hematopoiéticas continua em investigação, embora nenhum ensaio clínico em pacientes tenha sido realizado até o momento. Alguns trabalhos sugerem que o HCT possa ser bem-sucedido em pacientes com XLA [100, 101].

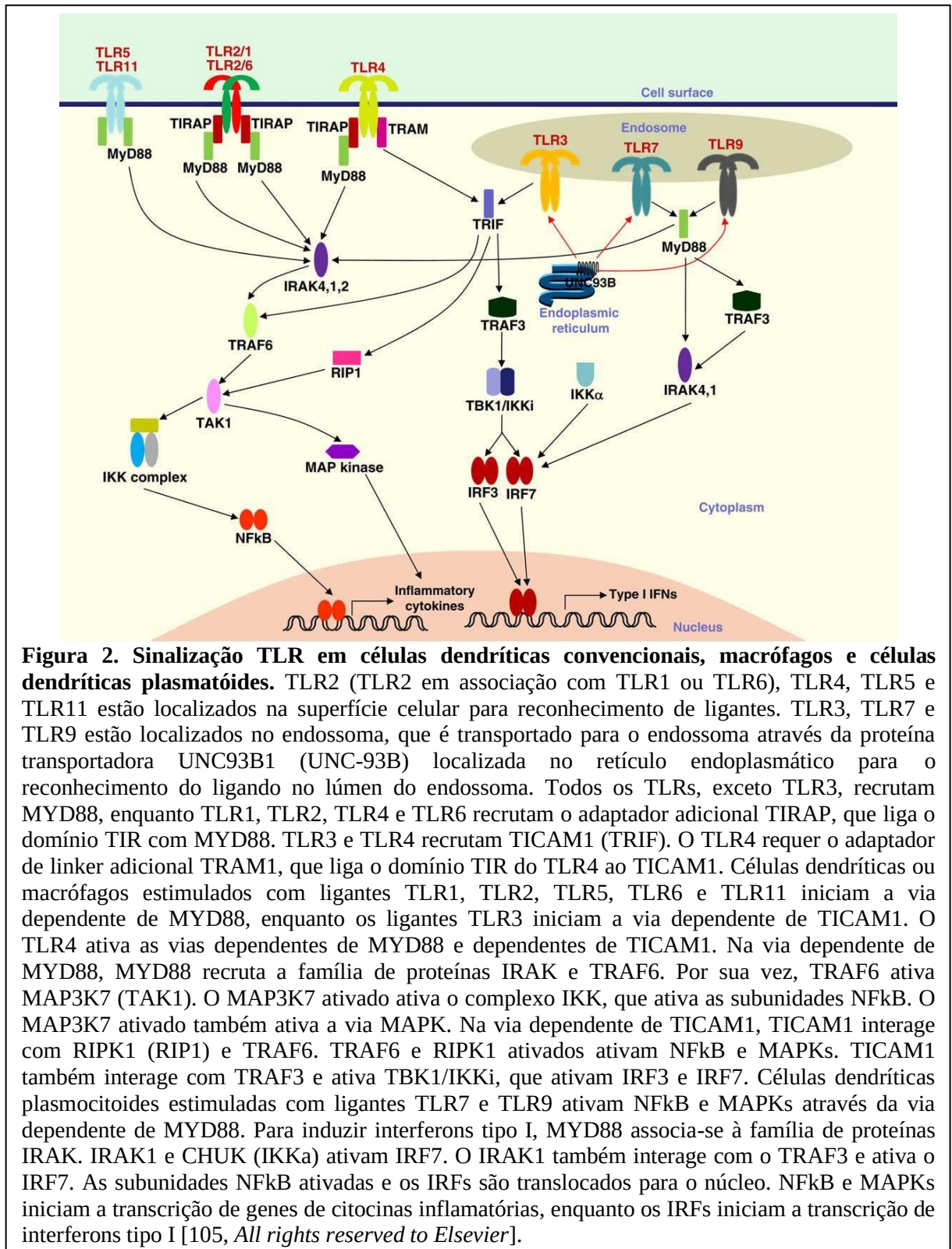
1.1.14. Prognóstico

A idade média de diagnóstico diminuiu de modo significativo desde a descrição inicial da XLA [5]. Além disso, as preparações de imunoglobulina melhoraram, permitindo que os pacientes mantenham níveis normais de IgG na terapia de reposição. Espera-se que a maioria dos pacientes com XLA nascidos nas últimas décadas e tratados adequadamente (sem HCT) sobreviva até a vida adulta devido a essas melhorias no diagnóstico inicial, na IgRT e no tratamento de infecções. Em um estudo de 2006, mais de 40% dos pacientes com XLA em um registro dos Estados Unidos da América eram adultos. Na mesma série, apenas três de 80 pacientes acompanhados prospectivamente por um período de quatro anos morreram e, notavelmente, dois morreram de causas iatrogênicas [5]. Observações de um registro italiano com um acompanhamento médio de mais de oito anos por paciente revelaram uma taxa de sobrevivência global de quase 93% aos 43 anos de idade [27]. A mortalidade aumentou naqueles com doença pulmonar crônica. Em uma pesquisa mundial, 41% das mortes relatadas foram devidas a doença pulmonar aguda ou crônica [28].

Para pacientes que sobrevivem até a idade adulta, a qualidade de vida geralmente é boa. Os adultos com XLA faltam mais dias à escola/trabalho e são hospitalizados com maior frequência do que os homens na população em geral. No entanto, a maioria leva uma vida produtiva e gratificante, apesar dessas limitações [39, 102, 103].

1.2. Receptores toll-like (RTLs)

Os receptores toll-like (TLRs, *toll-like receptors*) são estruturas proteicas eucarióticas capazes de detectar antígenos microbianos específicos. Constituem uma classe de receptores de reconhecimento de padrão (PRR, *pattern recognition receptor*) com localização intracelular ou de membrana. Derivam seu nome da homologia com a molécula *Drosophila Toll*, um componente importante do padrão de desenvolvimento dorso-ventral e defesa antifúngica [104, 105]. Os TLRs são filogeneticamente antigos, presentes em invertebrados e



conservados através da evolução dos vertebrados, e integram o sistema imunológico inato. Este gera respostas (inatas) rápidas pela exposição a antígenos microbianos e precedem o desenvolvimento de respostas imunes adaptativas [106]. Os ligantes para TLRs são chamados de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, *pathogen-associated molecular*

patterns), que são componentes de micróbios patogênicos. Nos vertebrados, desempenham funções independentemente da imunidade adaptativa, mas também agem direcionando a diferenciação de células T *naïve* em células T efectoras.

1.2.1. Estrutura e função dos TLRs

O número de TLRs varia em espécies distintas. Pelo menos 10 foram descobertos em humanos [104, 105, 107]. Com exceção de TLR1, TLR2 e TLR6, os TLRs iniciam a sinalização por homodimerização. TLR2 forma heterodímeros com TLR1 (TLR2/1) ou TLR6 (TLR2/6). A estrutura e organização do receptor, ligantes e sinalização estão resumidos na Tabela 2 e na Figura 2. Estruturalmente, todos os TLRs são semelhantes: têm um domínio de ligação e reconhecimento de ligante extracelular que contém repetições ricas em leucina; têm um único domínio de transmembrana; e o domínio citoplasmático (sinalização). Este é homólogo ao receptor de interleucina (IL) 1 (IL-1) e é denominado receptor toll/IL-1 ou domínio *Toll-interleukin 1 receptor* (TIR).

Tabela 2. Principais características dos receptores toll-like.

Receptor	Ligantes	Expressão celular	Intermediários na ligação	Produtos
TLR1+TLR2	Lipopeptídeos triacilados (bactérias Gram positivas, micobactérias), <i>Neisseria porins</i> , <i>Borrelia burgdorferi</i> OspA	M/M, CDM	TIRAP, MyD88	CI
TLR2+TLR6	Lipopeptídeos diacilados	M/M, CM	TIRAP, MyD88	CI
TLR3	RNAs (vírus)	B, T, NK	TRIF	CI, IFN tipo I
TLR4	LPS (bactérias Gram negativas), proteína de fusão RSV, Chlamydia HSP60, matriz extracelular	M/M, CDM, CM	TRAM, TRIF ou TIRAP, MyD88	CI, IFN tipo I
TLR5	Flagelina (bactéria)	M/M, DCM	MyD88	CI
TLR7	ssRNA (vírus), imidazoquinolinas	M/M, DCM, CDP, B	MyD88	CI, IFN tipo I
TLR8	ssRNA (vírus), imidazoquinolinas	M/M, CDM, CM	MyD88	CI, IFN tipo I
TLR9	DNA CpG (bactéria)	M/M, CDP, B, T	MyD88	CI, IFN tipo I
TLR10	Desconhecido	M/M, B	MyD88	

B, célula B; CDM, célula dendrítica mieloide; CDP, célula dendrítica plasmocitoide; CI, citocinas inflamatórias: fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 1 beta (IL-1B), interleucina 6 (IL-6), interleucina-12 (IL-12); CM, mastócitos; CpG DNA, sítios dinucleotídeos citosina guanina (em DNA de bactérias), dsRNA, fita dupla de RNA; HSPD1, família D de proteína de choque térmico (Hsp60) membro 1; IFN, interferon; LPS, lipopolissacarídeos; M/M, macrófago/monócito; MYD88, *MYD88 innate immune signal transduction adaptor*; NK, *natural killer*; OspA, proteína de superfície A; RSV, vírus sincicial respiratório; ssRNA, fita simples de RNA; T, célula T; TICAM (TRIF), domínio TIR

contendo o adaptador indutor de IFN-beta; TIRAP, proteína adaptadora contendo domínio TIR; TLR, receptor toll-like; TRAM, proteína de membrana associada à translocação 1 [105, *All rights reserved to Elsevier*].

A via final comum para a sinalização TLR envolve o fator nuclear para o potencializador da cadeia leve kappa nas células B (NF-kB, *nuclear factor (NF) for the kappa (k) light chain enhancer in B cells*) e a proteína ativadora-1 (AP-1, *activating protein-1*), ambos fatores de transcrição que regulam uma infinidade de genes, em especial aqueles codificantes de importantes citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF, *tumor necrosis factor*), IL-1-beta, IL-6, IL-8 e IL-12. Alguns TLRs também ativam a produção de interferons (IFN) tipo 1 (alfa e beta) induzindo os fatores reguladores de interferon (IRFs, *interferon regulatory factors*) 3 (IRF3), 5 (IRF5) e 7 (IRF7).

1.2.2. Distribuição celular e tecidual

Os TLRs são expressos diferencialmente em subpopulações leucocitárias distintas [105, 108]. Monócitos e macrófagos expressam todos os TLRs, exceto TLR3. As células dendríticas mieloides (MDCs, *myeloid dendritic cells*) expressam TLR2/1, TLR3, TLR4, TLR5 e TLR8, enquanto as células dendríticas plasmocitoides (PDCs, *plasmacytoid dendritic cells*) expressam TLR7 e TLR9. TLR2/6, TLR4 e TLR8 são encontrados nos mastócitos. As células B expressam TLR3, TLR7, TLR9 e TLR10, enquanto as células T expressam TLR3 e TLR9. Uma variedade de tipos de tecido pode expressar um ou mais TLRs. Como exemplo, as superfícies basolaterais das células epiteliais intestinais expressam TLR5, enquanto fibroblastos e queratinócitos expressam TLR3 na superfície celular [109].

A localização celular dos TLRs varia. TLR2/1, TLR2/6, TLR4, TLR5, TLR10 e TLR11 estão localizados nas superfícies celulares, enquanto TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 estão localizados nos endossomos. Acredita-se que a expressão de superfície celular de TLRs, como TLR4, que reconhece lipopolissacarídeos (LPS), permite o reconhecimento de moléculas extracelulares liberadas por patógenos. A expressão endossomal de TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 permite o reconhecimento de ácidos nucleicos microbianos após sua absorção e degradação em fagolisossomos. TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 interagem com uma proteína de membrana do retículo endoplasmático (ER) chamada *unc-93 homolog B1, TLR signaling regulator* (UNC93B1), essencial para a sinalização adequada [110]. Além disso, a expressão endossomal de TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 pode impedir a ativação por ácidos nucleicos do hospedeiro e o desenvolvimento de autoimunidade.

1.2.3. Sinalização

Todos os TLRs, exceto TLR3, utilizam a proteína MYD88 adaptadora de transdução de sinal imune inato (MyD88, *MYD88 innate immune signal transduction adaptor*), isoladamente (TLR5, TLR7, TLR8 e TLR9) ou em conjunto com a proteína adaptadora contendo domínio TIR (TIRAP, *TIR domain containing adaptor protein*) (TLR2/1, TLR2/6 e TLR4) (Figura 2) [104, 105, 111]. Há também uma via independente de MyD88 por meio do domínio TIR contendo o adaptador indutor de interferon-beta (IFN-beta) (TICAM1, *TIR domain containing adaptor molecule 1*), que é usado por TLR3 e TLR4 (TLR4 também utiliza a TICAM2, previamente nominada como TRAM).

O adaptador MyD88 se acopla por meio das quinases 1 e 4 associadas ao receptor de IL-1 (IRAK1 e IRAK4, *interleukin 1/4 receptor associated kinase*), do fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF6, *TNF receptor associated factor 6*) e da *mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7* (MAP3K7, previamente conhecida como *transforming growth factor (TGF)-beta-activated kinase 1*, TAK1) às *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs). Essa complexa cascata de quinases culmina na ativação da família de fatores de transcrição heterodiméricos conhecida como AP-1. Esses fatores de transcrição regulam uma ampla gama de genes que influenciam a sobrevivência (senescência), ativação e proliferação celular [112].

O adaptador MAP3K7 também leva à consequente ativação de NF- κ B através da ativação do *component of inhibitor of nuclear factor kappa B kinase complex* (CHUK). Este integra uma família de fatores de transcrição heterodiméricos que regulam muitos genes com papéis importantes nas respostas imunes, bem como na fisiologia de uma ampla gama de outros tipos de células. Estes incluem citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, receptores de linfócitos, moléculas de adesão, proteínas de fase aguda e outros fatores de transcrição [113]. A ligação do TLR3 leva à ativação do TRAF3 seguido pela *TANK binding kinase 1* (TBK1) e CHUK, que por sua vez ativam o IRF3, levando à produção de interferons tipo 1. TLR7, TLR8 e TLR9 sinalizam por meio de uma via dependente de MyD88 que utiliza IRAK1/4, CHUK, TRAF3/6 e fosfoproteína 1 secretada (SPP1, *secreted phosphoprotein 1*, previamente conhecida como osteopontina), que ativa IRF7, que leva à produção de IFN-alfa [114]. Além disso, a produção de IFN-alfa induzida por TLR7 demonstrou ser dependente da ativação de IRF5 [115].

1.2.4. Regulação

Muitos fatores controlam os efeitos intracelulares da ligação de TLR e a expressão de TLRs na superfície celular, que incluem exposição a antígenos microbianos,

outros ligantes de TLRs e citocinas.

Os membros da família gênica denominada supressor de proteínas de sinalização de citocinas (SOCS, *suppressor of cytokine signaling*) e a degradação mediada por ubiquitina de proteínas sinalizadoras estão envolvidos na regulação negativa da sinalização dos TLRs [116, 117]. No trato gastrointestinal, os fatores que equilibram a tolerância à flora hospedeira comensal e detectam bactérias patogênicas, com respostas inflamatórias apropriadas, não são totalmente compreendidos. A detecção de PAMPs comuns em bactérias patogênicas e não patogênicas seria antecipada para ativar a mesma resposta inflamatória. No entanto, a detecção de bactérias comensais no intestino pode induzir tolerância. A sinalização dos TLRs deve contribuir para a homeostase intestinal regulando a proliferação de células epiteliais intestinais e a integridade epitelial [118]. A expressão e localização de TLRs no epitélio intestinal podem estar diretamente relacionadas ao esse papel na manutenção da homeostase versus a indução de inflamação. Por exemplo, no epitélio intestinal, a ativação de TLR9 através da membrana apical induz tolerância, enquanto a ativação de TLR9 através da membrana basolateral induz uma resposta inflamatória através da via canônica do NFkB. A expressão espacial diferencial de PRRs no epitélio pode constituir um mecanismo crítico na distinção de bactérias comensais de bactérias patogênicas. A regulação da função dos TLRs é altamente complexa e ainda incompletamente compreendida [119- 122].

1.2.5. Respostas celulares induzidas por TLRs

A resposta a diferentes combinações de TLR depende da célula que expressa esse TLR, das quantidades e tipos relativos de TLRs presentes, bem como de estímulos adicionais e do programa de desenvolvimento da célula-alvo.

A ligação de TLRs de células mononucleares pode potencializar a atividade microbicida de células fagocíticas. Como exemplo, a ligação de TLR2/1 ou TLR2/6 por componentes da parede celular de *Mycobacterium tuberculosis* induz a produção de óxido nítrico em camundongos e outros mecanismos bactericidas em humanos [123]. A mesma combinação ligante/receptor também pode provocar apoptose em macrófagos [124]. Este mecanismo poderia potencialmente limitar a propagação de micróbios que estariam se replicando intracelularmente.

As células epiteliais que tiveram seus TLRs ativados podem produzir defensinas, que são peptídeos antimicrobianos que oferecem defesa contra várias infecções. Através do controle da proliferação de células intestinais e integridade epitelial, a ativação de TLR nas células epiteliais intestinais pode contribuir com a homeostase intestinal. A ativação de TLR

pode resultar em tolerância dependendo de onde os TLRs estão localizados dentro do epitélio intestinal (ou seja, a membrana apical), enquanto a ativação de TLRs dentro da membrana basolateral resulta em uma reação inflamatória a microrganismos invasivos [125-127].

Além disso, a apresentação de antígeno, a produção de IL-12 e a superexpressão de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86) que resultam da ativação de TLR em células dendríticas controlam o desenvolvimento de células T *naïve* em células efectoras Th1 antígeno-específicas [128]. Também, os INFs de tipo 1 são produzidos como resultado da ativação de TLRs (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9), que é essencial para a imunidade inata antiviral. Vários ligantes de TLRs podem ativar tipos qualitativamente distintos de respostas imunológicas, como a diferenciação de células T [T *helper* tipo 1 (Th1) vs T *helper* tipo 2 (Th2)] desencadeada por INF de tipo 1 ou causar respostas de citocinas diferentes [105]. A reação a diferentes combinações de TLR é ainda influenciada por outros estímulos, pelo plano de desenvolvimento da célula-alvo e pelas quantidades e tipos relativos de TLRs na superfície celular.

Os TLRs resultam de um longo processo de coevolução entre microrganismos e seus hospedeiros. Constituem assim defesas altamente desenvolvidas contra infecções. Todavia, os patógenos desenvolveram estratégias para contornar muitos desses sistemas. Por exemplo, o vírus *vaccinia* gera moléculas que se assemelham aos domínios TIR e podem bloquear a sinalização de TLR3 e TLR4 [129, 130].

A justificativa para este estudo reside na natureza inconclusiva das correlações genótipo-fenótipo em pacientes com XLA. Considerando que a BTK atua como um regulador negativo para certos TLRs, a exploração das vias de sinalização desses receptores pode potencialmente fornecer *insights* sobre essa correlação. Isso é particularmente relevante no contexto de manifestações clínicas que são predominantemente inflamatórias, em oposição àquelas com um caráter principalmente infeccioso.

2. OBJETIVOS

O principal objetivo deste estudo é identificar, através da expressão gênica diferencial, alvos críticos que possam estar relacionados aos mecanismos fisiopatológicos da XLA envolvidos na via de sinalização dos TLRs.

2.1. Objetivos específicos

Quantificação da expressão relativa dos genes *BTK*, *IRAK2*, *PIK3R4*, *REL*, *RIPK2*, *TFRC*, *TLR3*, *TLR6*, *TLR10* e *UBE2N* em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs, *peripheral blood mononuclear cells*) de pacientes com XLA e de controles do sexo masculino saudáveis, pareados por idade.

Comparação estatística da expressão dos genes alvo nos dois grupos: pacientes com XLA versus controles.

Inferência sobre o efeito clínico da expressão diferencial dos genes analisados e o tipo de variante patogênica em *BTK* dos pacientes.

3. MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. *Dysregulation of TLR Signaling-Associated Gene Expression in X-linked Agammaglobulinemia: Implications for Clinical Phenotypes and Therapeutic Target*

3.1.1. *Title Page*

Running Title: TLR signaling modulation by distinct *BTK* mutations

Thaís de Andrade Eugênio^{1†}, Marcelo Teocchi^{1,2†*}, Lia Furlaneto Marega¹, Isabella Quinti² and Maria Marluce dos Santos Vilela^{1*}

¹ Laboratory of Pediatric Immunology, Center for Investigation in Pediatrics, School of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil

² Department of Molecular Medicine, Sapienza University of Rome, Rome, Italy

[†] These authors have contributed equally to this work and share first authorship.

*Address correspondence to:

Marcelo Teocchi; B.Sc., M.D., Ph.D. E-mail: marcelo.teocchi@edu.unito.it

Maria Marluce dos Santos Vilela; M.D., Ph.D. E-mail: marluce@unicamp.br

Center for Investigation in Pediatrics, University of Campinas (FCM - UNICAMP)

Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária “Zeferino Vaz” – Barão Geraldo

CEP: 13083-887 Campinas - SP, Brasil

3.1.2. *Abstract*

Correlations between XLA clinical phenotype severity and *BTK* genetic defects have been inconclusive. Mutations in *BTK* are very heterogeneous with no single mutation accounting for more than 3% of patients. However, missense mutations are likely to impact more severely on XLA. Since *BTK* negatively regulates toll-like receptors (TLRs), we sought to investigate whether different mutations would selectively modulate TLR pathways, impacting the disease expression. Ten TLRs signaling-related target genes were chosen to be individually quantified by RT-qPCR in XLA patients harboring missense (n = 3) and nonsense (n = 5) *BTK* mutations in comparison to healthy matched control subjects (n = 17). *BTK*, *IRAK2*, *PIK3R4*, *REL*, *TFRC* and *UBE2N* were predominantly downregulated while *RIPK2*, *TLR3*, *TLR10* were under- or overregulated with *TLR6* being mainly upregulated. The missense XLA group was characterized by a significant downregulation of *IRAK2*, *PIK3R4*, *REL* and *TFRC*, and upregulation of *TLR3* and/or *TLR6*. *TLR3*, *TLR6*, and *TLR10* hypo-expression may be associated to a higher susceptibility to bacterial or viral infections while their hyper-expression might be involved in susceptibility to chronic inflammatory conditions, such as arthritis or inflammatory bowel disease. Our results shed light on the genotype-phenotype correlations in XLA, particularly in the context of clinical manifestations that are

predominantly inflammatory, as opposed to those with a primarily infectious character.

Key-words: Bruton tyrosine kinase; B-Lymphocytes; Gene Expression Profiling; X- linked Agammaglobulinemia; Toll-like receptors.

3.1.3. Introduction

The defect in X-linked agammaglobulinemia (XLA) resides in genetic mutations in the Bruton tyrosine kinase (BTK), a main regulator in B-cell development (1). Failure to produce mature B-lymphocytes associated with an unsuccessful Ig heavy chain rearrangement characterizes this primary antibody immune deficiency. Mutations in all five domains of *BTK* have been demonstrated to lead to XLA with the most common class of changes being missense (2). In addition to mutations, numerous variants or polymorphisms have been found. Most mutations lead to truncation of the enzyme, with those in CpG dinucleotides being the most common mutation events in XLA (2). Recently, two large cohort series of XLA patients have been reported (3, 4). In the Italian study, 157 XLA patients belonging to 125 families were genetically characterized. *BTK* sequencing revealed 104 different mutations, among which 20 are recurrent and 18 are novel. Mutations were divided in five separate groups (missense, nonsense, indels, splicing and deletions), being missense that most frequent (49%), followed by indels (18%), nonsense (17%), and mutations affecting splice sites (12%), with a minor incidence of large deletions (4%). Among the 18 novel mutations, missense and nonsense were the most frequent (8 and 7, respectively), followed by mutations affecting splice sites, indels, and large deletions (1 in each category). The correlation between patients' symptoms with each of the five groups of mutations did not reveal a significant genotype-phenotype correlation in XLA either at diagnosis or during follow-up (3). Chen et al. reported 174 patients with XLA and underlined the need of further investigations to fully elucidate the genotype-phenotype correlation (4).

Toll-like receptors (TLRs) belong to an evolutionarily conserved family of receptors with a known role in the innate immunity by sensing structurally conserved molecules derived from microorganisms. TLRs are glycoproteins of type I integral membranes with homology to interleukin (IL)-1R in the cytoplasmic region. They also have an N- terminal in the extracellular domain with leucine-rich repeats and one transmembrane domain that activates a cytosolic signaling domain called TIR domain containing adaptor protein (5), which allows for the recognition of pathogen-associated molecular patterns, such as lipids, lipoproteins and nucleic acids. All cellular types, including dendritic cells,

phagocytes, B-lymphocytes and endothelial cells, express TLRs (6, 7). The mammalian TLR family consists of 13 members, being 10 different TLRs already identified in humans and 12 in mice (8). The activation of pattern recognition receptors triggers intracellular pathways which culminate in the induction of inflammatory cytokines, chemokines and type I interferons, which in turn promote the recruitment of leucocytes and other antigen-presenting cells (9).

BTK interacts with the TIR domain of specific TLRs – 4, 6, 8 and 9 – and associates with the signaling complex components such as MYD88 innate immune signal transduction adaptor, TIRAP (TIR domain containing adaptor protein) and IRAK1 (IL-1 receptor associated kinase 1) to activate the nuclear factor kappa B (NFkB) which generates inflammation by transcribing proinflammatory cytokines (10-13). In XLA patients, BTK impairment has been shown to interfere with the production of lipopolysaccharide (LPS)-induced cytokines (tumor necrosis factor, IL-1 beta, IL-6 and IL-10) by TLRs (14-17). XLA patients are susceptible to encapsulate bacterial infections but not to viral infection. A notable exception is the usually deadly echovirus-induced meningoencephalitis (Echoviruses are a type of Enterovirus, which is a genus of viruses that includes polioviruses, coxsackieviruses, and many others), which is frequently associated with dermatomyositis-like syndrome (18). Further, a clinical picture of autoimmune and/or inflammatory conditions such as arthritis and inflammatory bowel disease (IBD) develops in some patients (19). Low TLR activity may contribute to the high susceptibility to infections while its hyperactivity is associated with some chronic inflammatory diseases, including cardiovascular inflammation and arthritis (12, 20). BTK inhibitors have been associated with prophylaxis of rheumatoid arthritis (RA) because BTK activates downstream of the B-cell receptor and Fc receptors in immunoglobulins (21). Nevertheless, BTK inhibitors do not recapitulate the XLA phenotype (22).

XLA-associated symptoms of arthritis, IBD or other inflammatory conditions have been described (19, 23, 24), with IBD/enteritis diagnosed in up to 10% of patients (23). The risk of these unusual complications in XLA patients is low possibly due to the benefits of the immunomodulation exerted by the immunoglobulin treatment. On the other hand, a recent Chinese retrospective study of 98 XLA patients reported that patients complicated with arthritis were 45 (45.9%) in association with a higher incidence of BTK missense mutations (25), which emphasizes a potential genotype-phenotype correlation.

By evaluating specific changes in the TLR signaling pathway in a pilot molecular study, we aim to shed light on the effect of different *BTK* mutations on XLA clinical

manifestations, its diversity and severity.

3.1.4. Methods

3.1.4.1. Subjects

Eight XLA patients were diagnosed according to the criteria of the International Union of Immunology Societies (26); and the World Health Organization Scientific Group for primary immunodeficiency diseases (27): B-lymphocytes CD19+ below 2%, decrease or absence of all subtypes of immunoglobulins in serum and clinical history of recurrent bacterial infection. All patients were under intravenous human immunoglobulin therapy. Clinical data and sample collections were conducted between 2015 and 2018. Their demographic, laboratorial and clinical characteristics are described in Tables 1 and 2. Three patients, XLA01-03, harbor missense mutations. In XLA01 and XLA02, a point mutation leads to an amino acid change, respectively in exons 2 (PH domain) and 18 (TK domain). In XLA03, the point mutation (exon 2; PH domain) leads to an amino acid change that causes an aberrant splicing and deletion of 23 nucleotides at the 3-end of exon 2. Healthy male age-matched control individuals were used in all experiments.

Total blood count and the inflammatory markers – erythrocyte sedimentation rate, ferritin and C-reactive protein – were tested for controls and patients in the Division of Clinical Pathology of the “Hospital de Clínicas da UNICAMP”. All individuals considered in this study signed a consent form and the research project was authorized by the Research Ethics Committee of the School of Medical Sciences of University of Campinas (FCM-UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil (CEP #1176/2011).

3.1.4.2. Experiments

For all reagents and kits used in this study instructions were always in accordance with the standards of the manufacturers.

- ***Gene expression by Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)***

Absolute and relative quantifications were assessed by a “StepOnePlus™ Real-Time PCR System”. All RT-qPCR reagents were acquired from Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA 02451, USA.

- ***Total RNA extraction from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and***

complementary DNA (cDNA) synthesis

Six mL of peripheral blood samples were collected in 6 mL-tubes (VACUETTE®) containing EDTA as anticoagulant from each subject (patients and controls). After centrifugation at 2000 x g for 15 min, buffy coats were removed and added to 1200 µL “RNAlater™ Stabilization Solution”. PBMC total RNA was extracted using the “RiboPure™ RNA Purification Kit, blood” and reverse transcribed into cDNA with the “High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor”.

RNA quantification was evaluated by fluorometry (Qubit® 2.0 Fluorometer) and RNA purity by spectrophotometry (NanoDrop 2000). The RNA integrity number of samples was determined by Bioanalyzer 2100 Expert (B.02.08. SI648) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Only qualified RNA samples were converted into cDNA.

- ***Absolute and relative quantifications***

Absolute quantifications confirmed that 10 ng cDNA were adequate for relative quantifications, whose reactions were run as triplicates in 6.25 µL “TaqMan™ Universal Master Mix II, with UNG”, 0.625 µL of the respective primer and 0.625 µL purified and deionized H₂O with a 10 ng cDNA sample.

3.1.4.3. Data analyses

Absolute and relative gene expression quantification data were generated and analyzed by the “StepOne Software version 2.3”. Quantifications with a difference of more than 0.3 CT-values (cycle threshold-values) were always removed from the analyses. The “software GraphPad Prism 5” was applied to the statistical analysis (GraphPad Prism version 5.04 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, (<http://www.graphpad.com>)). Three specific tests were used and P values < 0.05 were considered significant.

The Wilcoxon matched-pairs signed rank test allowed, for each target gene and individual patient, the comparison of relative quantification data to controls, which were always calibrated to 1.0 (relative quantification). For the two youngest patients, XLA04 and XLA05, five pairs were created (e.g., five controls); for the other six, comparisons were made considering 12 controls. Furthermore, all relative quantification data were correlated according to the Spearman nonparametric test, including the patients’ ages.

3.1.5. Results

3.1.5.1. Single gene expression

The *BTK*, *IRAK2*, *PIK3R4*, *REL*, *TFRC* and *UBE2N* targets were predominantly hypo-expressed, whereas *RIPK2*, *TLR3* and *TLR10* did not show a specific predominance, with hypo- or hyper-expression. *TLR6* was the only gene that was predominantly hyper-expressed.

As expected, the downregulation of *BTK* was found for all patients; however, an intriguing exception was seen for XLA03, who is known to have a *BTK* downregulation at the protein level (28), but showed a significant *BTK* hyper-expression ($P = 0.001$) (Figure 1 and 2). It is conceivable that the type of mutation may affect *BTK* expression, with nonsense mutations directing to RNA decay and *BTK* hypo-expression (28). However, XLA03 (missense mutation) represents the first description of a *BTK* hyper-expressed, as a feasible mutational compensatory mechanism. Even if inefficient, since the protein will always be defective, further studies on this patient could clarify on *BTK* expression regulators whereas the molecular mechanisms that led to the *BTK* upregulation in this patient are unclear. It is important to stress that the youngest patients, XLA04 and XLA05, were compared to only five control individuals instead of 12. This may have directly affected the significance of our results. For this reason, we have remarked the threshold of significance ($0.1 > P > 0.05$) for some data. For XLA04 and XLA05, *BTK* was under-regulated with a P value of 0.0625, while for other patients the P value reached 0.0034 for XLA02 and 0.0005 for the remaining patients.

Patients XLA01-03, who harbor a *BTK* missense mutation, had a marked downregulation for *IRAK2*, *PIK3R4*, *REL* and *TFRC* (Figure 2). With the exception of *REL*, XLA09 followed a similar pattern. Differently of the nonsense group (the other five patients in our cohort), gene expression results were very similar for the patients into the missense group.

The expressions of *IRAK2*, which plays a central role in TLR signaling to NF κ B (29), and *PIK3R4* showed a significant positive correlation ($P = 0.0218$). *IRAK2* is an adapter in the TLR-MYD88-TRAF6 complex and might allow the downstream activation of NF κ B, regulating inflammation (30). Furthermore, *IRAK2* has been identified as a contributor to ER stress-induced cell death via ERN1/DDIT3 (also known as ERE1/CHOP) signaling (31).

All the three patients harboring a *BTK* missense mutation showed a significant downregulation of *REL*, which belongs to the NF κ B complex subunits gene family. Four other genes are members of this family: *RELA*, *RELB*, *NFKB1* and *NFKB2*, respectively

encoding for p65, RELB, p50/p105 and p52 (32). The pleiotropic transcription factor NFkB is a homo- or heterodimeric complex formed by the above mentioned REL-like domain-containing proteins. Different dimer combinations act as transcriptional activators or repressors, being the heterodimer RELA/REL a transcriptional activator (33). XLA01-03 and XLA09 had a markedly *TFRC* downregulation ($P \leq 0.0122$). The *TFRC* protein is a cell surface receptor necessary for cellular iron uptake by the process of receptor-mediated endocytosis (34). *TFRC* is downregulated in inflammatory macrophages (M1) but upregulated in those which are alternatively activated (M2) (35). This receptor is required for erythropoiesis and neurologic development and its deficiency is known to markedly affect normal maturation of thymocytes, and less seriously the development of B-cells (34).

The expression of *RIPK2* was quite variable in patients (Figure 1). *RIPK2* was hypo-expressed for XLA01 ($P = 0.0010$) and XLA07 ($P = 0.0005$), but hyper-expressed for XLA06 ($P = 0.0005$) and XLA09 ($P = 0.0049$). The remaining patients did not show any significance for *RIPK2* expression. Also, no significant correlation was found for the expression of *RIPK2*. This serine/threonine/tyrosine kinase plays a primordial role in modulation of innate and adaptive immune responses, particularly upon stimulation by bacterial peptidoglycans, which activates nucleotide binding oligomerization domain containing 1 and 2 (NOD1 and NOD2), oligomerizing and recruiting *RIPK2* through caspase recruitment domain containing (CARD)-CARD domains (36). In different ways, *RIPK2* participates in signaling pathways which culminate in NFkB activation (37).

BTK plays a role in the sensing of microbes via multiple TLRs, including TLR2, TLR3, TLR4, TLR7/8, and TLR9 on human and mouse macrophages and dendritic cells (38) although it have been demonstrated that the lack of BTK in XLA neutrophils does not impair functional responses to TLR signals (LPS, for TLR4; an imidazoquinoline compound, for TLR7/8) (39). In regard to the TLR genes and *UBE2N*, a prevalent over-regulation was seen in the missense group. Likewise, for XLA09, we found a meaningful over-regulation for *TLR6* ($P = 0.0005$) and *TLR10* ($P = 0.0093$). On the other side, TLR genes and *UBE2N* were mostly under-regulated for XLA04-07, who are the youngest patients in our cohort. Exceptionally, *TLR6* was hyper-expressed for XLA05 ($P = 0.0313$).

UBE2N (also known as UBC13) is an E2 ubiquitin-conjugating enzyme that promotes TRAF6 K63-linked ubiquitination and NFkB activation, being strongly implicated in inflammation and immune response pathways (40). Also, this important enzyme is associated with many different cancer types and viral, bacterial and parasitic infections (40). Its overregulation contributes to a proinflammatory scenario (40). *UBE2N* overregulation was

detected in two missense patients, XLA01 and XLA03, and XLA09; however, this upregulation was in the threshold of the significance ($P = 0.0640$). In an opposite manner, XLA04-06 had a marked *UBE2N* under-regulation. The meaning of these results may be directly related to their TLR expression and signaling.

Finally, the expressions of *TLR3*, *TLR6*, *TLR10* and *UBE2N* were all positively correlated with patient's age ($0.0368 \geq P \geq 0.0218$). The highest correlation was between the expressions of *TLR6* and *TLR10* ($P = 0.0004$). Besides, all pairs composed by *UBE2N* and the three TLR genes had a significant and positive correlation ($0.0279 \geq P \geq 0.0107$). Taking all 45 comparison pairs for all the 10 targets into account, the only meaningful negative correlation was between *BTK* and *REL* ($P = 0.0368$). *RIPK2* and *TFRC* were not correlated with any of the other genes.

3.1.6. Discussion

BTK mutation consequences analyzed in the XLA scenario revealed a complexity through numerous signaling pathways affecting the expression of hundreds of genes, proteins and molecular regulators (41). *BTK* functions in the immune system analyzed as a whole – which may differ in specific cell lines and subgroups (39, 42, 43) – have not been completely elucidated notwithstanding its well-known role as a key regulator of B-cell development (38). Accordingly, correlations between the XLA clinical manifestation diversity/severity and the genetic defect (*BTK* mutation type) are inconclusive (4, 44). Mutations in *BTK* are very miscellaneous with no single mutation accounting for more than 3% of patients. Missense mutations seem to impact more severely on XLA (23, 44). Autoimmunity and/or chronic inflammation in XLA may be directly related to TLR signaling malfunction, leading to complications that are consistent with a diagnosis of arthritis, IBD or other inflammatory conditions (19, 23). Large studies described the high morbidity and mortality of XLA patients despite progress in diagnosis and treatment (3). Regional differences were shown in the frequency of IBD and enteroviral meningoencephalitis complications that were found to be more prevalent in South America patients (24).

Our results show a high variability for the expression of TLR signaling-associated genes in XLA patients, with possible outcomes on clinical manifestations. Regardless individual differences and even epigenetics, we start from the presupposition that, for each patient, TLR signaling gene expression dysregulation is a mutational consequence of an absent or defective *BTK*. Lee et al. have demonstrated that *BTK* directly phosphorylates *TLR3*, playing a critical role in initiating its signaling (45). As a nucleotide-sensor found on

the surface of the membranes of the endosomes, this receptor has a function in viral infections since it recognizes double stranded RNA. TLR3 induces the inflammatory response and cytokine secretion (particularly type I interferons) by NFkB activation via the Toll like receptor adaptor molecule 1 (TICAM1; also known as TRIF) (45). In the absence of BTK, TLR3-induced PI3K, AKT and MAPK signaling and activation of NFkB, interferon regulatory factor 3 (IRF3), and AP-1 transcription factors were all defective, also compromising the formation of the downstream TICAM1-RIPK1-TBK1 complex. In addition, BTK-deficient macrophages failed to secrete inflammatory cytokines and interferon beta 1 (IFNB1) upon TLR3 stimulation (45). In missense mutations, the accumulation of a defective BTK may be involved in endoplasmic reticulum stress (28). Zeng and colleagues reported that XBP1 couples endoplasmic reticulum stress to augmented IFNB1 induction via a cis-acting enhancer in macrophages (46). IFNB1 has been considered the primary cytokine that mediates macrophage type I interferon responses to the TLR4 agonist LPS (46, 47). We have wondered if TLR3 agonists would have a similar effect, considering the close relation between IFNB1 and TLR3 (48).

XLA patients are known to respond to many viral infections; however, for echovirus, coxsackie and live polio vaccine virus, these responses are compromised and may cause progressive or chronic enteroviral meningoencephalitis, arthritis or enteritis (49, 50). *TLR3* hypo-expression may be associated to a higher susceptibility to viral infections, as seen for patient XLA07, who had cytomegalovirus and hepatitis B infections. On the other side, the *TLR3* hyper-expression, found in patients XLA01 and XLA02, may be involved in their susceptibility to chronic inflammatory conditions. Our data on *TLR3* expression dysregulation reinforces the hypothesis of Barmettler et al. that XLA patients with missense *BTK* mutations show more clinical phenotypes than nonsense ones (23).

TLR6 plays an important role in the innate immune response to Gram-positive bacteria and fungi, specifically recognizing diacylated and triacylated lipopeptides (51). A correlation between the expressions of *TLR6* and *TLR10* was noticed for XLA patients ($P = 0.0004$). Considering the 10 singly quantified genes, *TLR6* had the highest upregulation in XLA patients. A significant *TLR6* downregulation was observed only for XLA06. In fact, as expected, this patient was clinically characterized by pneumonias, bacterial infections, recurrent sinusitis and diarrhea, bronchiectasis and neutropenia. Conversely, XLA09 showed the highest *TLR6* mRNA level ($P = 0.0005$), having, in some ways, similar manifestations to XLA06, such as chronic lung disease, bacterial rhinosinusitis and severe diarrhea, but his condition was worsened by a diffuse parietal abdominal pain associated with a sigmoid

inflammatory process. *TLR6* overregulation seems to favor inflammation, which becomes chronic over time.

TLR10 is a modulatory pattern-recognition receptor with mainly inhibitory properties and its hyper-expression in XLA patients might indicate an anti-inflammatory signaling. It is an orphan extracellular membrane receptor with no ligand specificity. Blocking *TLR10* by antagonistic antibodies enhances proinflammatory cytokine production, including IL-1 beta, specifically after exposure to *TLR2* ligands (52, 53). This modulatory property seems to follow the expression of *TLR6* in our patients. Indeed, Oosting et al. emphasized that it is highly likely that the inhibitory effects of *TLR10* are mediated through an interaction of *TLR10* with *TLR2* and perhaps also with *TLR1* and *TLR6* (52). For those manifesting chronic inflammatory conditions, we found a *TLR10* hyper-expression, while its hypo-expression was seen for XLA06, who was prone to bacterial infections. Differently, patient XLA04 also had the downregulation of *TLR10*, without a *TLR6* upregulation. As the youngest patient in our cohort, his *TLR10* quantification was in accordance with the positive correlation with patient's age ($P = 0.0218$). His clinical manifestations were mild, mainly characterized by urinary tract infections.

Our patients carrying a *BTK* missense mutation (XLA01-03) showed a striking hypo-expression of *IRAK2*, *PIK3R4*, *REL* and *TFRC*, accompanied by a marked hyper-expression of *TLR3* and/or *TLR6*.

Wang and colleagues have identified a functional human *IRAK2* variant that may genetically affect colorectal cancer, showing an impairment of downstream *IRAK* signaling at the level of *TRAF6* ubiquitination, resulting in subsequent modulation of *IL-6* transcription (54). Importantly, patient XLA03 was diagnosed with hyperplastic polyps of rectum. *PIK3R4*, also known as *VPS15*, is a critical agent for autophagosome and the biogenesis and trafficking of endosomes (55). In innate immunity, autophagy is responsible for the removal of intracellular microbes by digestion in autolysosomes, distribution of cytosolic microbial antigens to pattern recognition receptors and as an antimicrobial effector of *TLRs* and other signaling of pattern recognition receptors (56). Furthermore, deficient autophagy due to aberrant mutations has been associated to human inflammatory disorders such as Crohn's disease (56). In fact, gastroenteric illnesses were present in the missense group (Table 1). The hypo-expression of both these genes, if directly associated with their protein levels in patients, could have a strong participation on the molecular pathogenesis of the aforementioned clinical manifestations. Furthermore, although being a different gene of the same family, an autosomal recessive agammaglobulinemia was recently associated to a homozygous mutation

in PIK3R1 (57), which emphasize the role of class IA phosphoinositide 3 kinases in immune function and regulation. Inasmuch as REL acts in the survival and proliferation of B-lymphocytes, mutations or amplifications of this proto-oncogene are associated with B-cell lymphomas, including Hodgkin's lymphoma (58). In addition, REL single nucleotide polymorphisms are associated with susceptibility to ulcerative colitis and RA (59, 60); and mutations in *RELB* and *NFKB1* have been associated with primary immunodeficiencies (61, 62). The formation of rectum hyperplastic polyps in patient XLA03, who had the lowest mRNA level for *REL*, may also be associated with this finding (63). A study in *Rel^{-/-}* knockout mice with azoxymethane/adenocarcinoma dextran sulfate for colitis-associated colon cancer stimulation showed a higher susceptibility to disease by increasing formation and proliferation rates of intestinal polyps (64). It is crucial to understand if *REL* downregulation is a direct consequence of this patient's *BTK* mutation.

Along with *IRAK2*, *PIK3R4* and *REL*, *TFRC* completes the tetrad of downregulated genes in our XLA missense group. Downregulation points to a proinflammatory response in our XLA patients. Moreover, as it is associated with combined immunodeficiency, *TFRC* has importance in adaptive immunity (65). The XLA patients who had the downregulation of *TFRC* showed conditions associated to chronic inflammation. Inflammatory macrophages (M1), which act in the first line of defense of the pathogen invasion, revealed low expression of *TFRC* and high ferritin. The opposite occurred for alternately activated macrophages (M2), with the function of recycling the Fe⁺⁺ of the inflammatory process, which expressed a high amount of these proteins (35).

RIPK2 upregulation, seen in patients XLA06 and XLA09, could be involved in clinical manifestations related to their susceptibility to bacterial infection (Table 1). Further studies on the expression of *NOD2* in XLA could enrich our results. Both wild type *NOD2* and *NOD2* polymorphisms/mutations can independently lead to aberrant signaling through *RIPK2*, which can lead to immune dysregulation that is the basis for multiple inflammatory diseases. Indeed, the role of the *NOD2*-*RIPK2* complex in inflammatory disease has been contradictory. Whereas loss-of-function *NOD2* mutations cause Crohn's disease, gain-of-function mutations cause early-onset sarcoidosis. Besides, wild type *NOD2* and wild type *RIPK2* activity has been involved in asthma, inflammatory arthritis and multiple sclerosis (66).

UBE2N expression was positively correlated with the expression of the all three TLRs quantified and patient's age. Interesting, in spite of his nonsense mutation, patient XLA09 gene expression profile was close to that of patients harboring a missense mutation, at

least according to our results on the TLR signaling gene expression. Zhang and colleagues described a mechanism by which STAT3 operates as a pivotal transcriptional repressor on UBE2N, which should be investigated in XLA patients. STAT3 is able to modulate NFkB activity by regulation of UBE2N abundance. They have suggested this pathway as playing important roles in restraint of inflammation (40). Moreover, UBE2N has been investigated as a promising target for therapeutic modulation because it possesses several desirable traits as a target for inhibition.

In conclusion, despite the small cohort and the absence of protein analyses, our results demonstrate that *BTK* variants may cause a significant impairment of TLR signaling, but with a difficult and complex functional impact prediction due to the vast spectrum of *BTK* mutations reported in these patients. The significant downregulation of *IRAK2*, *PIK3R4*, *REL* and *TFRC*, accompanied by the upregulation of *TLR3* and/or *TLR6* in patients harboring *BTK* missense mutations suggest a TLR pathway-gene expression signature. This finding has the potential to contribute on the prognosis to direct the treatment and should be confirmed in other XLA patients worldwide.

3.1.7. Acknowledgements

We thank all patients, their families, and the control volunteers for their generous co-operation; the Central Laboratory of High Performance Technologies (LaCTAD), where RNA integrity number detection was performed, and the Laboratory of Virus/FCM for generous provision of the StepOnePlus™ Real-Time PCR System.

3.1.8. List of abbreviations

BTK, Bruton tyrosine kinase; CARD, caspase recruitment domain containing; cDNA, complementary DNA; FC, fold change; IBD, inflammatory bowel disease; IFNB1, interferon beta 1; IL, interleukin; IRF3, interferon regulatory factor 3; LPS, lipopolysaccharide; NFkB, nuclear factor kappa B; NOD1, nucleotide binding oligomerization domain containing 1; NOD2, nucleotide binding oligomerization domain containing 2; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; RA, rheumatoid arthritis; RT-qPCR, Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction; TICAM1, toll like receptor adaptor molecule 1; TLRs, Toll-like receptors; XLA, X- linked agammaglobulinemia.

3.1.9. Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest in regard to the research

presented in this paper.

3.1.10. Funding

Research supported by grants #2011/50589-5 and #2012/06194-9, São Paulo Research Foundation (FAPESP) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). MT, TAE and LFM were recipient of scholarships provided by CAPES.

3.1.11. Figures and Tables

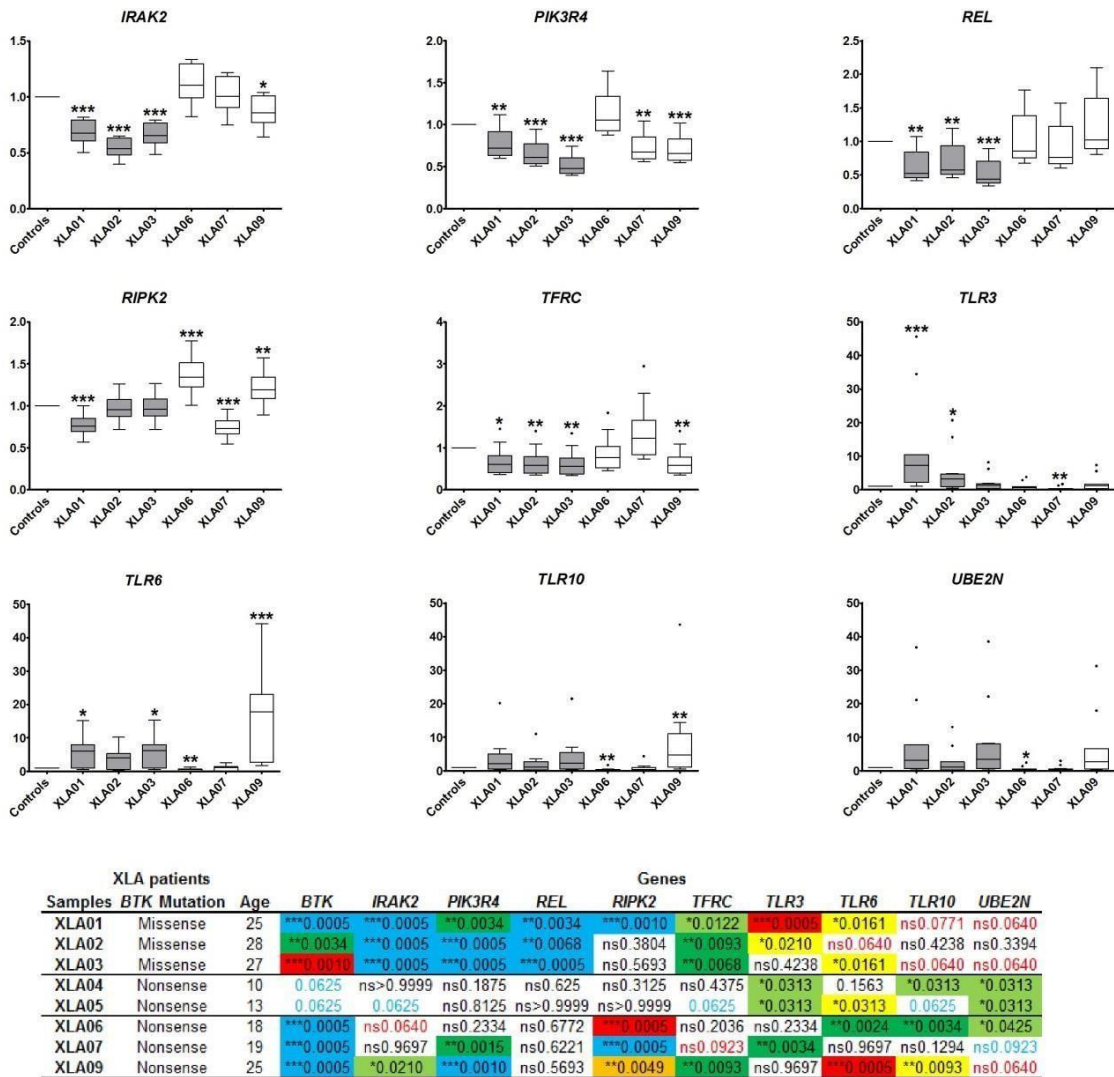


Figure 1. Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) expression of *IRAK2*, *PIK3R4*, *REL*, *RIPK2*, *TFRC*, *TLR3*, *TLR6*, *TLR10* and *UBE2N* in X-linked agammaglobulinemia (XLA) patients. *GAPDH* and *HPRT1* were used as reference genes. Control samples were calibrated as reference samples and their relative quantification were always 1.0. All quantifications for patients were benchmarked to the reference samples. Filled boxes correspond to patients with missense *BTK* mutations (XLA01-03) while clear boxes, those with mutations that lead to a premature stop codon (XLA06, XLA07 and XLA09). For statistical analyses, patients were separated in two groups: children (XLA04 and XLA05; $n_{\text{controls}} = 5$) and young XLA patients (XLA01-03, XLA06, XLA07 and XLA09; $n_{\text{controls}} = 12$). Children patients are not represented by box plots. The Wilcoxon matched-pairs signed rank test was used for the comparison between pairs. All P values are described in the table below the figure. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns, non-significant. Significant hyperexpressions were marked with hot colors, e.g., yellow (*), orange (**), and red (***). Cold colors were used for meaningful hypoexpressions: light green (*), green (**), and light blue (***). P values in the threshold of significance ($0.1 > P > 0.05$) were shown with red (upregulation) or blue (downregulation) fonts.

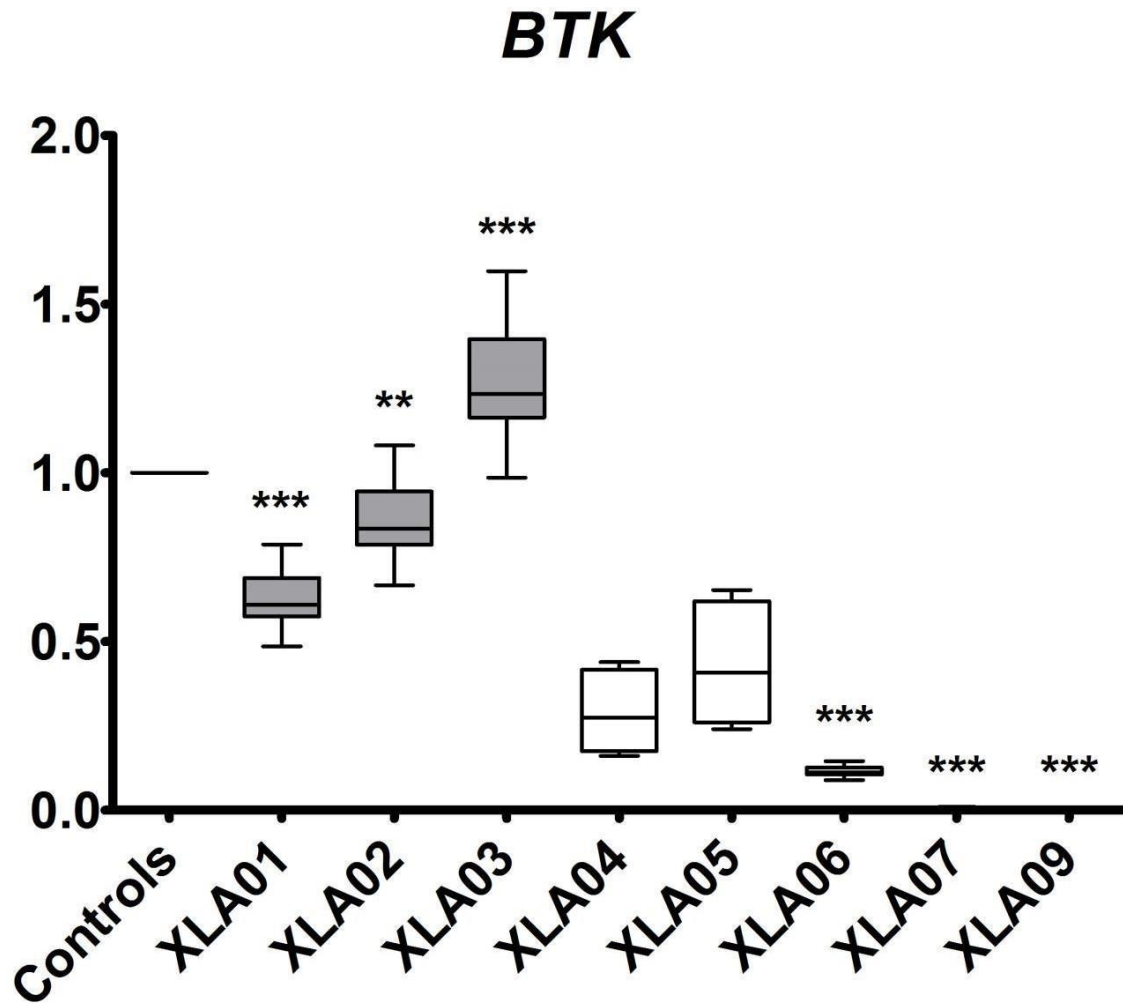


Figure 2. Expression of *BTK* in PBMC from XLA patients and healthy controls. Relative expression of the *BTK* gene in patients with mutations that lead to a premature stop codon (clear boxes) and patients with missense mutations (filled boxes). The y-axis represents the quantitative data of the relative mRNA expression of the *BTK* gene. Data from RT-qPCRs were generated from *GAPDH* and *HPRT1* as reference genes, in combination. Data are shown as median with interquartile range (whiskers: minimum to maximum). The Wilcoxon matched-pairs signed rank test was carried out for statistical analysis, in which all patients were compared to 12 healthy matched controls, except for XLA04 and XLA05 (young patients), who were compared to five healthy matched controls (**P < 0.01; ***P < 0.001).

Table 1. Mutational and clinical features of the studied X-linked agammaglobulinemia patients (XLA).

Patient	Mutations		Clinical manifestation
	Nucleotide (Type)	Protein (Domain)	
XLA01	c.215G>T (MS)	R28L (PH)	Atopic dermatitis, urticaria / Obesity and dyslipidemia / UTI / eye infections / chronic cough with phlegm / IBD and diarrhea / testicular cancer
XLA02	c.1970G>A (MS)	G613D (TK)	Chronic non-specific inflammation / Celiac disease linked to malabsorption
XLA03	c.251A>G (MS)	Y40C* (PH)	Vaccine-associated paralytic poliomyelitis / Erosive esophagitis / Hyperplastic polyps of rectum / Non-specific chronic gastritis (<i>Helicobacter pylori</i> positivity) / Recently osteopenia
XLA04	c.718C>T (NS)	Q196X (TH)	UTI
XLA05	c.1041delT (NS)	A347X402 (SH2)	Left knee arthritis, chronic lung disease / Asthma and left hearing loss / Sore throat with mucus
XLA06	c.1135insT (NS)	T324X348 (SH2)	Bacterial infections of the upper and lower respiratory tract (pneumonia), recurrent sinusitis and diarrhea / Bronchiectasis.
XLA07	IVS5+1G>A (NS)	Exon 5 skipping (PH)	CMV, infectious mononucleosis, hepatitis A and B / Anal ulcer requiring surgery
XLA09	IVS5+1G>A (NS)	Exon 5 skipping (PH)	Chronic lung disease / Bacterial rhinosinusitis / Severe diarrhea, fever (38.5° C), diffuse abdominal pain / Parietal abdominal pain associated with inflammatory processes of the sigmoid colon

Family history is positive for all patients. XLA07 and XLA09 are brothers. The variants shown are described using the NM_000061.2 transcript reference sequence. For mutations: MS, missense; NS, nonsense or mutations which lead to a premature stop codon. For clinical manifestation: UTI, urinary tract infection; CMV, cytomegalovirus.

Table 2. Demographic and laboratorial features of the studied X-linked agammaglobulinemia patients (XLA).

Patient	Age at:			BTK	Ig levels before diagnosis			ESR	CRP	Ferritin	WBC
	Collection	Onset	Diagnosis	(%)	(mg/dL)						
				(> 95%)	IGM	IGG	IGA	(≤ 10 mm)	(≤ 3,0 mg/L)	(30 - 400 ng/mL)	(4.0 - 10.0 x 10 ³)
XLA01	25 y	4 y	6 y	26.0	16.8 (30-180)	632.0 (660-2120)	25.4 (68-500)	13.00	18.50	214.90	18.61
XLA02	28 y	6 y	6 y	26.0	9.24 (30-180)	6.0 (660-2120)	190.0 (68-500)	ND	5.03	ND	4.45
XLA03	27 y	6 y	6 y	9.0	ND (30-180)	ND (660-2120)	3.0 (68-500)	ND	ND	ND	ND
XLA04	10 y	5 mo	11 mo	ND	9.8 (0-145)	101.3 (232-1411)	6.7 (0-83)	2.00	0.38	44.13	5.13
XLA05	13 y	3 mo	2 y 8 mo	39.0	22.0 (29-195)	149.0 (610-1610)	1.0 (40-289)	3.00	12.30	39.38	15.59
XLA06	18 y	4 mo	2 y 8 mo	4.5	7.0 (30-180)	1100.0 (660-2120)	< 6.0 (68-500)	7.00	2.09	64.96	6.15
XLA07	19 y	ND	1 y 8 mo	3.0	ND (30-180)	ND (660-2120)	ND (68-500)	48.00	90.00	16.54	15.60
XLA09	28 y	ND	4 y	2.5	51.0 (52-180)	44.0 (660-2120)	< 40.0 (68-500)	ND	ND	ND	ND

For age: y, years; mo, months. ND, not determined. Numbers between brackets are laboratory reference values. The unspecific inflammatory markers ferritin, C-reactive protein (CRP) and erythrocyte sedimentation rate (ESR) showed higher levels in patients with a high leukocyte number. WBC, white blood cell. Significant neutropenia was identified several times in the XLA06 patient.

3.1.12. References

1. Rawlings DJ, Witte ON. Bruton's tyrosine kinase is a key regulator in B-cell development. *Immunol Rev* (1994) 138:105-19. Epub 1994/04/01. doi: 10.1111/j.1600-065x.1994.tb00849.x. PubMed PMID: 8070812.
2. Valiaho J, Smith CI, Vihinen M. BTKbase: the mutation database for X-linked agammaglobulinemia. *Hum Mutat* (2006) 27(12):1209-17. Epub 2006/09/14. doi: 10.1002/humu.20410. PubMed PMID: 16969761.
3. Lougaris V, Soresina A, Baronio M, Montin D, Martino S, Signa S, et al. Long-term follow-up of 168 patients with X-linked agammaglobulinemia reveals increased morbidity and mortality. *J Allergy Clin Immunol* (2020) 146(2):429-37. Epub 2020/03/15. doi: 10.1016/j.jaci.2020.03.001. PubMed PMID: 32169379.
4. Chen XF, Wang WF, Zhang YD, Zhao W, Wu J, Chen TX. Clinical characteristics and genetic profiles of 174 patients with X-linked agammaglobulinemia: Report from Shanghai, China (2000-2015). *Medicine (Baltimore)* (2016) 95(32):e4544. Epub 2016/08/12. doi: 10.1097/MD.0000000000004544. PubMed PMID: 27512878; PubMed Central PMCID: PMC4985333.
5. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* (2010) 11(5):373-84. Epub 2010/04/21. doi: 10.1038/ni.1863. PubMed PMID: 20404851.
6. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* (2011) 30(1):16-34. Epub 2011/01/18. doi: 10.3109/08830185.2010.529976. PubMed PMID: 21235323.
7. Kawai T, Akira S. Regulation of innate immune signalling pathways by the tripartite motif (TRIM) family proteins. *EMBO Mol Med* (2011) 3(9):513-27. Epub 2011/08/10. doi: 10.1002/emmm.201100160. PubMed PMID: 21826793; PubMed Central PMCID: PMC3377094.
8. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors. *Curr Protoc Immunol* (2015) 109:14 2 1- 2 0. Epub 2015/04/08. doi: 10.1002/0471142735.im1412s109. PubMed PMID: 25845562.
9. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* (2009) 21(4):317-37. Epub 2009/02/28. doi: 10.1093/intimm/dxp017. PubMed PMID: 19246554; PubMed Central PMCID: PMC2721684.
10. Jefferies CA, Doyle S, Brunner C, Dunne A, Brint E, Wietek C, et al. Bruton's tyrosine kinase is a Toll/interleukin-1 receptor domain-binding protein that participates in nuclear factor kappaB activation by Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* (2003) 278(28):26258-64. Epub 2003/05/02. doi: 10.1074/jbc.M301484200. PubMed PMID: 12724322.
11. Hendriks RW, Yuvaraj S, Kil LP. Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. *Nat Rev Cancer* (2014) 14(4):219-32. Epub 2014/03/25. doi: 10.1038/nrc3702. PubMed PMID: 24658273.
12. Doyle SL, Jefferies CA, Feighery C, O'Neill LA. Signaling by Toll-like receptors 8 and 9 requires Bruton's tyrosine kinase. *J Biol Chem* (2007) 282(51):36953-60. Epub 2007/10/13. doi: 10.1074/jbc.M707682200. PubMed PMID: 17932028.
13. Jefferies CA, O'Neill LA. Bruton's tyrosine kinase (Btk)-the critical tyrosine kinase in LPS signalling? *Immunol Lett* (2004) 92(1-2):15-22. Epub 2004/04/15. doi: 10.1016/j.imlet.2003.11.017. PubMed PMID: 15081522.
14. Horwood NJ, Mahon T, McDaid JP, Campbell J, Mano H, Brennan FM, et al. Bruton's tyrosine kinase is required for lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med* (2003) 197(12):1603-11. Epub 2003/06/18. doi: 10.1084/jem.20021845. PubMed PMID: 12810683; PubMed Central PMCID: PMC2193950.
15. Sochorova K, Horvath R, Rozkova D, Litzman J, Bartunkova J, Sediva A, et al.

- Impaired Toll-like receptor 8-mediated IL-6 and TNF- α production in antigen-presenting cells from patients with X-linked agammaglobulinemia. *Blood* (2007) 109(6):2553-6. Epub 2006/11/09. doi: 10.1182/blood-2006-07-037960. PubMed PMID: 17090647.
16. Taneichi H, Kanegane H, Sira MM, Futatani T, Agematsu K, Sako M, et al. Toll-like receptor signaling is impaired in dendritic cells from patients with X-linked agammaglobulinemia. *Clin Immunol* (2008) 126(2):148-54. Epub 2008/02/14. doi: 10.1016/j.clim.2007.10.005. PubMed PMID: 18271077.
 17. Marron TU, Martinez-Gallo M, Yu JE, Cunningham-Rundles C. Toll-like receptor 4-, 7-, and 8-activated myeloid cells from patients with X-linked agammaglobulinemia produce enhanced inflammatory cytokines. *J Allergy Clin Immunol* (2012) 129(1):184-90 e1-4. Epub 2011/11/18. doi: 10.1016/j.jaci.2011.10.009. PubMed PMID: 22088613; PubMed Central PMCID: PMC3428022.
 18. Katamura K, Hattori H, Kunishima T, Kanegane H, Miyawaki T, Nakahata T. Non-progressive viral myelitis in X-linked agammaglobulinemia. *Brain Dev* (2002) 24(2):109-11. Epub 2002/03/14. doi: 10.1016/s0387-7604(02)00002-5. PubMed PMID: 11891104.
 19. Hernandez-Trujillo VP, Scalchunes C, Cunningham-Rundles C, Ochs HD, Bonilla FA, Paris K, et al. Autoimmunity and inflammation in X-linked agammaglobulinemia. *J Clin Immunol* (2014) 34(6):627-32. Epub 2014/06/10. doi: 10.1007/s10875-014-0056-x. PubMed PMID: 24909997; PubMed Central PMCID: PMC4157090.
 20. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* (2005) 5(6):446-58. Epub 2005/06/02. doi: 10.1038/nri1630. PubMed PMID: 15928677.
 21. Whang JA, Chang BY. Bruton's tyrosine kinase inhibitors for the treatment of rheumatoid arthritis. *Drug Discov Today* (2014) 19(8):1200-4. Epub 2014/04/12. doi: 10.1016/j.drudis.2014.03.028. PubMed PMID: 24721226.
 22. Crofford LJ, Nyhoff LE, Sheehan JH, Kendall PL. The role of Bruton's tyrosine kinase in autoimmunity and implications for therapy. *Expert Rev Clin Immunol* (2016) 12(7):763-73. Epub 2016/02/13. doi: 10.1586/1744666X.2016.1152888. PubMed PMID: 26864273; PubMed Central PMCID: PMC5070917.
 23. Barmettler S, Otani IM, Minhas J, Abraham RS, Chang Y, Dorsey MJ, et al. Gastrointestinal Manifestations in X-linked Agammaglobulinemia. *J Clin Immunol* (2017) 37(3):287-94. Epub 2017/02/27. doi: 10.1007/s10875-017-0374-x. PubMed PMID: 28236219; PubMed Central PMCID: PMC5414010.
 24. El-Sayed ZA, Abramova I, Aldave JC, Al-Herz W, Bezrodnik L, Boukari R, et al. X-linked agammaglobulinemia (XLA): Phenotype, diagnosis, and therapeutic challenges around the world. *World Allergy Organ J* (2019) 12(3):100018. Epub 2019/04/03. doi: 10.1016/j.waojou.2019.100018. PubMed PMID: 30937141; PubMed Central PMCID: PMC6439403.
 25. Qing-Qi R, Ya-Wen L, Huan C, Yu Z, Yun-Fei A, Xue-Mei T, et al. Retrospective study of 98 patients with X-linked agammaglobulinemia complicated with arthritis. *Clin Rheumatol* (2022). Epub 2022/02/17. doi: 10.1007/s10067-022-06095-1. PubMed PMID: 35171366.
 26. Bousfiha A, Jeddane L, Al-Herz W, Ailal F, Casanova JL, Chatila T, et al. The 2015 IUIS Phenotypic Classification for Primary Immunodeficiencies. *J Clin Immunol* (2015) 35(8):727-38. Epub 2015/10/09. doi: 10.1007/s10875-015-0198-5. PubMed PMID: 26445875; PubMed Central PMCID: PMC4659854.
 27. Primary immunodeficiency diseases. Report of a WHO scientific group. *Clin Exp Immunol* (1997) 109 Suppl 1:1-28. Epub 1997/08/01. PubMed PMID: 9274617.
 28. Teocchi MA, Domingues Ramalho V, Abramczuk BM, D'Souza-Li L, Santos Vilela MM. BTK mutations selectively regulate BTK expression and upregulate monocyte XBP1

- mRNA in XLA patients. *Immun Inflamm Dis* (2015) 3(3):171-81. Epub 2015/09/30. doi: 10.1002/iid3.57. PubMed PMID: 26417435; PubMed Central PMCID: PMC4578518.
29. Keating SE, Maloney GM, Moran EM, Bowie AG. IRAK-2 participates in multiple toll-like receptor signaling pathways to NFkappaB via activation of TRAF6 ubiquitination. *J Biol Chem* (2007) 282(46):33435-43. Epub 2007/09/20. doi: 10.1074/jbc.M705266200. PubMed PMID: 17878161.
 30. Rhyasen GW, Starczynowski DT. IRAK signalling in cancer. *Br J Cancer* (2015) 112(2):232-7. Epub 2014/10/08. doi: 10.1038/bjc.2014.513. PubMed PMID: 25290089; PubMed Central PMCID: PMC4453441.
 31. Benosman S, Ravanani P, Correa RG, Hou YC, Yu M, Gulen MF, et al. Interleukin-1 receptor-associated kinase-2 (IRAK2) is a critical mediator of endoplasmic reticulum (ER) stress signaling. *PLoS One* (2013) 8(5):e64256. Epub 2013/06/01. doi: 10.1371/journal.pone.0064256. PubMed PMID: 23724040; PubMed Central PMCID: PMC3665826.
 32. Wang S, Liu Z, Wang L, Zhang X. NF-kappaB signaling pathway, inflammation and colorectal cancer. *Cell Mol Immunol* (2009) 6(5):327-34. Epub 2009/11/06. doi: 10.1038/cmi.2009.43. PubMed PMID: 19887045; PubMed Central PMCID: PMC4003215.
 33. Liou HC, Hsia CY. Distinctions between c-Rel and other NF-kappaB proteins in immunity and disease. *Bioessays* (2003) 25(8):767-80. Epub 2003/07/25. doi: 10.1002/bies.10306. PubMed PMID: 12879447.
 34. Ned RM, Swat W, Andrews NC. Transferrin receptor 1 is differentially required in lymphocyte development. *Blood* (2003) 102(10):3711-8. Epub 2003/07/26. doi: 10.1182/blood-2003-04-1086. PubMed PMID: 12881306.
 35. Corna G, Campana L, Pignatti E, Castiglioni A, Tagliafico E, Bosurgi L, et al. Polarization dictates iron handling by inflammatory and alternatively activated macrophages. *Haematologica* (2010) 95(11):1814-22. Epub 2010/06/01. doi: 10.3324/haematol.2010.023879. PubMed PMID: 20511666; PubMed Central PMCID: PMC2966902.
 36. Tigno-Aranjuez JT, Asara JM, Abbott DW. Inhibition of RIP2's tyrosine kinase activity limits NOD2-driven cytokine responses. *Genes Dev* (2010) 24(23):2666-77. Epub 2010/12/03. doi: 10.1101/gad.1964410. PubMed PMID: 21123652; PubMed Central PMCID: PMC2994040.
 37. Witt A, Vucic D. Diverse ubiquitin linkages regulate RIP kinases-mediated inflammatory and cell death signaling. *Cell Death Differ* (2017) 24(7):1160-71. Epub 2017/05/06. doi: 10.1038/cdd.2017.33. PubMed PMID: 28475174; PubMed Central PMCID: PMC5520166.
 38. Weber ANR, Bittner Z, Liu X, Dang TM, Radsak MP, Brunner C. Bruton's Tyrosine Kinase: An Emerging Key Player in Innate Immunity. *Front Immunol* (2017) 8:1454. Epub 2017/11/24. doi: 10.3389/fimmu.2017.01454. PubMed PMID: 29167667; PubMed Central PMCID: PMC5682317.
 39. Marron TU, Rohr K, Martinez-Gallo M, Yu J, Cunningham-Rundles C. TLR signaling and effector functions are intact in XLA neutrophils. *Clin Immunol* (2010) 137(1):74-80. Epub 2010/07/17. doi: 10.1016/j.clim.2010.06.011. PubMed PMID: 20634142; PubMed Central PMCID: PMC2941555.
 40. Zhang H, Hu H, Greeley N, Jin J, Matthews AJ, Ohashi E, et al. STAT3 restrains RANK- and TLR4-mediated signalling by suppressing expression of the E2 ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13. *Nat Commun* (2014) 5:5798. Epub 2014/12/17. doi: 10.1038/ncomms6798. PubMed PMID: 25503582; PubMed Central PMCID: PMC4270087.
 41. Mirsafian H, Ripen AM, Leong WM, Chear CT, Bin Mohamad S, Merican AF. Transcriptome profiling of monocytes from XLA patients revealed the innate immune

- function dysregulation due to the BTK gene expression deficiency. *Sci Rep* (2017) 7(1):6836. Epub 2017/07/30. doi: 10.1038/s41598-017-06342-5. PubMed PMID: 28754963; PubMed Central PMCID: PMC5533715.
42. Bao Y, Zheng J, Han C, Jin J, Han H, Liu Y, et al. Tyrosine kinase Btk is required for NK cell activation. *J Biol Chem* (2012) 287(28):23769-78. Epub 2012/05/17. doi: 10.1074/jbc.M112.372425. PubMed PMID: 22589540; PubMed Central PMCID: PMC3390651.
 43. Murthy P, Durco F, Miller-Ocuin JL, Takedai T, Shankar S, Liang X, et al. The NLRP3 inflammasome and bruton's tyrosine kinase in platelets co-regulate platelet activation, aggregation, and in vitro thrombus formation. *Biochem Biophys Res Commun* (2017) 483(1):230-6. Epub 2016/12/31. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.12.161. PubMed PMID: 28034752.
 44. Conley ME, Broides A, Hernandez-Trujillo V, Howard V, Kanegane H, Miyawaki T, et al. Genetic analysis of patients with defects in early B-cell development. *Immunol Rev* (2005) 203:216-34. Epub 2005/01/22. doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00233.x. PubMed PMID: 15661032.
 45. Lee KG, Xu S, Kang ZH, Huo J, Huang M, Liu D, et al. Bruton's tyrosine kinase phosphorylates Toll-like receptor 3 to initiate antiviral response. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2012) 109(15):5791-6. Epub 2012/03/29. doi: 10.1073/pnas.1119238109. PubMed PMID: 22454496; PubMed Central PMCID: PMC3326448.
 46. Zeng L, Liu YP, Sha H, Chen H, Qi L, Smith JA. XBP-1 couples endoplasmic reticulum stress to augmented IFN-beta induction via a cis-acting enhancer in macrophages. *J Immunol* (2010) 185(4):2324-30. Epub 2010/07/28. doi: 10.4049/jimmunol.0903052. PubMed PMID: 20660350; PubMed Central PMCID: PMC2916979.
 47. Thomas KE, Galligan CL, Newman RD, Fish EN, Vogel SN. Contribution of interferon-beta to the murine macrophage response to the toll-like receptor 4 agonist, lipopolysaccharide. *J Biol Chem* (2006) 281(41):31119-30. Epub 2006/08/17. doi: 10.1074/jbc.M604958200. PubMed PMID: 16912041.
 48. Zhang L, Xiang W, Wang G, Yan Z, Zhu Z, Guo Z, et al. Interferon beta (IFN-beta) Production during the Double-stranded RNA (dsRNA) Response in Hepatocytes Involves Coordinated and Feedforward Signaling through Toll-like Receptor 3 (TLR3), RNA-dependent Protein Kinase (PKR), Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS), and Src Protein. *J Biol Chem* (2016) 291(29):15093-107. Epub 2016/05/27. doi: 10.1074/jbc.M116.717942. PubMed PMID: 27226571; PubMed Central PMCID: PMC4946926.
 49. Rudge P, Webster AD, Revesz T, Warner T, Espanol T, Cunningham-Rundles C, et al. Encephalomyelitis in primary hypogammaglobulinaemia. *Brain* (1996) 119 (Pt 1):1-15. Epub 1996/02/01. doi: 10.1093/brain/119.1.1. PubMed PMID: 8624673.
 50. Misbah SA, Spickett GP, Ryba PC, Hockaday JM, Kroll JS, Sherwood C, et al. Chronic enteroviral meningoencephalitis in agammaglobulinemia: case report and literature review. *J Clin Immunol* (1992) 12(4):266-70. Epub 1992/07/01. doi: 10.1007/BF00918150. PubMed PMID: 1512300.
 51. Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, van Gils JM, Deng J, Halle A, et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol* (2010) 11(2):155-61. Epub 2009/12/29. doi: 10.1038/ni.1836. PubMed PMID: 20037584; PubMed Central PMCID: PMC2809046.
 52. Oosting M, Cheng SC, Bolscher JM, Vestering-Stenger R, Plantinga TS, Verschuere IC, et al. Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2014) 111(42):E4478-84. Epub 2014/10/08. doi: 10.1073/pnas.1410293111. PubMed PMID: 25288745; PubMed Central PMCID: PMC4210319.
 53. Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, Dinarello CA, O'Neill L, Netea MG. Toll-like receptors and chronic inflammation in rheumatic diseases: new developments. *Nat Rev*

- Rheumatol* (2016) 12(6):344-57. Epub 2016/05/14. doi: 10.1038/nrrheum.2016.61. PubMed PMID: 27170508.
54. Wang H, Flannery SM, Dickhofer S, Huhn S, George J, Kubarenko AV, et al. A coding IRAK2 protein variant compromises Toll-like receptor (TLR) signaling and is associated with colorectal cancer survival. *J Biol Chem* (2014) 289(33):23123-31. Epub 2014/06/29. doi: 10.1074/jbc.M113.492934. PubMed PMID: 24973222; PubMed Central PMCID: PMC4132810.
 55. Nascimbeni AC, Fanin M, Angelini C, Sandri M. Autophagy dysregulation in Danon disease. *Cell Death Dis* (2017) 8(1):e2565. Epub 2017/01/20. doi: 10.1038/cddis.2016.475. PubMed PMID: 28102838; PubMed Central PMCID: PMC5386379.
 56. Delgado M, Singh S, De Haro S, Master S, Ponpuak M, Dinkins C, et al. Autophagy and pattern recognition receptors in innate immunity. *Immunol Rev* (2009) 227(1):189-202. Epub 2009/01/06. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00725.x. PubMed PMID: 19120485; PubMed Central PMCID: PMC2788953.
 57. Tang P, Upton JEM, Barton-Forbes MA, Salvadori MI, Clynick MP, Price AK, et al. Autosomal Recessive Agammaglobulinemia Due to a Homozygous Mutation in PIK3R1. *J Clin Immunol* (2018) 38(1):88-95. Epub 2017/11/28. doi: 10.1007/s10875-017-0462-y. PubMed PMID: 29178053.
 58. Hunter JE, Leslie J, Perkins ND. c-Rel and its many roles in cancer: an old story with new twists. *Br J Cancer* (2016) 114(1):1-6. Epub 2016/01/13. doi: 10.1038/bjc.2015.410. PubMed PMID: 26757421; PubMed Central PMCID: PMC4716536.
 59. Criswell LA. Gene discovery in rheumatoid arthritis highlights the CD40/NF-kappaB signaling pathway in disease pathogenesis. *Immunol Rev* (2010) 233(1):55-61. Epub 2010/03/03. doi: 10.1111/j.0105-2896.2009.00862.x. PubMed PMID: 20192992.
 60. Lees CW, Barrett JC, Parkes M, Satsangi J. New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut* (2011) 60(12):1739-53. Epub 2011/02/09. doi: 10.1136/gut.2009.199679. PubMed PMID: 21300624.
 61. Sharfe N, Merico D, Karanxha A, Macdonald C, Dadi H, Ngan B, et al. The effects of RelB deficiency on lymphocyte development and function. *J Autoimmun* (2015) 65:90-100. Epub 2015/09/20. doi: 10.1016/j.jaut.2015.09.001. PubMed PMID: 26385063.
 62. Fliegau M, Bryant VL, Frede N, Slade C, Woon ST, Lehnert K, et al. Haploinsufficiency of the NF-kappaB1 Subunit p50 in Common Variable Immunodeficiency. *Am J Hum Genet* (2015) 97(3):389-403. Epub 2015/08/19. doi: 10.1016/j.ajhg.2015.07.008. PubMed PMID: 26279205; PubMed Central PMCID: PMC4564940.
 63. Tankiewicz-Kwedlo A, Hermanowicz JM, Domaniewski T, Pawlak K, Rusak M, Pryczynicz A, et al. Simultaneous use of erythropoietin and LFM-A13 as a new therapeutic approach for colorectal cancer. *Br J Pharmacol* (2018) 175(5):743-62. Epub 2017/11/22. doi: 10.1111/bph.14099. PubMed PMID: 29160911; PubMed Central PMCID: PMC5811618.
 64. Burkitt MD, Hanedi AF, Duckworth CA, Williams JM, Tang JM, O'Reilly LA, et al. NF-kappaB1, NF-kappaB2 and c-Rel differentially regulate susceptibility to colitis-associated adenoma development in C57BL/6 mice. *J Pathol* (2015) 236(3):326-36. Epub 2015/03/03. doi: 10.1002/path.4527. PubMed PMID: 25727407; PubMed Central PMCID: PMC4737252.
 65. Jabara HH, Boyden SE, Chou J, Ramesh N, Massaad MJ, Benson H, et al. A missense mutation in TFRC, encoding transferrin receptor 1, causes combined immunodeficiency. *Nat Genet* (2016) 48(1):74-8. Epub 2015/12/08. doi: 10.1038/ng.3465. PubMed PMID: 26642240; PubMed Central PMCID: PMC4696875.
 66. Jun JC, Cominelli F, Abbott DW. RIP2 activity in inflammatory disease and implications for novel therapeutics. *J Leukoc Biol* (2013) 94(5):927-32. Epub 2013/06/25. doi: 10.1189/jlb.0213109. PubMed PMID: 23794710; PubMed Central PMCID: PMC3800061.

4. REFERÊNCIAS

1. Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, Cunningham-Rundles C, Franco JL, Holland SM, Klein C, Morio T, Oksenhendler E, Picard C, Puel A, Puck J, Seppanen MRJ, Somech R, Su HC, Sullivan KE, Torgerson TR, Meyts I. Human Inborn Errors of Immunity: 2022 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol* 2022; **42**:1473-507.
2. Tsukada S, Saffran DC, Rawlings DJ, Parolini O, Allen RC, Klisak I, Sparkes RS, Kubagawa H, Mohandas T, Quan S, et al. Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell* 1993; **72**:279-90.
3. Vetrie D, Vorechovsky I, Sideras P, Holland J, Davies A, Flinter F, Hammarstrom L, Kinnon C, Levinsky R, Bobrow M, et al. The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature* 1993; **361**:226-33.
4. Cardenas-Morales M, Hernandez-Trujillo VP. Agammaglobulinemia: from X-linked to Autosomal Forms of Disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 2022; **63**:22-35.
5. Winkelstein JA, Marino MC, Lederman HM, Jones SM, Sullivan K, Burks AW, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Ochs HD. X-linked agammaglobulinemia: report on a United States registry of 201 patients. *Medicine (Baltimore)* 2006; **85**:193-202.
6. Ochs HD, Smith CI. X-linked agammaglobulinemia. A clinical and molecular analysis. *Medicine (Baltimore)* 1996; **75**:287-99.
7. Kanegane H, Futatani T, Wang Y, Nomura K, Shinozaki K, Matsukura H, Kubota T, Tsukada S, Miyawaki T. Clinical and mutational characteristics of X-linked agammaglobulinemia and its carrier identified by flow cytometric assessment combined with genetic analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2001; **108**:1012-20.
8. Conley ME, Rohrer J, Minegishi Y. X-linked agammaglobulinemia. *Clin Rev Allergy Immunol* 2000; **19**:183-204.
9. Smith CIE, Berglof A. X-Linked Agammaglobulinemia. In: Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, eds. *GeneReviews*((R)). Seattle (WA), 1993.
10. Wasserman RL. Personalized Therapy: Immunoglobulin Replacement for Antibody Deficiency. *Immunol Allergy Clin North Am* 2019; **39**:95-111.
11. Bruton OC. Agammaglobulinemia. *Pediatrics* 1952; **9**:722-8.
12. Valiaho J, Smith CI, Vihinen M. BTKbase: the mutation database for X-linked

agammaglobulinemia. *Hum Mutat* 2006; **27**:1209-17.

13. Lindvall JM, Blomberg KE, Valiaho J, Vargas L, Heinonen JE, Berglof A, Mohamed AJ, Nore BF, Vihinen M, Smith CI. Bruton's tyrosine kinase: cell biology, sequence conservation, mutation spectrum, siRNA modifications, and expression profiling. *Immunol Rev* 2005; **203**:200-15.
14. Carrillo-Tapia E, Garcia-Garcia E, Herrera-Gonzalez NE, Yamazaki-Nakashimada MA, Staines-Boone AT, Segura-Mendez NH, Scheffler-Mendoza SC, P OF-R, Gonzalez-Serrano ME, Rodriguez-Alba JC, Santos-Argumedo L, Berron-Ruiz L, Sanchez-Flores A, Lopez-Herrera G. Delayed diagnosis in X-linked agammaglobulinemia and its relationship to the occurrence of mutations in BTK non-kinase domains. *Expert Rev Clin Immunol* 2018; **14**:83-93.
15. Baraldi E, Djinojic Carugo K, Hyvonen M, Surdo PL, Riley AM, Potter BV, O'Brien R, Ladbury JE, Saraste M. Structure of the PH domain from Bruton's tyrosine kinase in complex with inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate. *Structure* 1999; **7**:449-60.
16. Musacchio A, Saraste M, Wilmanns M. High-resolution crystal structures of tyrosine kinase SH3 domains complexed with proline-rich peptides. *Nat Struct Biol* 1994; **1**:546-51.
17. Sawyer TK. Src homology-2 domains: structure, mechanisms, and drug discovery. *Biopolymers* 1998; **47**:243-61.
18. Marcotte DJ, Liu YT, Arduini RM, Hession CA, Miatkowski K, Wildes CP, Cullen PF, Hong V, Hopkins BT, Mertsching E, Jenkins TJ, Romanowski MJ, Baker DP, Silvian LF. Structures of human Bruton's tyrosine kinase in active and inactive conformations suggest a mechanism of activation for TEC family kinases. *Protein Sci* 2010; **19**:429-39.
19. Conley ME, Broides A, Hernandez-Trujillo V, Howard V, Kanegane H, Miyawaki T, Shurtleff SA. Genetic analysis of patients with defects in early B-cell development. *Immunol Rev* 2005; **203**:216-34.
20. Lederman HM, Winkelstein JA. X-linked agammaglobulinemia: an analysis of 96 patients. *Medicine (Baltimore)* 1985; **64**:145-56.
21. Plebani A, Soresina A, Rondelli R, Amato GM, Azzari C, Cardinale F, Cazzola G, Consolini R, De Mattia D, Dell'Erba G, Duse M, Fiorini M, Martino S, Martire B, Masi M, Monafo V, Moschese V, Notarangelo LD, Orlandi P, Panei P, Pession A, Pietrogrande MC, Pignata C, Quinti I, Ragno V, Rossi P, Sciotto A, Stabile A. Clinical, immunological, and molecular analysis in a large cohort of patients with X-linked agammaglobulinemia: an Italian multicenter study. *Clin Immunol* 2002; **104**:221-30.
22. Conley ME, Howard V. Clinical findings leading to the diagnosis of X-linked

agammaglobulinemia. *J Pediatr* 2002; **141**:566-71.

23. Hermaszewski RA, Webster AD. Primary hypogammaglobulinaemia: a survey of clinical manifestations and complications. *Q J Med* 1993; **86**:31-42.

24. Morales-Aza B, Glennie SJ, Garcez TP, Davenport V, Johnston SL, Williams NA, Heyderman RS. Impaired maintenance of naturally acquired T-cell memory to the meningococcus in patients with B-cell immunodeficiency. *Blood* 2009; **113**:4206-12.

25. Ramesh M, Simchoni N, Hamm D, Cunningham-Rundles C. High-throughput sequencing reveals an altered T cell repertoire in X-linked agammaglobulinemia. *Clin Immunol* 2015; **161**:190-6.

26. Fekrvand S, Yazdani R, Olbrich P, Azizi G, Shirzadi R, Modaresi M, Sohani M, Delavari S, Kalantari A, Shariat M, Shafiei A, Lu N, Hassanpour G, Rahimi Hajiabadi M, Ashournia P, Razaghian A, Asgharyan M, Shahraki-Ghadimi Z, Rouhani R, Hoda Fallah F, Rezaei N, Abolhassani H, Aghamohammadi A. Evaluation of respiratory complications in patients with X-linked and autosomal recessive agammaglobulinemia. *Pediatr Allergy Immunol* 2020; **31**:405-17.

27. Lougaris V, Soresina A, Baronio M, Montin D, Martino S, Signa S, Volpi S, Zecca M, Marinoni M, Baselli LA, Dellepiane RM, Carrabba M, Fabio G, Putti MC, Cinetto F, Lunardi C, Gazzurelli L, Benvenuto A, Bertolini P, Conti F, Consolini R, Ricci S, Azzari C, Leonardi L, Duse M, Pulvirenti F, Milito C, Quinti I, Cancrini C, Finocchi A, Moschese V, Cirillo E, Crescenzi L, Spadaro G, Marasco C, Vacca A, Cardinale F, Martire B, Trizzino A, Licciardello M, Cossu F, Di Matteo G, Badolato R, Ferrari S, Giliani S, Pession A, Ugazio A, Pignata C, Plebani A. Long-term follow-up of 168 patients with X-linked agammaglobulinemia reveals increased morbidity and mortality. *J Allergy Clin Immunol* 2020; **146**:429-37.

28. El-Sayed ZA, Abramova I, Aldave JC, Al-Herz W, Bezrodnik L, Boukari R, Bousfiha AA, Cancrini C, Condino-Neto A, Dbaiho G, Derfalvi B, Dogu F, Edgar JDM, Eley B, El-Owaidy RH, Espinosa-Padilla SE, Galal N, Haerynck F, Hanna-Wakim R, Hossny E, Ikinciogullari A, Kamal E, Kanegane H, Kechout N, Lau YL, Morio T, Moschese V, Neves JF, Ouederni M, Paganelli R, Paris K, Pignata C, Plebani A, Qamar FN, Qureshi S, Radhakrishnan N, Rezaei N, Rosario N, Routes J, Sanchez B, Sediva A, Seppanen MR, Serrano EG, Shcherbina A, Singh S, Siniah S, Spadaro G, Tang M, Vinet AM, Volokha A, Sullivan KE. X-linked agammaglobulinemia (XLA): Phenotype, diagnosis, and therapeutic challenges around the world. *World Allergy Organ J* 2019; **12**:100018.

29. Hashimoto S, Miyawaki T, Futatani T, Kanegane H, Usui K, Nukiwa T, Namiuchi S,

- Matsushita M, Yamadori T, Suemura M, Kishimoto T, Tsukada S. Atypical X-linked agammaglobulinemia diagnosed in three adults. *Intern Med* 1999; **38**:722-5.
30. Kornfeld SJ, Haire RN, Strong SJ, Brigino EN, Tang H, Sung SS, Fu SM, Litman GW. Extreme variation in X-linked agammaglobulinemia phenotype in a three-generation family. *J Allergy Clin Immunol* 1997; **100**:702-6.
 31. Morwood K, Bourne H, Gold M, Gillis D, Benson EM. Phenotypic variability: clinical presentation between the 6th year and the 60th year in a family with X-linked agammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol* 2004; **113**:783-5.
 32. Sarpong S, Skolnick HS, Ochs HD, Futatani T, Winkelstein JA. Survival of wild polio by a patient with XLA. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; **88**:59-60.
 33. Stewart DM, Tian L, Nelson DL. A case of X-linked agammaglobulinemia diagnosed in adulthood. *Clin Immunol* 2001; **99**:94-9.
 34. Usui K, Sasahara Y, Tazawa R, Hagiwara K, Tsukada S, Miyawaki T, Tsuchiya S, Nukiwa T. Recurrent pneumonia with mild hypogammaglobulinemia diagnosed as X-linked agammaglobulinemia in adults. *Respir Res* 2001; **2**:188-92.
 35. Rosenfeld RM, Piccirillo JF, Chandrasekhar SS, Brook I, Ashok Kumar K, Kramper M, Orlandi RR, Palmer JN, Patel ZM, Peters A, Walsh SA, Corrigan MD. Clinical practice guideline (update): adult sinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2015; **152**:S1-S39.
 36. Weir S, Cuccherini B, Whitney AM, Ray ML, MacGregor JP, Steigerwalt A, Daneshvar MI, Weyant R, Wray B, Steele J, Strober W, Gill VJ. Recurrent bacteremia caused by a "Flexispira"-like organism in a patient with X-linked (Bruton's) agammaglobulinemia. *J Clin Microbiol* 1999; **37**:2439-45.
 37. Vancikova Z, Freiburger T, Vach W, Trojanek M, Rizzi M, Janda A. X-linked agammaglobulinemia in community-acquired pneumonia cases revealed by immunoglobulin level screening at hospital admission. *Klin Padiatr* 2013; **225**:339-42.
 38. Quartier P, Debre M, De Blic J, de Sauverzac R, Sayegh N, Jabado N, Haddad E, Blanche S, Casanova JL, Smith CI, Le Deist F, de Saint Basile G, Fischer A. Early and prolonged intravenous immunoglobulin replacement therapy in childhood agammaglobulinemia: a retrospective survey of 31 patients. *J Pediatr* 1999; **134**:589-96.
 39. Howard V, Greene JM, Pahwa S, Winkelstein JA, Boyle JM, Kocak M, Conley ME. The health status and quality of life of adults with X-linked agammaglobulinemia. *Clin Immunol* 2006; **118**:201-8.
 40. Cuccherini B, Chua K, Gill V, Weir S, Wray B, Stewart D, Nelson D, Fuss I, Strober W. Bacteremia and skin/bone infections in two patients with X-linked agammaglobulinemia

caused by an unusual organism related to *Flexispira/Helicobacter* species. *Clin Immunol* 2000; **97**:121-9.

41. Han S, Schindel C, Genitsariotis R, Marker-Hermann E, Bhakdi S, Maeurer MJ. Identification of a unique *Helicobacter* species by 16S rRNA gene analysis in an abdominal abscess from a patient with X-linked hypogammaglobulinemia. *J Clin Microbiol* 2000; **38**:2740-2.

42. Simons E, Spacek LA, Lederman HM, Winkelstein JA. *Helicobacter cinaedi* bacteremia presenting as macules in an afebrile patient with X-linked agammaglobulinemia. *Infection* 2004; **32**:367-8.

43. Romo-Gonzalez C, Bustamante-Ogando JC, Yamazaki-Nakashimada MA, Aviles-Jimenez F, Otero-Mendoza F, Espinosa-Rosales FJ, Espinosa-Padilla SE, Scheffler Mendoza SC, Duran-McKinster C, Garcia-Romero MT, Saez-de-Ocariz M, Lopez-Herrera G. Infections With Enterohepatic Non-*H. pylori Helicobacter* Species in X-Linked Agammaglobulinemia: Clinical Cases and Review of the Literature. *Front Cell Infect Microbiol* 2021; **11**:807136.

44. Fjordside L, Herlov C, Drabe CH, Andersen LP, Katzenstein TL. *Helicobacter troglodytes* Bacteremia and Lower Limb Skin Lesion in a Patient with X-Linked Agammaglobulinemia-A Case Report and Review of the Literature. *Pathogens* 2022; **11**.

45. Bearden D, Collett M, Quan PL, Costa-Carvalho BT, Sullivan KE. Enteroviruses in X-Linked Agammaglobulinemia: Update on Epidemiology and Therapy. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2016; **4**:1059-65.

46. Wilfert CM, Buckley RH, Mohanakumar T, Griffith JF, Katz SL, Whisnant JK, Eggleston PA, Moore M, Treadwell E, Oxman MN, Rosen FS. Persistent and fatal central-nervous-system ECHOvirus infections in patients with agammaglobulinemia. *N Engl J Med* 1977; **296**:1485-9.

47. Halliday E, Winkelstein J, Webster AD. Enteroviral infections in primary immunodeficiency (PID): a survey of morbidity and mortality. *J Infect* 2003; **46**:1-8.

48. Jones TPW, Buckland M, Breuer J, Lowe DM. Viral infection in primary antibody deficiency syndromes. *Rev Med Virol* 2019; **29**:e2049.

49. Dunn JJ. Enteroviruses and Parechoviruses. *Microbiol Spectr* 2016; **4**.

50. Dittrich AM, Schulze I, Magdorf K, Wahn V, Wahn U. X-linked agammaglobulinaemia and *Pneumocystis carinii* pneumonia--an unusual coincidence? *Eur J Pediatr* 2003; **162**:432-3.

51. Alibrahim A, Lepore M, Lierl M, Filipovich A, Assaad A. *Pneumocystis carinii*

- pneumonia in an infant with X-linked agammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol* 1998; **101**:552-3.
52. Bloom KA, Chung D, Cunningham-Rundles C. Osteoarticular infectious complications in patients with primary immunodeficiencies. *Curr Opin Rheumatol* 2008; **20**:480-5.
 53. Franz A, Webster AD, Furr PM, Taylor-Robinson D. Mycoplasmal arthritis in patients with primary immunoglobulin deficiency: clinical features and outcome in 18 patients. *Br J Rheumatol* 1997; **36**:661-8.
 54. Agarwal S, Mayer L. Pathogenesis and treatment of gastrointestinal disease in antibody deficiency syndromes. *J Allergy Clin Immunol* 2009; **124**:658-64.
 55. Wright PF, Hatch MH, Kasselberg AG, Lowry SP, Wadlington WB, Karzon DT. Vaccine-associated poliomyelitis in a child with sex-linked agammaglobulinemia. *J Pediatr* 1977; **91**:408-12.
 56. Gompels MM, Hodges E, Lock RJ, Angus B, White H, Larkin A, Chapel HM, Spickett GP, Misbah SA, Smith JL. Lymphoproliferative disease in antibody deficiency: a multi-centre study. *Clin Exp Immunol* 2003; **134**:314-20.
 57. Lavilla P, Gil A, Rodriguez MC, Dupla ML, Pintado V, Fontan G. X-linked agammaglobulinemia and gastric adenocarcinoma. *Cancer* 1993; **72**:1528-31.
 58. Bachmeyer C, Monge M, Cazier A, Le Deist F, de Saint Basile G, Durandy A, Fischer A, Mougeot-Martin M. Gastric adenocarcinoma in a patient with X-linked agammaglobulinaemia. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; **12**:1033-5.
 59. van der Meer JW, Weening RS, Schellekens PT, van Munster IP, Nagengast FM. Colorectal cancer in patients with X-linked agammaglobulinaemia. *Lancet* 1993; **341**:1439-40.
 60. Brosens LA, Tytgat KM, Morsink FH, Sinke RJ, Ten Berge IJ, Giardiello FM, Offerhaus GJ, Keller JJ. Multiple colorectal neoplasms in X-linked agammaglobulinemia. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; **6**:115-9.
 61. Echave-Sustaeta JM, Villena V, Verdugo M, Lopez-Encuentra A, de Agustin P, Alberti N. X-linked agammaglobulinaemia and squamous lung cancer. *Eur Respir J* 2001; **17**:570-2.
 62. Maarschalk-Ellebreek LJ, Oldenburg B, Mombers IM, Hoepelman AI, Brosens LA, Offerhaus GJ, Ellebreek PM. Outcome of screening endoscopy in common variable immunodeficiency disorder and X-linked agammaglobulinemia. *Endoscopy* 2013; **45**:320-3.
 63. Hoshino A, Okuno Y, Migita M, Ban H, Yang X, Kiyokawa N, Adachi Y, Kojima S,

- Ohara O, Kanegane H. X-linked agammaglobulinemia associated with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Immunol* 2015; **35**:108-11.
64. Conley ME. Are patients with X-linked agammaglobulinemia at increased risk of developing acute lymphoblastic leukemia? *J Clin Immunol* 2015; **35**:98-9.
 65. Hernandez-Trujillo VP, Scalchunes C, Cunningham-Rundles C, Ochs HD, Bonilla FA, Paris K, Yel L, Sullivan KE. Autoimmunity and inflammation in X-linked agammaglobulinemia. *J Clin Immunol* 2014; **34**:627-32.
 66. Barmettler S, Otani IM, Minhas J, Abraham RS, Chang Y, Dorsey MJ, Ballas ZK, Bonilla FA, Ochs HD, Walter JE. Gastrointestinal Manifestations in X-linked Agammaglobulinemia. *J Clin Immunol* 2017; **37**:287-94.
 67. Saffran DC, Parolini O, Fitch-Hilgenberg ME, Rawlings DJ, Afar DE, Witte ON, Conley ME. Brief report: a point mutation in the SH2 domain of Bruton's tyrosine kinase in atypical X-linked agammaglobulinemia. *N Engl J Med* 1994; **330**:1488-91.
 68. Kornfeld SJ, Haire RN, Strong SJ, Tang H, Sung SS, Fu SM, Litman GW. A novel mutation (Cys145-->Stop) in Bruton's tyrosine kinase is associated with newly diagnosed X-linked agammaglobulinemia in a 51-year-old male. *Mol Med* 1996; **2**:619-23.
 69. Kornfeld SJ, Kratz J, Haire RN, Litman GW, Good RA. X-linked agammaglobulinemia presenting as transient hypogammaglobulinemia of infancy. *J Allergy Clin Immunol* 1995; **95**:915-7.
 70. Wood PM, Mayne A, Joyce H, Smith CI, Granoff DM, Kumararatne DS. A mutation in Bruton's tyrosine kinase as a cause of selective anti-polysaccharide antibody deficiency. *J Pediatr* 2001; **139**:148-51.
 71. Gaspar HB, Conley ME. Early B cell defects. *Clin Exp Immunol* 2000; **119**:383-9.
 72. Cham B, Bonilla MA, Winkelstein J. Neutropenia associated with primary immunodeficiency syndromes. *Semin Hematol* 2002; **39**:107-12.
 73. Farrar JE, Rohrer J, Conley ME. Neutropenia in X-linked agammaglobulinemia. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; **81**:271-6.
 74. Kanegane H, Taneichi H, Nomura K, Futatani T, Miyawaki T. Severe neutropenia in Japanese patients with x-linked agammaglobulinemia. *J Clin Immunol* 2005; **25**:491-5.
 75. Plo Rodriguez F, Garcia Rodriguez MC, Ferreira Cerdan A, Fontan Casariego G. [Neutropenia as early manifestation of X-linked agammaglobulinemia. Report on 4 patients]. *An Esp Pediatr* 1999; **51**:235-40.
 76. Conley ME, Notarangelo LD, Etzioni A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and

ESID (European Society for Immunodeficiencies). Clin Immunol 1999; **93**:190-7.

77. Nakagawa N, Imai K, Kanegane H, Sato H, Yamada M, Kondoh K, Okada S, Kobayashi M, Agematsu K, Takada H, Mitsuiki N, Oshima K, Ohara O, Suri D, Rawat A, Singh S, Pan-Hammarstrom Q, Hammarstrom L, Reichenbach J, Seger R, Ariga T, Hara T, Miyawaki T, Nonoyama S. Quantification of kappa-deleting recombination excision circles in Guthrie cards for the identification of early B-cell maturation defects. J Allergy Clin Immunol 2011; **128**:223-5 e2.

78. Borte S, von Döbeln U, Fasth A, Wang N, Janzi M, Winiarski J, Sack U, Pan-Hammarstrom Q, Borte M, Hammarstrom L. Neonatal screening for severe primary immunodeficiency diseases using high-throughput triplex real-time PCR. Blood 2012; **119**:2552-5.

79. de Felipe B, Olbrich P, Lucenas JM, Delgado-Pecellin C, Pavon-Delgado A, Marquez J, Salamanca C, Soler-Palacin P, Gonzalez-Granado LI, Antolin LF, Borte S, Neth O. Prospective neonatal screening for severe T- and B-lymphocyte deficiencies in Seville. Pediatr Allergy Immunol 2016; **27**:70-7.

80. Kruger R, Baumann U, Borte S, Kolsch U, Lorenz MR, Keller B, Harder I, Warnatz K, Ehl S, Schwarz K, Wahn V, von Bernuth H. Impaired polysaccharide responsiveness without agammaglobulinaemia in three patients with hypomorphic mutations in Bruton Tyrosine Kinase-No detection by newborn screening for primary immunodeficiencies. Scand J Immunol 2020; **91**:e12811.

81. Zhu Q, Zhang M, Rawlings DJ, Vihinen M, Hagemann T, Saffran DC, Kwan SP, Nilsson L, Smith CI, Witte ON, Chen SH, Ochs HD. Deletion within the Src homology domain 3 of Bruton's tyrosine kinase resulting in X-linked agammaglobulinemia (XLA). J Exp Med 1994; **180**:461-70.

82. Guioli S, Arveiler B, Bardoni B, Notarangelo LD, Panina P, Duse M, Ugazio A, Oberle I, de Saint Basile G, Mandel JL, et al. Close linkage of probe p212 (DXS178) to X-linked agammaglobulinemia. Hum Genet 1989; **84**:19-21.

83. Kwan SP, Walker AP, Hagemann T, Gupta S, Vayuvegula B, Ochs HD. A new RFLP marker, SP282, at the btk locus for genetic analysis in X-linked agammaglobulinaemia families. Prenat Diagn 1994; **14**:493-6.

84. Parolini O, Hejtmancik JF, Allen RC, Belmont JW, Lassiter GL, Henry MJ, Barker DF, Conley ME. Linkage analysis and physical mapping near the gene for X-linked agammaglobulinemia at Xq22. Genomics 1993; **15**:342-9.

85. Winkelstein JA, Fearon E. Carrier detection of the X-linked primary

immunodeficiency diseases using X-chromosome inactivation analysis. *J Allergy Clin Immunol* 1990; **85**:1090-7.

86. Fearon ER, Winkelstein JA, Civin CI, Pardoll DM, Vogelstein B. Carrier detection in X-linked agammaglobulinemia by analysis of X-chromosome inactivation. *N Engl J Med* 1987; **316**:427-31.

87. Conley ME, Puck JM. Carrier detection in typical and atypical X-linked agammaglobulinemia. *J Pediatr* 1988; **112**:688-94.

88. Liese JG, Wintergerst U, Tympner KD, Belohradsky BH. High- vs low-dose immunoglobulin therapy in the long-term treatment of X-linked agammaglobulinemia. *Am J Dis Child* 1992; **146**:335-9.

89. Bonilla FA, Khan DA, Ballas ZK, Chinen J, Frank MM, Hsu JT, Keller M, Kobrynski LJ, Komarow HD, Mazer B, Nelson RP, Jr., Orange JS, Routes JM, Shearer WT, Sorensen RU, Verbsky JW, Bernstein DI, Blessing-Moore J, Lang D, Nicklas RA, Oppenheimer J, Portnoy JM, Randolph CR, Schuller D, Spector SL, Tilles S, Wallace D. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2015; **136**:1186-205 e1-78.

90. Cunningham-Rundles C. Key aspects for successful immunoglobulin therapy of primary immunodeficiencies. *Clin Exp Immunol* 2011; **164 Suppl 2**:16-9.

91. Perez EE, Orange JS, Bonilla F, Chinen J, Chinn IK, Dorsey M, El-Gamal Y, Harville TO, Hossny E, Mazer B, Nelson R, Secord E, Jordan SC, Stiehm ER, Vo AA, Ballow M. Update on the use of immunoglobulin in human disease: A review of evidence. *J Allergy Clin Immunol* 2017; **139**:S1-S46.

92. Ohmoto A, Fuji S, Shultes KC, Savani BN, Einsele H. Controversies about immunoglobulin replacement therapy in HSCT recipients with hypogammaglobulinemia. *Bone Marrow Transplant* 2022; **57**:874-80.

93. Lindahl H, Klingstrom J, Da Silva Rodrigues R, Christ W, Chen P, Ljunggren HG, Buggert M, Aleman S, Smith CIE, Bergman P. Neutralizing SARS-CoV-2 Antibodies in Commercial Immunoglobulin Products Give Patients with X-Linked Agammaglobulinemia Limited Passive Immunity to the Omicron Variant. *J Clin Immunol* 2022; **42**:1130-6.

94. Berlucchi M, Soresina A, Redaelli De Zinis LO, Valetti L, Valotti R, Lougaris V, Meini A, Salsi D, Nicolai P, Plebani A. Sensorineural hearing loss in primary antibody deficiency disorders. *J Pediatr* 2008; **153**:293-6.

95. Shearer WT, Fleisher TA, Buckley RH, Ballas Z, Ballow M, Blaese RM, Bonilla FA, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Filipovich AH, Fuleihan R, Gelfand EW, Hernandez-

- Trujillo V, Holland SM, Hong R, Lederman HM, Malech HL, Miles S, Notarangelo LD, Ochs HD, Orange JS, Puck JM, Routes JM, Stiehm ER, Sullivan K, Torgerson T, Winkelstein J. Recommendations for live viral and bacterial vaccines in immunodeficient patients and their close contacts. *J Allergy Clin Immunol* 2014; **133**:961-6.
96. Milito C, Cinetto F, Palladino A, Garzi G, Punziano A, Lagnese G, Scarpa R, Rattazzi M, Pesce AM, Pulvirenti F, Di Napoli G, Spadaro G, Carsetti R, Quinti I. Mortality in Severe Antibody Deficiencies Patients during the First Two Years of the COVID-19 Pandemic: Vaccination and Monoclonal Antibodies Efficacy. *Biomedicines* 2022; **10**.
97. McCusker C, Upton J, Warrington R. Primary immunodeficiency. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2018; **14**:61.
98. Hodgkinson JP, Chapel H. Clinical challenges in the management of patients with B cell immunodeficiencies. *Clin Exp Immunol* 2017; **188**:323-5.
99. Barnes S, Kotecha S, Douglass JA, Paul E, Hore-Lacy F, Stirling R, Snell GI, Westall GP. Evolving practice: X-linked agammaglobulinemia and lung transplantation. *Am J Transplant* 2015; **15**:1110-3.
100. Abu-Arja RF, Chernin LR, Abusin G, Auletta J, Cabral L, Egler R, Ochs HD, Torgerson TR, Lopez-Guisa J, Hostoffer RW, Tcheurekdjian H, Cooke KR. Successful hematopoietic cell transplantation in a patient with X-linked agammaglobulinemia and acute myeloid leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2015; **62**:1674-6.
101. Ikegame K, Imai K, Yamashita M, Hoshino A, Kanegane H, Morio T, Kaida K, Inoue T, Soma T, Tamaki H, Okada M, Ogawa H. Allogeneic stem cell transplantation for X-linked agammaglobulinemia using reduced intensity conditioning as a model of the reconstitution of humoral immunity. *J Hematol Oncol* 2016; **9**:9.
102. Winkelstein JA, Conley ME, James C, Howard V, Boyle J. Adults with X-linked agammaglobulinemia: impact of disease on daily lives, quality of life, educational and socioeconomic status, knowledge of inheritance, and reproductive attitudes. *Medicine (Baltimore)* 2008; **87**:253-8.
103. Altman K, Zhou C, Hernandez-Trujillo V, Scalchunes C, Rawlings DJ, de la Morena MT. Health-Related Quality of Life in 91 Patients with X-Linked Agammaglobulinemia. *J Clin Immunol* 2022; **42**:811-8.
104. Schnare M, Rollinghoff M, Qureshi S. Toll-like receptors: sentinels of host defence against bacterial infection. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; **139**:75-85.
105. Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; **388**:621-5.

106. Gazzinelli RT, Denkers EY. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat Rev Immunol* 2006; **6**:895-906.
107. Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 2006; **117**:979-87; quiz 88.
108. Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 2002; **168**:554-61.
109. Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* 2001; **167**:1882-5.
110. Brinkmann MM, Spooner E, Hoebe K, Beutler B, Ploegh HL, Kim YM. The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J Cell Biol* 2007; **177**:265-75.
111. Beutler BA. TLRs and innate immunity. *Blood* 2009; **113**:1399-407.
112. Karakaslar EO, Katiyar N, Hasham M, Youn A, Sharma S, Chung CH, Marches R, Korstanje R, Banchereau J, Ucar D. Transcriptional activation of Jun and Fos members of the AP-1 complex is a conserved signature of immune aging that contributes to inflammaging. *Aging Cell* 2023:e13792.
113. Solt LA, May MJ. The I κ B kinase complex: master regulator of NF- κ B signaling. *Immunol Res* 2008; **42**:3-18.
114. Shinohara ML, Lu L, Bu J, Werneck MB, Kobayashi KS, Glimcher LH, Cantor H. Osteopontin expression is essential for interferon- α production by plasmacytoid dendritic cells. *Nat Immunol* 2006; **7**:498-506.
115. Schoenemeyer A, Barnes BJ, Mancl ME, Latz E, Goutagny N, Pitha PM, Fitzgerald KA, Golenbock DT. The interferon regulatory factor, IRF5, is a central mediator of toll-like receptor 7 signaling. *J Biol Chem* 2005; **280**:17005-12.
116. Yoshimura A, Ohishi HM, Aki D, Hanada T. Regulation of TLR signaling and inflammation by SOCS family proteins. *J Leukoc Biol* 2004; **75**:422-7.
117. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 2004; **16**:3-9.
118. Ignacio A, Morales CI, Camara NO, Almeida RR. Innate Sensing of the Gut Microbiota: Modulation of Inflammatory and Autoimmune Diseases. *Front Immunol* 2016; **7**:54.
119. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; **4**:499-511.
120. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ* 2006; **13**:816-25.

121. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* 2005; **5**:446-58.
122. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005; **17**:1-14.
123. Thoma-Uszynski S, Stenger S, Takeuchi O, Ochoa MT, Engele M, Sieling PA, Barnes PF, Rollinghoff M, Bolcskei PL, Wagner M, Akira S, Norgard MV, Belisle JT, Godowski PJ, Bloom BR, Modlin RL. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science* 2001; **291**:1544-7.
124. Aliprantis AO, Yang RB, Weiss DS, Godowski P, Zychlinsky A. The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *Embo J* 2000; **19**:3325-36.
125. Ayabe T, Ashida T, Kohgo Y, Kono T. The role of Paneth cells and their antimicrobial peptides in innate host defense. *Trends Microbiol* 2004; **12**:394-8.
126. Birchler T, Seibl R, Buchner K, Loeliger S, Seger R, Hossle JP, Aguzzi A, Lauener RP. Human Toll-like receptor 2 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin 2 in response to bacterial lipoprotein. *Eur J Immunol* 2001; **31**:3131-7.
127. Lehrer RI, Ganz T. Defensins of vertebrate animals. *Curr Opin Immunol* 2002; **14**:96-102.
128. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001; **2**:675-80.
129. Bowie A, Kiss-Toth E, Symons JA, Smith GL, Dower SK, O'Neill LA. A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**:10162-7.
1. 130. Harte MT, Haga IR, Maloney G, Gray P, Reading PC, Bartlett NW, Smith GL, Bowie A, O'Neill LA. The poxvirus protein A52R targets Toll-like receptor signaling complexes to suppress host defense. *J Exp Med* 2003; **197**:343-51.

5. APÊNDICES

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jun 17, 2023

This Agreement between University of Campinas -- Marcelo Teocchi ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	5571441150471
License date	Jun 17, 2023
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Biochemical and Biophysical Research Communications
Licensed Content Title	Toll-like receptors and innate immunity
Licensed Content Author	Himanshu Kumar,Taro Kawai,Shizuo Akira
Licensed Content Date	Oct 30, 2009
Licensed Content Volume	388
Licensed Content Issue	4
Licensed Content Pages	5
Start Page	621
End Page	625
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations

Number of figures/tables/illustrations	2
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, including English rights
Number of languages	1
Title	QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO RELATIVA DE GENES ENVOLVIDOS NA SINALIZAÇÃO DE RECEPTORES TOLL-LIKE EM CÉLULAS POLIMORFONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM AGAMAGLOBULINEMIA LIGADA AO CROMOSSOMO X
Institution name	University of Campinas
Expected presentation date	Sep 2023
Portions	Figure 1, Table 1
Specific Languages	Portuguese, English
Requestor Location	University of Campinas Faculdade de Ciências Médicas (FCM4) - C Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 Barão Geraldo - Cidade Universitária "Ze Campinas, 13083-887 Brazil Attn: University of Campinas
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your RightsLink account and that are available at any time at <https://myaccount.copyright.com>).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given. The material may not be reproduced or used in any other way, including use in combination with an artificial intelligence tool (including to train an algorithm, test, process, analyse, generate output and/or develop any form of artificial intelligence tool), or to create any derivative work and/or service (including resulting from the use of artificial intelligence tools).

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier's permissions helpdesk [here](#)). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. **Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to

bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
 - via their non-commercial person homepage or blog
 - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
 - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
 - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
 - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
 - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
 - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

Published journal article (JPA): A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

Gold Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a [CrossMark logo](#), the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's [posting policy](#) for further information.

18. **For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. **Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our [open access license policy](#) for more information.

Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

20. Other Conditions:

v1.10

Questions? customercare@copyright.com.

6. ANEXOS

 CEPUNICAMP comitê de ética em pesquisa	UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Imunodeficiência Primária e Síndrome Linfoproliferativa: Avaliação Diagnóstica

Pesquisador: Maria Marluce dos Santos Vilela

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 17187819.4.0000.5404

Instituição Proponente: Centro de Investigação em Pediatria

Patrocinador Principal: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.655.828

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma emenda que visa inserir novos objetivos específicos e novos membros na equipe de pesquisa (Janine Schincariol Sabino; Lia Furlaneto Marega; Marcus Vinícius Costa Pedroni; Thaís de Andrade Eugênio e Marcelo Ananias Teocchi) .

Objetivo da Pesquisa:

Foram inserido os objetivos específicos:

7-Validar pelo método de sequenciamento SANGER, as variantes reveladas pelo sequenciamento total do exoma (STE) para os pacientes com ALPS-U (antigo ALPS tipo III) e nos membros da família, pais e irmãos;

8-Analisar detalhadamente as consequências funcionais dessas variantes em pacientes com ALPS-U, utilizando métodos de citometria de fluxo;

9-Analisar as consequências funcionais dessas variantes identificadas e confirmadas em pacientes com ALPS-U, na expressão de genes da via da apoptose, utilizando a extração de RNA;

10-Através da expressão gênica das vias de sinalização Toll Like Receptor (TLR), analisar a inflamação crônica inerente aos pacientes com agamaglobulinemia, utilizando a extração de RNA.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Mantidos em relação ao projeto original.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126		
Bairro: Barão Geraldo	CEP: 13.083-887	
UF: SP	Município: CAMPINAS	
Telefone: (19)3521-8936	Fax: (19)3521-7187	E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.655.828

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

De acordo com as informações do pesquisador responsável contempladas no documento anexado "plataformaOficiolimpo18092019.doc 18/09/2019 10:43:00":

"Venho requisitar um adendo ao Parecer CEP nº 1176/2011, relativo ao Projeto de Pesquisa "Imunodeficiência Primária e Síndrome Linfoproliferativa: Avaliação Diagnóstica", sob minha responsabilidade. A primeira fase desse projeto consistiu em identificar quais pacientes possuíam o diagnóstico de Síndrome Linfoproliferativa Autoimune (ALPS-FAS) e, dentre aqueles com ALPS TIPO III hoje nomeado ALPS-U, sem etiologia genética definida, investigar através de sequenciamento por exoma, a etiologia molecular. Dentre os 12 pacientes ALPS-U, identificamos mutações nos genes STAT3, XIAP, TNFRS13B, CTLA-4, PIK3CD e BTK. Consideramos que o objetivo principal do projeto de avaliação diagnóstica foi concluída e agora, estamos realizando a segunda parte do objetivo que é avaliação da expressão gênica das vias de transdução relacionadas com as variantes acima identificadas. Assim acrescentamos o método de expressão gênica e extração de RNA. Serão avaliados a expressão de genes das vias intrínseca e extrínseca da apoptose e da via de sinalização dos toll like receptors. Com o aprimoramento das técnicas laboratoriais utilizadas, não será necessário coletar mais sangue além dos 25 mL já previsto no projeto e descrito nos termos de consentimento e assentimento.

A seguir apresento os alunos de pós-graduação que estão participando desse projeto, cumprindo a segunda parte do objetivo principal que é o estudo da regulação da resposta imune nos pacientes com variantes identificadas.

Grupo de pesquisa:

Coordenadora: Profa. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela

Alunos de doutorado:

Janine Schincariol Sabino, título do projeto: Perfil da expressão gênica da via de apoptose em pacientes com Síndrome Linfoproliferativa Autoimune (ALPS) por variante no gene TNFRS13B (TACI).

Lia Furlaneto Marega, título do projeto: Diagnóstico molecular da imunodeficiência comum variável em pacientes com fenótipo de síndrome linfoproliferativa autoimune por variante em STAT3.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.655.828

Marcus Vinícius Costa Pedroni, título do projeto: Sequenciamento por Exoma como ferramenta diagnóstica em pacientes com imunodeficiência primária manifestada por fenótipos de linfoproliferação e autoimunidade. Quando realizar?

Aluno de mestrado:

Thais de Andrade Eugênio, título do projeto: Estudo da Expressão de Genes Envolvidos em Vias de Sinalização de Receptores Toll-like em Monócitos de Pacientes com Agamaglobulinemia Ligada ao X (XLA).

Pós Doutorado: Marcelo Ananias Teocchi, título do projeto: Identificação de alvos moleculares críticos associados à etiologia e a fisiopatologia de imunodeficiências primárias com ênfase nas manifestações clínicas de inflamação, imunodesregulação e autoimunidade.

Os estudos realizados pelos alunos de pós-graduação estão vinculados ao projeto "Imunodeficiência Primária e Síndrome Linfoproliferativa: Avaliação Diagnóstica" com destaques para etiologia genética das imunodeficiências primárias e estudo da expressão gênica das vias de transdução relacionadas com as variantes identificadas. "

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Na avaliação desta emenda foram analisados os documentos anexados:

1-PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1409595_E1.pdf:18/09/2019 10:46:47;

2-2019ProjetoFinalTICA18092019.docx:18/09/2019 10:43:12;

3-plataformaOficiolimp18092019.doc:18/09/2019 10:43:00

Recomendações:

Lembramos que os relatórios parciais devem ser apresentados anualmente ao CEP a partir da data de aprovação, conforme descrito na resolução CNS/MS 466/12 item II.20 e XI.2 letra "d". Os relatórios devem ser encaminhado através de notificação via Plataforma Brasil no formulário do relatório no modelo preconizado pelo CEP, que visa detalhar possíveis intercorrências éticas durante o estudo. Preencher, assinar e anexar o formulário de relatório no modelo do CEP, detalhando as possíveis intercorrências éticas durante o estudo. O arquivo encontra-se disponível em <https://www.prp.unicamp.br/pt-br/relatorios-0>

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.655.828

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda aprovada.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).

- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

-Lembramos que segundo a Resolução 466/2012 , item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.655.828

apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

-O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1409595_E1.pdf	18/09/2019 10:46:47		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	2019ProjetoFinalTICA18092019.docx	18/09/2019 10:43:12	Maria Marluce dos Santos Vilela	Aceito
Outros	plataformaOficialimpo18092019.doc	18/09/2019 10:43:00	Maria Marluce dos Santos Vilela	Aceito
Parecer Anterior	arquivo_7_parecer_aprovacao.pdf	04/07/2019 10:22:06	Maria Marluce dos Santos Vilela	Aceito
Outros	arquivo_11_parecer.pdf	03/07/2019 17:24:14	Maria Marluce dos Santos Vilela	Aceito
Outros	arquivo_10_resposta_pendencia_ao_adendo_e_3_parecer_aprovacao_cep.pdf	03/07/2019 15:29:58	Maria Marluce dos Santos Vilela	Aceito
Outros	arquivo_9_resposta_pendencia_ao_adendo_e_2_parecer_pendencia_cep.pdf	03/07/2019 15:29:36	Maria Marluce dos Santos Vilela	Aceito
Outros	arquivo_8_adendo_e_1_parecer_pendencia_cep.pdf	03/07/2019 15:29:21	Maria Marluce dos Santos Vilela	Aceito
Outros	arquivo_6_parecer_pendencia_e_resposta_do_pesquisador.pdf	03/07/2019 15:28:36	Maria Marluce dos Santos Vilela	Aceito
Outros	arquivo_5_parecer_pendencia_e_resposta_do_pesquisador.pdf	03/07/2019 15:28:21	Maria Marluce dos Santos Vilela	Aceito
Folha de Rosto	arquivo_4_folha_de_rosto_conep.pdf	03/07/2019 15:28:01	Maria Marluce dos Santos Vilela	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	arquivo_3_TCLEs.pdf	03/07/2019 15:27:56	Maria Marluce dos Santos Vilela	Aceito
Orçamento	arquivo_2_orcamento.pdf	03/07/2019 15:27:43	Maria Marluce dos Santos Vilela	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	arquivo_1_projeto_detalhado_parte_II.pdf	03/07/2019 15:27:30	Maria Marluce dos Santos Vilela	Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.655.828

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	arquivo_1_projeto_detalhado_parte_1.pdf	03/07/2019 15:27:18	Maria Marluce dos Santos Vilela	Aceito
---	---	------------------------	------------------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 22 de Outubro de 2019

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br