



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS  
NATURAIS**

**RAULZITO FERNANDES MOREIRA**

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES E VIAS MODULADAS NA SÍNDROME DE  
GUILLIAN-BARRÉ EM BIBLIOTECAS TRANSCRIPTÔMICAS**

**FORTALEZA**

**2018**

RAULZITO FERNANDES MOREIRA

IDENTIFICAÇÃO DE GENES E VIAS MODULADAS NA SÍNDROME DE GUILLIAN-BARRÉ EM BIBLIOTECAS TRANSCRIPTÔMICAS

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Matos Santos Lima.

Coorientador: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerado automaticamente pelo modulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- M839i      Moreira, Raulzito Fernandes.  
              Identificação de genes e vias moduladas na Síndrome de Guillian-Barré em bibliotecas  
              transcriptômicas / Raulzito Fernandes Moreira. – 2018.  
              95 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias,  
              Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2018.  
              Orientação: Prof. Dr. João Paulo Matos Santos Lima.  
              Coorientação: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.
1. Alvos-terapêuticos. 2. Biomarcadores. 3. Sangue periférico. 4. Síndrome de Guillian-  
              Barré. 5. Transcriptômica. I. Título.

CDD 660.6

---

RAULZITO FERNANDES MOREIRA

IDENTIFICAÇÃO DE GENES E VIAS MODULADAS NA SÍNDROME DE GUILLIAN-BARRÉ EM BIBLIOTECAS TRANSCRIPTÔMICAS

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Aprovada em 06/04/2018.

Banca Examinadora

---

Prof. Dr. João Paulo Matos Santos Lima (Orientador)  
Universidade Federal do Rio Grandes Norte (UFRN)

---

Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Mário Emílio Dourado Júnior  
Universidade Federal do Rio Grandes Norte (UFRN)

---

Prof. Dr. Sandro José de Souza  
Universidade Federal do Rio Grandes Norte (UFRN)

---

Prof. Dr. Rodrigo Juliani Siqueira Dalmolin  
Universidade Federal do Rio Grandes Norte (UFRN)

Aos meus pais, Maria Angelina Fernandes  
e Francisco Antônio Moreira,  
dedico honrosamente.

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Paulo Matos Santos Lima, e co-orientadora, Profa Dra Kyria Santiago do Nascimento, que sempre me deram a liberdade necessária para o amadurecimento científico e apoio nas horas necessárias. Sempre lembrarei das lições valorosas do acaso. Pela confiança para realização da presente pesquisa.

Aos Professores, Dr Mario Emilio Teixeira Dourado Junior e Dra Selma Maria Bezerra Jeronimo, por me apresentarem a SGB e permitirem que trabalhasse com os dados do Instituto. Pelas orientações e lições, sempre tão solícitos. São exemplos de pesquisadores.

Aos Professores, Dr Sandro José de Souza, Dr Rodrigo Juliani Siqueira Dalmolin e ao restante dos professores que compõem o BioME.

Ao Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada por ter aceitado participar de minha banca e qualificação, além de ter participado da minha formação científica de modo indireto.

Aos meus amigos Jota, Ivanice Bezerra, Rebecca Suellen, Dafiny, Mabi, Heverton, Julio, Romulo e Bob, por terem me recebido de braços abertos em Natal. Pela ajuda na realização de forma direta e indireta da presente pesquisa. Momentos felizes, difíceis, divergências de opinião e “o sem medo de perder a piada”.

Ao povo da “Sala de cima do Biome”/“Patrulha da noite”/“A muralha”, ao qual fazia parte, formada originalmente por Diego Teixeira/Demo, Ricardo Victor/O conciliador, Viviane Nogueira/A índia, Laíse/A pegadora, Leônidas/O Contractor/Dor e sofrimento, a membro facultativa Iara/A deusa do R, PH, Danilo/O jovem. Pela amizade, crescimento, momentos felizes e discussões científicas/filosóficas/fisiológicas. Sempre irei carregá-los no coração.

Ao povo da “sala de baixo do Biome”/“Porto real” André Fonseca/Serhumaninho, Diego 2/Do cavaco, Paulo Branco, Danilo IC, Refael/Fofa, Vandi/O dançarino, Karla/A assustada, Clovis/O sabio. Pela amizade, crescimento e momentos felizes.

Aos integrantes e ex-integrantes do LASIS, pela colaboração.

Aos amigos João Garcia, Jedson, Aurilene, Ricardo Basto, Daniel, Nayane, Dora, Nágila Carneiro, e Tatiana, com as quais aprendi muito.

A minha noiva Renata Ferreira Nascimento pelo apoio, amizade e compreensão.

Aos meus pais, Maria Angelina e Francisco Antônio Moreira, pelo amor e apoio incondicional.

A meus irmãos, Francisco Antonio Fernandes Moreira, Analberto Jardas Fernandes Moreira e Jaine Fernandes Moreira pelo apoio, amizade, conselhos e união.

### **Agradecimentos Institucionais**

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro essencial a realização desta conquista.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e *National Institutes of Health* (NIH) pelo apoio financeiro a projetos de pesquisa ligados ao desenvolvimento da tese de Doutorado.

A Universidade Federal do Ceará (UFC), a qual pertence o programa de pós-graduação, e Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), na qual desenvolvi toda a tese de doutorado.

Ao Instituto Medicina Tropical do Rio Grande do Norte (IMT-RN), por ter sedido as bibliotecas transcriptômicas, ao Instituto Metropoli Digital (IMD), Centro Multiusuário de Bioinformática (BioME) e Núcleo de Processamento de Alto Desempenho (NPAD), locais onde foram desenvolvidas as análises.

“A dúvida é o principio da sabedoria.”

(Aristóteles)

## RESUMO

A Síndrome de Guillian-Barré (SGB) é uma polirradiculoneuropatia aguda, monofásica, e desde a erradicação da poliomielite é a principal causa de paralisia no mundo. Essa síndrome possui um componente autoimune caracterizado, em parte, pelo mimetismo molecular com a produção de anticorpos que causam severos danos aos nervos periféricos. Tal dano resulta em sintomas, que incluem paralisia flácida aguda. Cerca de 30% dos casos necessitam de assistência respiratória. Os casos de SGB geralmente são precedidos por agentes de infecção, como *Campylobacter jejuni* e vírus. Parece que a patogênese de *C. jejuni* em SGB está associada a anticorpos anti-gangliosídeos, que reagem de forma cruzada com os gangliosídeos presentes no axolemma do nervo, principalmente nos nervos periféricos. O presente estudo teve como objetivo analisar bibliotecas transcriptômicas de casos com SGB oriundas do sangue periférico, diagnosticados com diferentes subtipos (Desmielinizante, Axonal e Miller-Fisher), a fim de identificar genes e vias relacionados ao desenvolvimento de SGB e potenciais alvos de modulação. Para isso, foram obtidas 24 bibliotecas de 12 pacientes diagnosticados com SGB e um caso espanhol. A análise de qualidade, alinhamento, montagem, expressão global e redes de interação de genes foram realizadas usando os programas FastQC, Bowtie, TopHat, HTSeq, edgeR, RedeR. Identificamos genes diferencialmente expressos que permitiram o mapeamento de vias relacionadas a inflamação e resposta imune, tais como Jak-STAT, sinalização de receptores de células B e T, receptores *Toll-like*, além imunoglobulinas IgG e receptores associados. Além disso, encontramos genes com potencial para biomarcadores e alvos terapêuticos, com destaque para *EGR1 e 2*, *HBEGF* e *SIGLEC1*. Esses resultados fornecem uma visão panorâmica das possíveis respostas durante o curso de SGB.

**Palavras-chave:** Alvos-terapêuticos. Biomarcadores. Sangue periférico. Síndrome de Guillian-Barré. Transcriptômica.

## ABSTRACT

Guillain-Barré syndrome (GBS) is an acute polyradiculoneuropathy, monophasic, and since the eradication of poliomyelitis is the principal cause of paralysis in the world. This syndrome seems to have an autoimmune component characterized, in part, by molecular mimicry with production of antibodies that causes severe damage to peripheral nerves. Such damage results in symptoms, which include acute flaccid paralysis. About 30% of the cases need respiratory assistance. GBS cases is usually preceded by infection agents, such as *Campylobacter jejuni* and viral infections. It seems that the pathogenesis of *C. jejuni* in GBS is associated with anti-gangliosides antibodies, which cross react with gangliosides present in the nerve axolemma, mainly in the peripheral nerves. Hence, the present study aimed to analyze transcriptomic libraries from patients with GBS, diagnosed with the different subtypes (demyelinating, axonal and Miller-Fisher), in order to identify genes and key pathways related to GBS development and potential target for modulation. For this, 24 libraries were obtained from 12 Brazilian cases and a Spanish case. The quality analysis, alignment, assembly, global gene expression and network were performed using FastQC, Bowtie, TopHat, HTSeq, edgeR and RedeR. We identify genes were differentially expressed between symptomatic and the recovery phase ( $p < 0.01$  and fold change 1). Transcript annotation based on GO and KEGG terms showed changes in expression of genes related to inflammation, as Jak-STAT, B and T cell receptor signaling, Toll-like, in addition to IgG immunoglobulins and associated receptors. Also, pathways related to neurodegenerative, autoimmune and infectious diseases were enriched during symptomatic phase when compared to recovery phase. We suggest *EGR2*, *HBGF* e *SIGLEC1* as potentials progression biomarkers in SGB and therapeutic targets. These results provide an overview of possible responses during the course of GBS.

**Palavras-chave:** Biomarkers. Guillian-Barré Syndrome. Peripheral Blood. Transcptomes. Therapeutic targets.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	Pág
Figura 1	Modelo de surgimento e progressão de SGB, a recuperação de sequelas para alguns casos pode levar anos..... 16
Figura 2	Modelo das danos causados aos nervos periféricos em SGB, para as subformas Desmielinizante e Axonal..... 19
Figura 3	Modelo contendo as células responsáveis pela imunidade. Apresenta o conjunto de Leucócitos e citação ao sistema do complemento..... 23
Figura 4	Modelo de moléculas reconhecidas pela família de TRLs humanos. Destaca-se o tipo de biomolécula reconhecido pelo receptor..... 26
Figura 5	Características dos casos brasileiros: Identificadores, Sexo, Idade e Coleta. Informação obtidas na tese de doutorado de DOURADO JUNIOR (2015)..... 35
Figura 6	Características do caso espanhol: Identificadores, Sexo, Idade e Tempo de coleta. Informações obtidas e modificadas do artigo publicado por DONCEL-PÉREZ e colaboradores (2016)..... 36
Figura 7	Workflow da metodologia utilizada..... 37
Figura 8	Quantidade das leituras brutas, alinhadas, contadas e com múltiplos alinhamentos..... 40
Figura 9	Estatística descritiva dos resultados dos transcriptomas considerados na análise..... 43
Figura 10	Genes diferencialmente expressos entre os estados sintomáticos e de recuperação, considerando os subtipos estudados (Desmielinizante, Axonal e Miller-Fisher)..... 44
Figura 11	Representação da expressão relativa de genes entre as fases sintomáticas e recuperadas para cada caso..... 48
Figura 12	Representação dos genes com maiores variações positivas e negativas nos transcriptomas em estudo..... 49
Figura 13	Representantes de <i>KEGG pathways</i> e termos de <i>GO</i> enriquecidos para os genes diferencialmente expressos observados em todos os casos..... 51
Figura 14	Rede de interação proteína-proteína (PPI) com informações para <i>Homo sapiens</i> , contendo genes diferencialmente expressos em comum entre os casos para o subtipo Desmielinizante..... 53
Figura 15	Rede de interação proteína-proteína (PPI) com informações para <i>Homo sapiens</i> , contendo genes diferencialmente expressos em comum entre os casos para o subtipo Axonal..... 54
Figura 16	Rede de interação proteína-proteína (PPI) com informações para <i>Homo sapiens</i> , contendo genes diferencialmente expressos em comum entre os casos para o subtipo Miller-Fisher..... 55
Figura 17	Quantidade das leituras brutas, alinhadas, contadas, com múltiplos alinhamentos e estatística descritiva dos resultados dos transcriptomas considerados na análise..... 57
Figura 18	Representantes de termos de <i>GO</i> enriquecidos e <i>KEGG pathways</i> no caso de SGB considerado pelo grupo espanhol..... 58
Figura 19	Principais genes e possíveis mecanismos que podem estar envolvidos durante a progressão de SGB. Construído com base nas funções desempenhadas pelos genes..... 74

	Pág
Tabela 1	
Modelo com as principais mecanismos e genes que podem estar envolvidos com a progressão de SGB. Foi construído com base nas funções desempenhadas pelos genes e tempos de respostas vistas em cada caso brasileiro.....	45-46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APOBEC3A	Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme Catalytic
BCL6	Artrite Reumatoide – AR Basic Helix-Loop-Helix Family Member E40
PBMC	Células mononucleadas do sangue periférico
ChiP-Seq	Chromatin Immunoprecipitation Sequencing
CROCC2	Ciliary Rootlet Coiled-Coil, Rootletin Family Member 2
C1QB	Complement C1q B Chain
MHC	Complexo de Histocompatibilidade
CPM	Contagens por milhão
CLEC	C-Type Lectin Domain Family
CXCL	C-X-C Motif Chemokine Ligand
CXCR	C-X-C Motif Chemokine Receptor
SCO2	Cytochrome C Oxidase Assembly Protein
DAMPs	Damage-Associated Molecular Patterns
EGR	Early Growth Response
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPHB2	EPH Receptor B2
EPHB2	Ephrin type-B receptor 2
EM	Esclerose Múltipla
FDR	False Discovery Rate
TNF	Fator de Necrose Tumoral
FT	Fator de transcrição
NF- $\kappa$ B	Fator Nuclear kappa B
FCGR	Fc Fragmento of IgG Receptor
FCGR	Fc Receptor Gamma
FCRL	Fc Receptor Like
FC	Fold Change
FDA	Food and Drug Administration
FOS	Fos Proto-Oncogene
GATA2	GATA Binding Protein 2
GO	Gene Ontology
HB	Hemoglobin Subunit
HBEGF	Heparin Binding EGF Like Growth Factor
HIF1A	Hipoxia Inducible Factor 1 Alpha Subunit
HLA	Histidine Decarboxylase - HDC Human Leukocyte Antigen
IRAK	IL-1 -receptor-associated kinase
IGH	Immunoglobulin Heavy Constant
IGKV	Immunoglobulin Kappa Variable
IGLC	Immunoglobulin Lambda Constant
IGLV	Immunoglobulin Lambda Variable
ID3	Influenza A subtipo H1N1 - H1N1 Inhibitor Of DNA Binding 3 HLH Protein
IMT-RN	Instituto de Medicina Tropical do Rio Grande do Norte
IFIT	Interferon Induced Protein With Tetratricopeptide
IL	Interleucina

IL1RN	Interleukin 1 Receptor Antagonist
JAK	Janus Kinase
JUP	Junction Plakoglobin
JUND	JunD Proto-Oncogene
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LPS	Lipopolissacarídeo
LOS	Lipooligossacarídeo
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
MSR	Macrophage Scavenger Receptor
MSR1	Macrophage Scavenger Receptors 1
MDA5	Melanoma differentiation associated factor 5
CD	Membrane-Bound Immunoglobulin-Associated Protein
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MYC	Motif Chemokine Receptor - CCR3 MYB Proto-Oncogene Transcription Factor
MEF	Myocyte Enhancer Factor
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCR	Natural Cytotoxicity Triggering Receptor
NCR1	Natural Cytotoxicity Triggering Receptor 1
NK	Natural Killer
NRAV	Negative Regulator of Antiviral Response
NRGN	Neurogranin
NFKBI	NFKB Inhibitor
NOG	Noggin
NFIL3	Nuclear Factor, Interleukin 3 Regulated
NR4A	Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A
NLRs	Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PTGS	Prostaglandin-Endoperoxide Synthase
RORA	RAR Related Orphan Receptor A
RORC	RAR Related Orphan Receptor C
qPCR	Reação em Cadeia de Polimerase Quantitativa
TLRs	Receptores Toll-like
CLRs	Receptores lectinas do tipo C
RE	Retículo Endoplasmático
RLRs	Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like-receptors
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene I
STRING	Search Tool for Recurring Instances of Neighbouring Genes
SEPT4	Septin 4
RNA-Seq	Sequenciamento de RNA
SIGLEC1	Sialic Acid Biding Ig Like Lectin 1
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
STAB1	Stabilin 1
TRAV16	T-Cell Receptor Alpha Variable 16
TRIF	TIR-domain-containing adaptor inducing interferon (IFN)-Beta
TNFAIP	TNF Alpha Induced Protein

TGF	Transforming Growth Factor
UBE2T	Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 T
UniProt	Universal Protein
ZEB2	Via de sinalização de diferenciação mielóide de resposta primaria

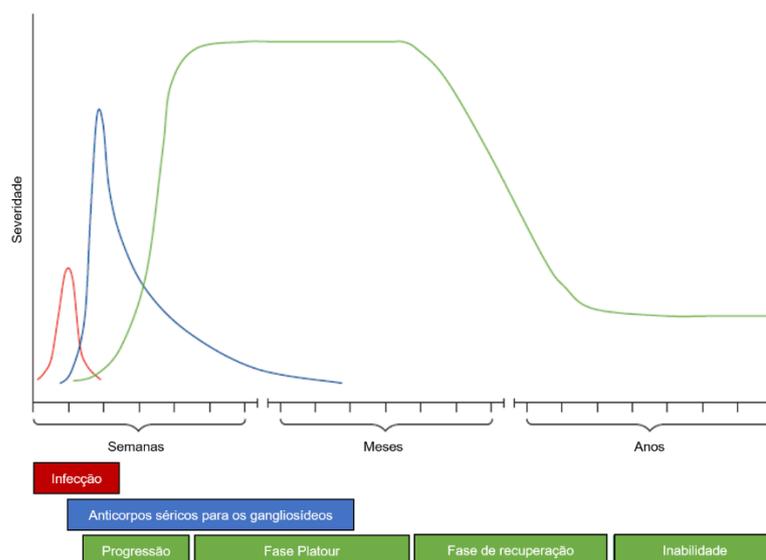
## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16-18
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	
2.1	<b>Síndrome de Guillain-Barré – Estado da arte</b> .....	18-21
2.2	<b>Doenças autoimunes</b> .....	21-22
2.3	<b>Vias do sistema imune inato relacionados a doenças autoimunes</b> .....	22-29
2.4	<b>Tratamentos para doenças autoimunes e risco associados</b> .....	29-31
2.5	<b>Bioinformática no entendimento de doenças autoimunes</b> .....	31-32
3	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	33
4	<b>OBJETIVO</b>	
4.1	<b>Objetivo Geral</b> .....	34
4.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	34
5	<b>METODOLOGIA</b>	
5.1	<b>Características dos casos estudados</b> .....	35-36
5.2	<b>Workflow de análise</b> .....	36
5.3	<b>Bibliotecas</b> .....	36-37
5.4	<b>Estratégia de montagem e análise da expressão global e diferencial de genes</b> .....	37-38
5.5	<b>Análise de enriquecimento dos termos de GO, KEGG pathway e construção de redes de interação</b> .....	38-39
6	<b>RESULTADOS</b>	
6.1	<b>Definição dos perfis transcricionais de células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) em 10 casos brasileiros com SGB, tendo como referência o estado de recuperação em todos os casos e por subtipo</b> .....	40-46
6.2	<b>Definição dos perfis transcricionais de células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) em 12 casos brasileiros com SGB, tendo como referência seus respectivos estados de recuperação</b> .....	47-55
6.3	<b>Comparação entre os perfis obtidos nos casos brasileiros a outros estudos transcriptômicos com SGB em Humanos</b> .....	56-58
7	<b>DISCUSÃO</b>	
7.1	<b>Principais genes e vias moduladas em células mononucleadas do sangue periférico nos casos estudados de SGB</b> .....	59-72
7.2	<b>Proposição de modelo com os genes biomarcadores em SGB e alvos-terapêuticos</b> .....	72-74
8	<b>CONCLUSÃO</b> .....	75
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	76-88
	<b>APÊNDICES</b> .....	89-94
	<b>ANEXO</b> .....	95

## 1 INTRODUÇÃO

George Guillain, Jean Alexandre Barré e André Strohl descreveram a síndrome de Guillain-Barré (SGB) em 1916. Trata-se de uma doença precedida por infecção ou outro estímulo imunogênico que induz uma resposta imune aberrante contra alvos dos nervos periféricos e/ou raízes nervosas (UNCINE, 2015). Tais danos resultam em quadro clínico caracterizado por paralisia flácida e arreflexia que, em casos graves, culmina em complicações na deglutição e no trato respiratório, podendo levar ao óbito (WILLISON; JACOBS; VAN DOORN, 2016). Segundo a literatura, após a erradicação da paralisia infantil essa síndrome se apresenta como principal causa de paralisia flácida no mundo (VAN DOORN; RUTS; JACOBS, 2008; MCGROGAN et al., 2009). Ela apresenta um curso monofásico e é autolimitada sem reincidência. Entretanto 20% dos casos ficam com sequelas e aproximadamente 5% falecem, mesmo sob tratamento. A figura 1 apresenta modelo proposto para o surgimento e progressão de SGB.

Figura 1. Modelo de surgimento e progressão de SGB, a recuperação de sequelas para alguns casos pode levar anos.



Fonte: Adaptado de WILLISON, JACOBS e VAN DOORN, 2016.

A incidência estimada de SGB é de 0,8 a 1,9 casos por 100.000 habitantes por ano, com relatos de flutuações sazonais ou epidêmicas, principalmente

associados a agentes infecciosos e campanhas de vacinação (WEBB et al., 2014; GHADERI et al., 2015). Além dessas causas clássicas, no final da década de 90 a comunidade científica começou a observar casos de SGB por conta de tratamento com base em bloqueadores de TNF (MOHAN et al., 2001). O principal responsável por cerca de 1/3 dos casos descritos relacionados ao desencadeamento desta doença autoimune é a bactéria *Campylobacter jejuni* (HUIZINGA et al., 2015). Nesses casos, os danos estão relacionados ao mimetismo molecular do antígeno da membrana externa de *C. jejuni* com gangliosídeos presentes nos nervos periféricos (WILLISON; JACOBS; VAN DOORN, 2016).

Em certos casos os pacientes com SGB se recuperam sem apresentar qualquer sequela, embora seja necessário um intensivo tratamento, principalmente para evitar as complicações que podem levar a óbito. Existem duas principais terapias usadas por médicos: uma baseada em plasmáfese e outra na utilização de imunoglobulinas.

O uso de modelos animais foi importante para a caracterização dos mecanismos das lesões aos nervos deferidos pelo sistema imune adaptado. No entanto, ainda não se sabem quais mecanismos podem levar a respostas persistentes demonstradas por células B e T. Logo, pouco se sabe sobre as vias do sistema inato que possam estar influenciando o quadro característico de SGB.

Por outro lado, em diversas doenças autoimunes já são conhecidos quais receptores celulares do sistema inato estão apresentando uma resposta desbalanceada. Tais receptores têm sido alvos de muitos estudos, principalmente por serem prováveis alvos para construção de terapias mais eficientes ou mesmo entender de forma adequada como o desequilíbrio característico de doenças autoimunes é gerado. Em alguns casos essas moléculas são relacionadas a uma pré-disposição por apresentarem polimorfismo ou maior frequência alélica. Para SGB, muito pouco é conhecido acerca desses marcadores genéticos ou a origem desse desequilíbrio, sendo que no caso dos marcadores os achados são controversos.

Os bancos de dados biológicos públicos já disponibilizam bibliotecas transcriptômicas, tanto relacionadas a SGB, como outras doenças autoimunes. Tais bibliotecas representam importantes fontes de dados que podem fornecer indícios para explicar a principal origem dos mecanismos que caracterizam SGB. Além disso, sua análise mais detalhada por meio da bioinformática e da biologia de sistemas pode

servir como base para criação de estratégias experimentais para um melhor entendimento desta síndrome e pode também elencar novos alvos para criação de alternativas terapêuticas. Portanto, o presente trabalho analisou dados oriundos de bibliotecas de transcriptômicas disponíveis em bancos de dados públicos, assim como dados gerados pelo Instituto de Medicina Tropical do Rio Grande do Norte (IMT-RN) de pacientes com SGB, para propor os possíveis mecanismos básicos proeminentes no desencadear desta doença, bem como a identificação de redes gênicas visando a busca de alvos terapêuticos.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Síndrome de Guillain-Barré - Estado da arte**

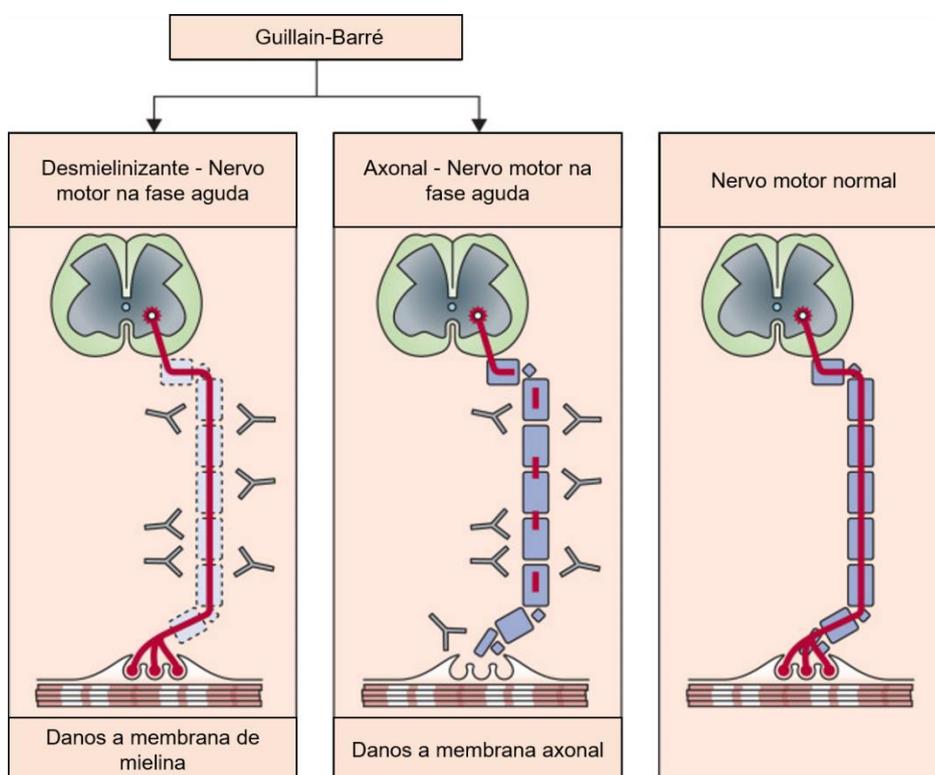
A síndrome de Guillain-Barré foi descrita pela primeira vez em 1916 e é uma desordem de cunho autoimune rara, apresentando baixa incidência (GUILLAIN; STROH, 1916; LISRAELI et al., 2012; ANSAR; VALADI, 2015). Ela demonstra predominância em homens idosos. A SGB apresenta alguns sub-tipos e variações destes, entre os quais destacam-se: Axonal, Desmielinizante e Miller-Fischer (ANSAR e VALADI, 2015). Ainda, pode haver os tipos de neuropatia axonal motora, sensitiva aguda e mais recentemente forma severa associada a crianças (SAUTER et al., 2015; PONS et al., 2015). Em estudo realizado por Dourado Junior (2015) no estado do Rio Grande do Norte - Brasil, a incidência foi de 0.3/100.000 com predominância para a forma desmielinizante em jovens.

Os subtipos de SGB são classificados pelos danos causados aos nervos periféricos. Danos aos axônios nos nódulos de Ranvier e placa motora, são características do subtipo Axonal, enquanto que na subforma Desmielinizante o dano é direcionado a camada de mielina (FIGURA 2). A forma Axonal é de lenta regeneração, podendo apresentar sequelas. Já o processo de remielinização ocorre de forma rápida e naturalmente (WILLISON; JACOBS; VAN DOORN, 2016). A eletroneuromiografia é uma importante ferramenta clínica para diferenciar as variantes desmielinizante e axonal (DOURADO JUNIOR, 2015).

O desenvolvimento dessa doença autoimune ocorre após quadro de infecção, administração de vacinas ou tratamento com bloqueadores de TNF. De modo geral SGB é precedida principalmente por infecções no trato respiratório e gastrointestinal

(ISRELI et al., 2012). Pelo menos 1/3 dos casos estão relacionados a infecção por *Campylobacter jejuni* (ISRELI et al., 2012). Também há relatos após infecções por outros agentes infecciosos: citomegalovírus, vírus Epstein-Barr, vírus varicela-zóster, *Mycoplasma pneumoniae*, influenza A e B, chikungunya, herpes e, mais recentemente, o vírus Zika (LEBRUN et al., 2009; LOLY et al., 2009; IQBAL et al., 2015; PATEL et al., 2015).

Figura 2. Modelo das danos causados aos nervos periféricos em SGB, para as subformas Desmielinizante e Axonal.



Fonte: Adaptado de WILLISON, JACOBS; VAN DOORN, 2016.

O subtipo axonal, apesar de menos frequente, está melhor caracterizado. Esse subtipo se dá via mimetismo molecular do lipooligossacarídeo (LOS) de origem bacteriana aos gangliosídeos presentes em elevadas quantidades nos nervos periféricos, induzindo a formação de anti-GM1 (ISRELI et al., 2012). Esse modelo é o proposto para infecções por *C. jejuni*. Para infecções virais, acredita-se que seja por mimetismo molecular de estruturas presentes no capsídeo por incorporação de gangliosídeos durante o processo de infecção, levando ao surgimento da SGB. Entretanto, para o subtipo desmielinizante, a cascata imunológica não está

totalmente compreendida. No que se refere a origem via tratamento com anti-Fator de necrose tumoral (anti-TNF, sigla em inglês), o processo de desencadeamento ainda não é compreendido.

Com a formação desses autoanticorpos IgG (GM1, GD1a e GD1b) circulantes, é ativada a imunização contra os gangliosídeos presentes principalmente no axônio de nervos motores periféricos (ASTHANA et al., 2015). A presença de determinados tipos de autoanticorpos já é correlacionada ao subtipo específico de GBS (KOGA et al., 2015). Esse quadro culmina em danos nessas estruturas desferidas por células T autoreativas (ZHANG et al., 2015). O resultado é uma série de impedimentos físicos, tais como fraqueza muscular, paralisia facial, por vezes dificuldade em respirar, entre outros (WINER, 2014). No tocante ao tratamento, a primeira forma terapêutica disponível foi a plasmaférese. Esta tem como intuito a retirada do excesso substâncias pró-inflamatórias, tais como autoanticorpos e citocinas. A outra forma de tratamento baseia-se na utilização de imunoglobulinas IgEV. Assim, acredita-se que ocorra o bloqueio de receptores IgG-*like* e de anticorpos, podendo também permear um retorno ao controle da resposta imune (DOURADO JUNIOR, 2015). Embora já se tenha as formas de tratamentos citados, é importante o desenvolvimento de terapias que sejam específicas ao subtipo de SGB.

Assim como para outras autoimunes, a ocorrência de SGB está associada a alguns fatores de risco. Tais fatores estão correlacionados a fatores ambientais e genéticos. O primeiro engloba infecções e imunização, aos quais já foram citados os principais patógenos e vacinas relacionadas ao surgimento de SGB. Ghaderi e colaboradores (2015) afirmam que o risco para o surgimento de SGB aumenta durante pandemias. No entanto, segundo estes mesmos autores não houve esse aumento na campanha de imunização de Influenza A subtipo H1N1 (H1N1). Existem também, relatos que correlacionam variações sazonais a aumento na incidência de SGB, contudo esse ainda é um dado controverso (WEBB et al., 2015; VERITY et al., 2014).

No Nordeste brasileiro houve aumento na flutuação do número de casos de SGB, que se acredita estarem relacionados aos surtos de infecção pelo vírus da Zika. Alguns pacientes com SGB tiveram testes positivos confirmados para o vírus com base em ELISA e qPCR (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015). Contudo, necessita-se de estudos mais conclusivos para tal correlação. Em 2013, ocorreu um surto de casos de febre Zika na Polinésia Francesa correlacionado ao aumento na incidência

de GBS (IOOS et al., 2013). Como o vetor desse vírus é o *Aedes aegypti*, mesmo carreador do vírus Chikungunya e da dengue, o aumento também foi atrelado ao vírus da dengue.

Bibliotecas de transcriptomas de pacientes com GBS, utilizando a técnica de RNA-Seq, foram obtidas durante o estudo desenvolvido por Dourado Junior (2015). Neste, foi realizada uma comparação entre os perfis de pacientes durante as fases aguda e de recuperação da síndrome, em casos do estado do Rio Grande do Norte. Os resultados demonstraram alguns genes tendo sua expressão influenciadas, além de ampliar o conhecimento em algumas das vias. Outro trabalho utilizando RNA-Seq foi disponibilizado no NCBI/*Gene Expression Omnibus* sob nº GSE72748 em 05 de setembro de 2015 por um grupo espanhol com um paciente acometido por GBS e seu gêmeo sadio (DONCEL-PÉREZ et al., 2016). Tais trabalhos figuram importante fonte de dados para o fornecimento de pistas que possam levar a um melhor entendimento dos fatores moleculares que podem levar a patogenia de SGB.

Com base no que foi descrito para SGB percebe-se que ainda é um desafio no estudo dessa doença autoimune quais os fatores genéticos e moleculares proeminentes que resultam em seu desencadeamento. Três pontos podem ser destacados para o estudo com SGB: (i) o entendimento dos mecanismos que levam a esta síndrome; (ii) a persistência da resposta imune aguda; e (iii) sua não recorrência. A elucidação destes pontos pode levar a geração de terapias mais eficientes.

## **2.2 Doenças autoimunes**

O reconhecimento de moléculas estranhas ao organismo é um processo imprescindível para humanos e outros seres vivos. Os antígenos são reconhecidos e processados por células do sistema imunológico inato, após sua apresentação às células humorais (resposta adaptativa) e, em um período que varia de alguns dias a meses, culmina na resolução da infecção. Tão importante quanto reconhecer moléculas estranhas ao organismo, é o controle da auto-reatividade, ou seja, o não reconhecimento de tecidos saudáveis do próprio organismo. A perda de tal capacidade resulta em doenças autoimunes (SINHA et al., 1990).

Desde de sua primeira descrição, a comunidade científica tem procurado entender as bases para o surgimento e estabelecimento de doenças autoimunes (MARRACK; KAPPLER; KOTZIN, 2001). Entretanto, tal tarefa tem se mostrado laboriosa devido à baixa incidência de algumas delas. A artrite reumatoide (AR) e o Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) são exemplos de exceções, pois são bem descritas e com vasta literatura disponível (OKADA et al., 2014; INÊS et al., 2015).

Segundo Sinha e colaboradores (1990) doenças autoimunes apresentam duas grandes classificações: órgãos-específicas e multissistêmicas. As primeiras caracterizam-se por serem órgão/tecidos específicas, sendo a SGB um exemplo. No segundo caso ocorre a produção de “autoanticorpos” que reconhecem moléculas que fazem parte de processos comuns entre os tecidos, tais como, replicação e transcrição, como ocorre em LES. Contudo, para Mackay e Rosen (2001) a classificação com base nos mecanismos que levam a um tipo específico de autoimune é mais adequada. Além disso, os mesmos autores afirmam que a classificação proposta anteriormente apresenta utilidade apenas do ponto de vista clínico.

O surgimento de doenças autoimunes não é completamente entendido. Atualmente, sabe-se que pode compreender a exposição prévia a agentes infecciosos (infecção natural ou apresentação por vacinas), advindas por tratamento com agentes biológicos (ex: terapias baseadas em bloqueio de TNF), fatores genéticos e ambientais (PEREZ-ALVAREZ et al., 2013; VERITY et al., 2014; PATEL et al., 2015). Essas características têm impactos no desenvolvimento de tratamentos e drogas que levem a uma resolução rápida de tais enfermidades. Por vezes o tempo demasiadamente longo da recuperação culmina em sequelas aos pacientes. Desde sua descoberta, os receptores de células do sistema imune inato têm sido alvos de estudos para tentar buscar explicações sobre os desequilíbrios que levam as doenças autoimunes, ou seja, a fonte do problema que gera células B e T autoreativas.

### **2.3 Vias do sistema imune inato relacionadas a doenças autoimunes**

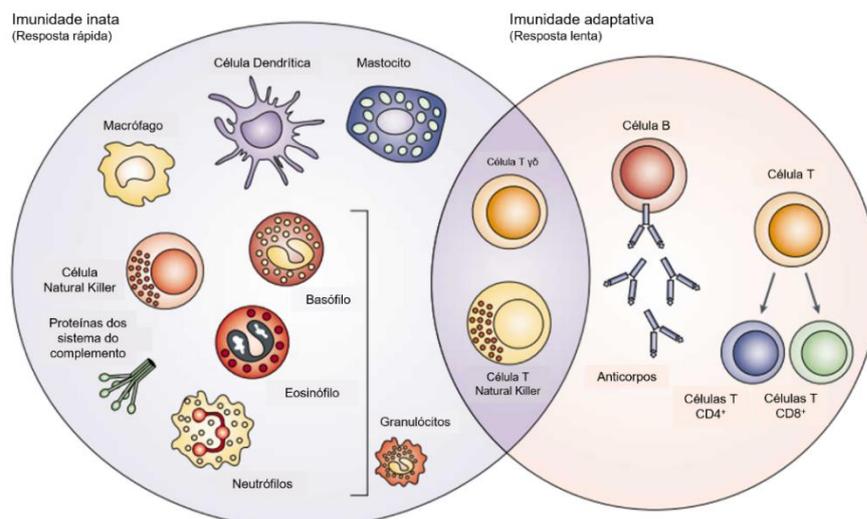
Como mencionado anteriormente, o desencadeamento das doenças autoimunes está relacionado a uma desarmonia no controle da resposta imunológica, ou seja, descontrole do sistema imune inato ou problemas na destruição de linfócitos autoreativos (BLANCO et al., 2008). Esse desequilíbrio é resultante da produção

exacerbada de proteínas (pertencentes ao sistema do complemento), citocinas e quimiocinas, reflexo do controle inadequado das vias relacionadas à inflamação. Esse cenário culmina na ativação de linfócitos ou ainda na produção inadequada dessas células, podendo haver produção de linfócitos anômalos (RABINOVICH; CROCI, 2012).

As células responsáveis pela defesa do corpo compreendem alguns tipos, são denominadas coletivamente de Leucócitos (FIGURA 3). São subclassificadas em Granulosas e Hialinas, devido morfologia celular e constituição. Incluem células relacionados a resposta imune inata, como as células Dendríticas, Macrófagos, Mastócitos, Basófilos, Eosinófilos e Neutrófilos. Ainda relacionadas a resposta inata, pode-se citar as proteínas do sistema do complemento. As células B e T compõem o sistema imune adaptativo. Desequilíbrios ou respostas aberrantes nesses tipos celulares estão relacionados a doenças autoimunes.

As vias nas células citadas acima são relatadas como estando ativas em doenças autoimunes. Desde a década de 90, o complexo de histocompatibilidade (MHC) é relatado como ativo em tais enfermidades. O MHC-I e II são responsáveis pelo reconhecimento e apresentação de antígenos de natureza peptídica as células T CD8+ e CD4+, respectivamente (NEEFJES et al., 2011). As moléculas pertencentes a esse complexo são virtualmente presentes na superfície de todas as células do corpo (KURTS et al., 2010).

Figura 3. Modelo contendo as células responsáveis pela imunidade. Apresenta o conjunto de Leucócitos e citação ao sistema do complemento.



Fonte: Adaptado de DRANOFF, 2004.

Em MHC-I, desde do processamento até a apresentação, o antígeno passa por alguns compartimentos celulares responsáveis por certas etapas. Inicialmente as proteínas/peptídeos são degradadas por proteases presentes no núcleo ou citoplasma e os fragmentos obtidos são translocados para retículo endoplasmático (RE), onde ocorre formação do complexo antígeno-proteínas assistido por proteínas do tipo chaperonas. Caso uma falha na formação deste complexo ocorra, o peptídeo deixa o ER e volta para o citosol para degradação (ROELSE et al., 1994).

O MHC-I é codificado por três genes: *Human Leukocyte Antigen (HLA)-A*, *HLA-B* e *HLA-C* (KURTS et al., 2010). Os três genes apresentam 8 éxons, sendo os éxons 3 e 4 as regiões onde podem ocorrer polimorfismos. Essas modificações estão relacionadas à especificidade da ligação, assim aumentando as possibilidades de reconhecimento de peptídeos. Relatos demonstram uma maior expressão de *HLA-A* e *HLA-B* em circunstâncias normais. As proteínas codificadas por tais genes são heterodímeros constituídos por uma cadeia leve e uma pesada, a primeira é responsável por ancoragem na membrana plasmática e a segunda pelo reconhecimento do antígeno. Já foram encontrados polimorfismos em tais genes que podem estar relacionados ao aumento de suscetibilidade a autoimunes (PAL; BANERJEE, 2015).

Variados tipos celulares são responsáveis pelo reconhecimento e posterior apresentação via MHC de moléculas estranhas (SANTEGOETS et al., 2011). Entretanto, dentre esses tipos celulares os dendritos vêm ganhando atenção por apresentarem relação com o surgimento das doenças autoimunes. Em trabalho de revisão, Blanco e colaboradores (2008) citam que desequilíbrios nessas células já foram relacionadas a essas doenças. Ainda, acredita-se que elas são as principais células responsáveis pela criação de uma “ponte” entre a resposta inata e a adaptativa (VLIET et al., 2008).

Esse tipo celular, assim como outros, apresenta vias para o reconhecimento de padrões moleculares relacionados a micróbios (do inglês *pathogen-associated molecular patterns*, *PAMPs*). Tais vias são compostas por: receptores *Toll-like* (TLRs), receptores lectinas do tipo C (CLRs), *nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors* (NLRs) e *retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like-receptors* (RLRs) (IWASAKI; MEDZHITOV, 2010). Além disso, a ativação dessas vias pode estar associada ao reconhecimento de padrões moleculares associados a danos

(*damage-associated molecular patterns* - DAMPs) (LIU et al., 2014). Estas são responsáveis pelo surgimento de respostas adequadas e específicas ao agente infeccioso, ou seja, são o ponto de modulação do sistema imune inato, além de constituírem uma “ponte” para geração da resposta imune adaptativa (GEIJTENBEEK; GRINGHUIS, 2009; VARKI, 2011).

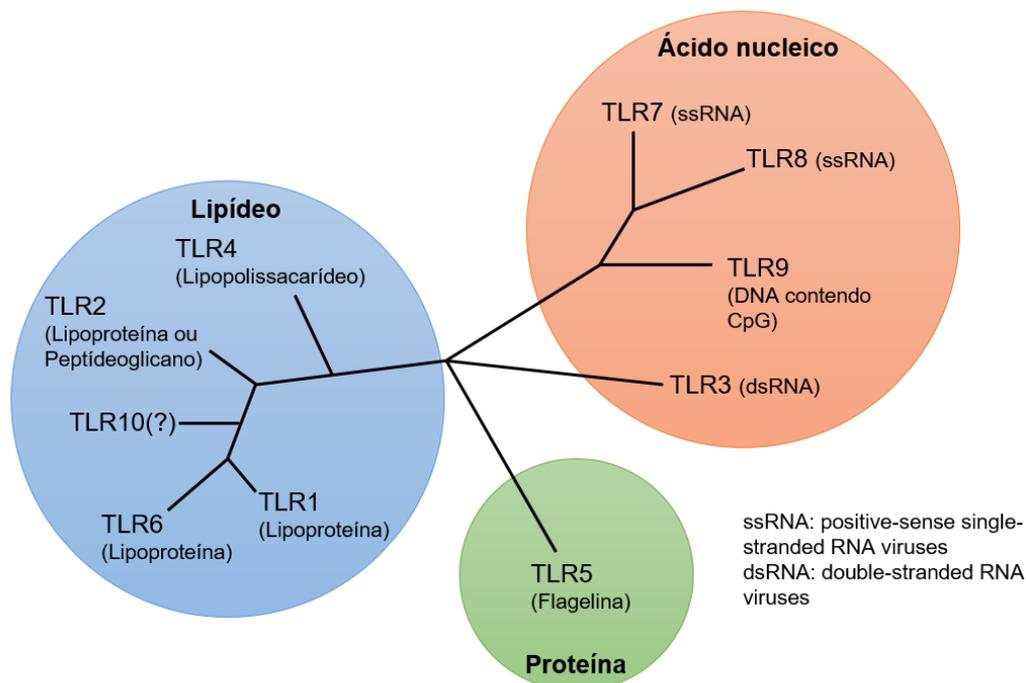
Receptores *Toll-like* são descritos na literatura como envolvidos com doenças autoimunes, tais como Esclerose Múltipla (EM), LES, entre outras (VOLLMER et al., 2005; VAN LIESHOUT et al., 2009). Ativação dessa via resulta no aumento da produção de citocinas e quimiocinas. Por apresentar tal função, eles podem ter importante papel na geração do desequilíbrio que desencadeiam estas doenças (CHEN; SZODORAY; ZEHER, 2015). Receptores *Toll-like* são glicoproteínas integrais de membrana ou intracelulares, apresentando domínio N-terminal de reconhecimento de PAMPs/DAMPs, região de interação com a membrana e domínio C-terminal relacionado a ativação a jusante (*upstream*) da sinalização (LIU et al., 2014).

Os TLRs podem ser distinguidos por sua localização, nível de expressão e especificidade de ligação (FIGURA 4). TLR1, 2, 4, 5, 6 e 10 são exemplos de receptores extracelulares associados a membrana plasmática, ligados ao reconhecimento de padrões moleculares bacterianos (TAKEDA; AKIRA, 2005; KAWAI; AKIRA, 2011). TLR3, 7, 8 e 9 são encontrados em compartimentos intracelulares e são responsáveis pelo reconhecimento de ácidos nucleicos advindos de vírus, bactérias e células do próprio hospedeiro (CHEN; SZODORAY; ZEHER, 2015). Inicialmente os membros intracelulares eram os mais estudados para fins terapêuticos, contudo trabalhos recentes têm focado TLR2 e 4 em doenças autoimunes (LIU et al., 2014).

Adicionalmente, os TLRs ativam vias de sinalização de diferenciação mielóide de resposta primária (MyD88) e *TIR-domain-containing adaptor inducing interferon (IFN)-Beta* (TRIF). O funcionamento dessas vias requer a ativação dos receptores IL-1 associadas à cinase (do inglês *IL-1 -receptor-associated kinase*, IRAK) e, no caso de MyD88, o IRAK1 e 4 (CHEN; SZODORAY; ZEHER, 2015). No processo as vias Fator Nuclear kappa B (NF-kB) e *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) são ativadas (O'NEILL; BRYANT; DOYLE, 2009). Alguns membros de *Toll-like* estão sob o controle das vias JAK e STAT, as mesmas bloqueiam ativação-LPS de IRAK1 e 4 (CHEN; SZODORAY; ZEHER, 2015).

Outra via utilizada pelo sistema imunológico inato é a *NOD-like*, que reconhece DAMPs e moléculas de origem microbiana (CHEN et al., 2009). Sua ação culmina na ativação de vias pró-inflamatórias. A família de tais receptores possui domínio NOD conservado composto por repetições de leucinas (*leucine-rich*, também ancorado em *Toll*) na região C-terminal, sendo estes responsáveis pelo reconhecimento de PAMPs/DAMPs (MOTTA et al., 2015). Por outro lado, a porção N-terminal é responsável por interações proteína-proteína. As proteínas estão localizadas no citoplasma e pelo menos 20 genes são responsáveis por sua codificação (WERTS et al., 2006).

Figura 4. Modelo de moléculas reconhecidas pela família de TRLs humanos. Destaca-se o tipo de biomolécula reconhecido pelo receptor.



Fonte: Adaptado de GILLIET; CAO; LIU, 2008.

O reconhecimento do PAMP/DAMP inicia a ativação da via do NF- $\kappa$ B, MAPK e Caspase-1 (CHEN et al., 2009). As duas primeiras também são ativadas no desencadeamento de *Toll-like*. Essas semelhanças, bem como outras, atestam atividade complementar entre as duas vias citadas. Em geral IL-6, TNF-alfa e IL-1 beta apresentam sua produção aumentada resultante da ativação de receptores *NOD-like* (CHEN et al., 2009). Na literatura, 6 receptores para NOD estão descritos, são eles: Nod1, Nod2, Nlrc4, Naip, Nlrp1b e Nlrp3. Cada um está envolvido com o

reconhecimento específico de determinado PAMP/DAMP. Além destes, a família NRL contém 22 proteínas citoplasmáticas que incluem NOD e NALP (MCCORMACK et al., 2009).

Nod1 e 2 são os mais conhecidos e, por conseguinte, possuem descrições detalhadas sobre o processo de reconhecimento e posterior desencadeamento da sinalização (MCCORMACK et al., 2009). Ambos estão envolvidos com o reconhecimento de PAMPs de origem bacteriana. Além destas, as NRLs têm importância no controle do balanço da resposta das células B e T (CARNEIRO et al., 2008). Ainda, do ponto de vista sinérgico também desempenham papel importante em modulação por *Toll-like*, culminando na geração adequada da resposta inata e posterior adaptativa (FUKATA et al., 2009; MCCORMACK et al., 2009).

Nesse contexto, fica clara a importância de receptores *NOD-like* para geração de resposta adequada a infecções. Em contraste, um desequilíbrio relacionado a essa via pode culminar na geração de doenças autoimunes. Vitiligo e Sarcoidose são exemplos de autoimunes relacionadas a *NOD-like* (TU; GU; LIN, 2003; TANABE et al., 2006). Também, polimorfismos nesses receptores foram relacionados a uma maior pré-disposição para o surgimento de outras autoimunes, tais como AR e LES. Já foi demonstrado que mutações no gene *NOD2* podem estar relacionadas à geração de respostas descompensadas do sistema inato e adaptativo no trato intestinal (KOBAYASHI et al., 2002).

Outro grupo de reconhecimento de padrão relacionados a agentes infecciosos é composto por lectinas do tipo C (VAN VLIET et al., 2008). Estas, podem estar localizadas na membrana ou dissolvidas no citoplasma. Seu mecanismo de ação se dá principalmente por meio de ligação a carboidratos específicos dos micróbios (DAMBUZA; BROWN, 2015). Já foram descritos pelo menos 60 tipos de CLRs em humanos e com base na sua especificidade podem ser divididas em dois grandes grupos: ligantes de manose e a sialoglicoproteína. Ainda, podem também ser subclassificadas dependendo tipo celular (VAN VLIET et al., 2008). Lectinas do tipo C reconhecem padrões advindo de certas bactérias, fungos, vírus e helmintos (HOVING; WILSON; BROWN, 2014). Vale salientar que duas outras classes de lectinas têm importância imunológica, são elas Galectinas e *Siglecs* (RABINOVICH; CROCI, 2012).

Assim como visto para as duas vias de PAMPs discutidas até aqui, após o reconhecimento do padrão é desencadeado um processo de biosinalização que

culmina na ativação de vias inflamatórias. No tocante a CLR's são dois os resultados possíveis: sinergismo/modulação de *Toll-like* ou ativação da expressão *per se* de genes-alvo (GEIJTENBEEK; GRINGHUIS, 2009). Ainda, vale salientar que a modulação de *Toll-like* depende de uma pré-ativação da mesma (GEIJTENBEEK; GRINGHUIS, 2009). CLR's também medeiam o reconhecimento e internalização de antígenos via MHC (VLIET et al., 2008). De modo geral o desencadeamento a partir de tais proteínas culmina na ativação/modulação de NF-κB, sendo esse fator um dos pontos de modulação de *Toll* (GEIJTENBEEK; GRINGHUIS, 2009). A ativação independente de outros PRRs geralmente vai estar relacionada ao reconhecimento de fungos, resultando na ativação de NF-κB intermediado por *Spleen tyrosine kinase* - *Syk* (OSORIO; SOUSA, 2011).

Os últimos receptores relacionados ao reconhecimento de PAMPs citados aqui são os RLRs. Segundo Loo e Gale (2011), eles são uma família de helicases que funcionam como sensores citoplasmáticos de RNAs oriundos de vírus. Já foram descritos três membros: *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I), *melanoma differentiation associated factor 5* (MDA5) e *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2), sendo o primeiro o melhor caracterizado. São expressos em variados tipos celulares, sendo proeminentes em células do sistema nervoso central, epiteliais e mielóides (NAKHAEI et al., 2009; TAKEUCHI et al., 2015).

Tais proteínas possuem domínios conservados que definem a família, como: região N-terminal, parte mais central responsável pela atividade helicase/reconhecimento do PAMPs e região C-terminal. Os domínios N- e C-terminal representam região de recrutamento de caspases e autoregulação, respectivamente (YONEYAMA et al., 2004; SAITO et al., 2007; LOO; GALE, 2011). Há vários trabalhos descrevendo RLRs no reconhecimento de PAMPs relacionados a vírus, tais como Influenza A e B, Ebola e vírus da Dengue (LOO et al., 2008; HABJAN et al., 2008; KATO et al., 2006).

Assim como visto para outras vias para o reconhecimento de PAMPs, RLRs possuem cruzamento com *Toll-like* (LOO; GALE, 2011). Desta forma também representa um importante ponto de modulação da resposta imune inata e geração da resposta adaptativa. Os principais fatores de transcrição ativados pelo desencadeamento a partir de RLRs são: IRF3, IRF7 e NF-κB (LOO; GALE, 2011; PAZ et al., 2006). As vias que figuram como ativas principalmente são JAK-STAT e ISGF3-

dependente de estimulação por interferon (ISGs), culminando na produção de IFN-I (LOO; GALE, 2011).

Em um trabalho de revisão, Hall e Rosen (2010) relataram que desequilíbrios nessa via podem estar envolvidos com o surgimento de autoimunes. Fatores genéticos, tais como polimorfismos, já foram descritos para algumas autoimunes e RLRs, sendo a diabetes do tipo I um exemplo (ZOUK et al., 2014). SNPs já foram encontrados em *IFIH1* como possíveis fatores de risco ligados a pré-disposição a LES (VARZARI et al., 2014). Em recente trabalho de revisão, Kato e Fujita (2015) descrevem as principais autoimunes correlacionadas a RLRs, ditas como apresentando assinaturas IFN. As citadas pelos autores são: síndrome de Aicardi-Goutieres (AGS), síndrome de Singleton-Merten (SMS) e LES.

As descrições até aqui deixam claro a correlação entre vias de reconhecimento de PAMPs e o desencadeamento de autoimunes. Entretanto, a busca pelas chamadas assinaturas ligadas a uma infecção específica é tarefa árdua nem sempre possível, isso tendo em vista a sobreposição e o sinergismo das vias desencadeadas pelos receptores discutidos. Porém, certa confluência é notada para modulação de *Toll-like* e ligação com ativação de MHC em certos casos. Ainda assim, expressões aberrantes de tais receptores ou polimorfismos nos genes que os codificam estão fortemente ligadas a origem de autoimunes, resultando na desarmonia refletida na resposta imune adaptada. Iwasaki e Medzhitov (2010; 2015) discorrem sobre todas vias citadas aqui tendo como foco a regulação da resposta adaptada por essas vias inatas, além de chamarem atenção para alguns pontos ainda pouco entendidos. Nesse contexto, estudos de expressão gênica podem ajudar na identificação das principais vias envolvidas no desencadeamento e manutenção de doenças autoimunes, e em última instância elencar biomarcadores ou *hubs* que podem servir para fins terapêuticos.

## **2.4 Tratamentos para doenças autoimunes e riscos associados**

Em meio às discussões presentes na literatura em busca de um melhor entendimento do surgimento das doenças autoimunes, formas de se tratar essas enfermidades são absolutamente necessárias. Já existe disponibilidade de alguns fármacos que de modo geral tentam modular a resposta imunológica por meio do

bloqueio de efetores, ou mesmos por métodos que diminuem a concentração desses efetores no sangue circulante. Um exemplo foi o desenvolvimento durante a década de 90 com o tratamento baseado em bloqueadores de TNF, e sua escolha apresentava-se como óbvia por ser um importante efector pró-inflamatório (VASSALLI, 1992; MORELAND et al., 1997). Inicialmente foi desenvolvido para o tratamento de pacientes acometidos por AR, contudo a *Food and Drug Administration* (FDA) começou a relatar o surgimento de complicações ligadas ao sistema nervoso devido a utilização desse tratamento.

Em 2001, Mohan e colaboradores descreveram alguns casos de desmielinização em decorrência de tratamento por anti-TNF alfa, pois trabalhos posteriores relataram o surgimento de autoimunes. Perez-Alvarez e colaboradores (2013) revisaram os casos de autoimunes desencadeadas por terapias baseadas em bloqueadores de TNF, entre as quais estavam SGB, EM e LES. Em contrapartida, começaram o desenvolvimento de terapias baseadas em Interleucinas, sendo um dos principais alvos a IL-6 (TANAKA et al., 2014; LUBBERTS, 2015). O bloqueio desse alvo apresenta-se como uma alternativa para o tratamento de doenças autoimunes, principalmente por desequilíbrios de sua atividade estarem associados ao surgimento e progressão dessas patologias (TANAKA et al., 2014; YAO et al., 2014). Resultados satisfatórios já foram demonstrados no tratamento de AR (GABAY et al., 2013; SMOLEN et al., 2013).

Além das terapias baseadas em bloqueadores, existem tratamentos que utilizam como base as células imunes da memória. De modo geral utilizam como alvo receptores presentes em células B ou T, tendo como objetivo a modulação da resposta imune (BHARGAVA; CALABRESI, 2014). Existem algumas promessas nesse campo, como os já comprovados imunomodulares: toxina de anêmona e a *glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein* (GITR) (CHI et al., 2015; PETRILLO et al., 2015). GITR tem mostrado resultados positivos em testes com pacientes acometidos por LES e síndrome Sjögren.

Por fim, a comunidade científica tem discutido efeitos da vitamina D em doenças autoimunes e sua utilização suplementar, pois parece reduzir os riscos ou amenizar efeitos no curso das mesmas (ANTICO et al., 2012). Além disso, sabe-se que sua deficiência está ligada ao surgimento de autoimunes (HANDEL et al., 2013). Contudo, ainda não são entendidos seu modo de ação (CUTOLO et al., 2014). Antico

e colaboradores (2012) citam que são necessários mais estudos para obtenção dessas informações. Diante este cenário, fica claro que ainda não há tratamentos definitivos para esses tipos de enfermidades, além de não apresentarem especificidade à respectiva doença autoimune. Além disso, existe risco em sua utilização, no tocante ao surgimento de complicações ou mesmo em desencadear início outra doença autoimune. Assim fica claro a importância de estudos que busquem entender a base do desencadeamento de autoimunes, fornecendo dados que podem servir como alicerce para desenho de terapias mais efetivas.

## **2.5 A Bioinformática no entendimento de doenças autoimunes**

A bioinformática surge nesse cenário fornecendo ferramentas que podem auxiliar no entendimento dos fatores de riscos, genéticos e de vias relacionadas ao desencadeamento e manutenção das doenças autoimunes. Os algoritmos têm-se tornado mais robustos e permitem o trabalho com dados em larga escala, entre os quais incluem principalmente os de origem “ômica”. Adicionalmente, a formação de consórcios permitiu a criação de bancos de dados curados para anotação, tais como o *Gene Ontology*, acompanhado pelo crescimento de outros mais gerais já existentes (ex: NCBI, KEGG e UniProt). Tal desenvolvimento foi também seguido por um aumento de linguagens computacionais que facilitam um melhor tratamento estatístico dos dados, como por exemplo o R, que é disponibilizado de forma gratuita e com várias sub-aplicações desenvolvidas pela comunidade científica (<https://www.r-project.org/>).

Nesse contexto, as atuais tecnologias de sequenciamento têm permitido a obtenção de genomas inteiros em pouco tempo, bem como a de exomas e transcriptomas em diferentes organismos. Assim, muitos trabalhos vêm usando essas plataformas para a obtenção de dados moleculares inéditos para diferentes espécies ou aferição de atividade das vias celulares. Ainda, a disponibilização destes dados nos bancos públicos vem permitindo a realização de intensas rodadas de mineração de dados. Há vários trabalhos descritos que se utilizaram de RNA-Seq, microarranjos e ChiP-Seq para obtenção de informações pertinentes sobre doenças autoimunes (FARH et al., 2015; MA et al., 2015). A mineração é também essencial para encontrar correlações entre diferentes tipos de dados.

Diante do exposto fica claro a importância da bioinformática na busca de pistas que indiquem as vias-chave que desencadeiam a autoimunidade. Tais análises podem indicar os principais genes e suas variantes de *splicing*, que provocam impactos em suas expressões, indicações de pré-miRNAs e montagem de redes de interação entre genes e entre diferentes proteínas. Logo, além de entender as bases bioquímicas e moleculares envolvidas nas doenças autoimunes, é de fundamental importância a identificação de vias que possam ser moduladas por fármacos já conhecidos ou até mesmo já disponíveis comercialmente, principalmente no caso da SGB, objeto da presente proposta. Isso forneceria dados que podem servir como base para o desenvolvimento de medicamentos específicos e mais eficientes.

A biologia de sistemas representa uma abordagem para integração de dados biológicos de diferentes naturezas químicas (YUGI et al., 2016). O atrelamento de modelos matemáticos a informações biológicas no planejamento de algoritmos tem demonstrado bons resultados, necessitando de adequações, tendo em vista a complexidades dos organismos vivos (SAHA; CHOWDHURY; MARANAS, 2014). Esse representa um dos principais desafios ao se estudar biologia de sistemas na integração de dados biológicos. A utilização dessa abordagem pode ajudar a revelar genes e vias relevantes a SGB.

### 3. JUSTIFICATIVA

SGB é uma síndrome de ocorrência rara e apresenta flutuações na incidência de casos relacionadas a surtos de infecções por agentes virais e bacterianos, bem como campanhas em larga escala de vacinação. Mesmo tendo sido descrita há quase 100 anos, os fatores de riscos genéticos e moleculares ligados ao seu desencadeamento ainda são obscuros. Como descrito anteriormente, plasmaférese e a utilização de imunoglobulinas são as únicas terapias disponíveis. Embora já se tenha modelos que explicam os mecanismos que levam aos danos aos nervos periféricos para o subtipo desmielinizante, poucos são os detalhes conhecidos sobre os eventos que levam a persistência da resposta aguda.

Já estão disponíveis em bancos de dados biológicos transcriptomas provenientes de casos de SGB: um estudo chinês e outro espanhol. Recentemente, o Instituto de Medicina Tropical do Rio Grande do Norte (IMT-RN) realizou estudo com transcriptomas de 12 casos com SGB, 3 subtipos, durante a fase aguda e de recuperação da doença. Portanto, uma análise integrativa desses dados, com os que estão depositados nos bancos, pode servir como base para o esclarecimento das principais vias envolvidas para o desenvolvimento de SGB, ou ainda para criação de pontos de partida para o desenho de experimentos confirmatórios específicos que demonstrem esses mecanismos.

Portanto, o uso de abordagem em bioinformática para análise dos transcriptomas já disponíveis pode servir como base para criação de terapias mais eficientes ou complementares as já existentes, assim diminuindo possíveis sequelas atreladas a SGB. Adicionalmente, estudos desse tipo podem fornecer indícios das principais variantes de *splicing* e acompanhamento do desenvolvimento das principais redes de interação gênicas envolvidas na manutenção de SGB.

## **4 OBJETIVO**

### **4.1 Objetivo Geral**

Analisar bibliotecas transcriptômicas oriundas de pacientes acometidos por SGB, visando encontrar os principais genes e vias correlatas importantes na doença. Pretende-se também montar panorama das respostas com os principais fatores relacionados a progressão dessa autoimune do ponto de vista do sistema imune adaptativo.

### **4.2 Objetivos específicos**

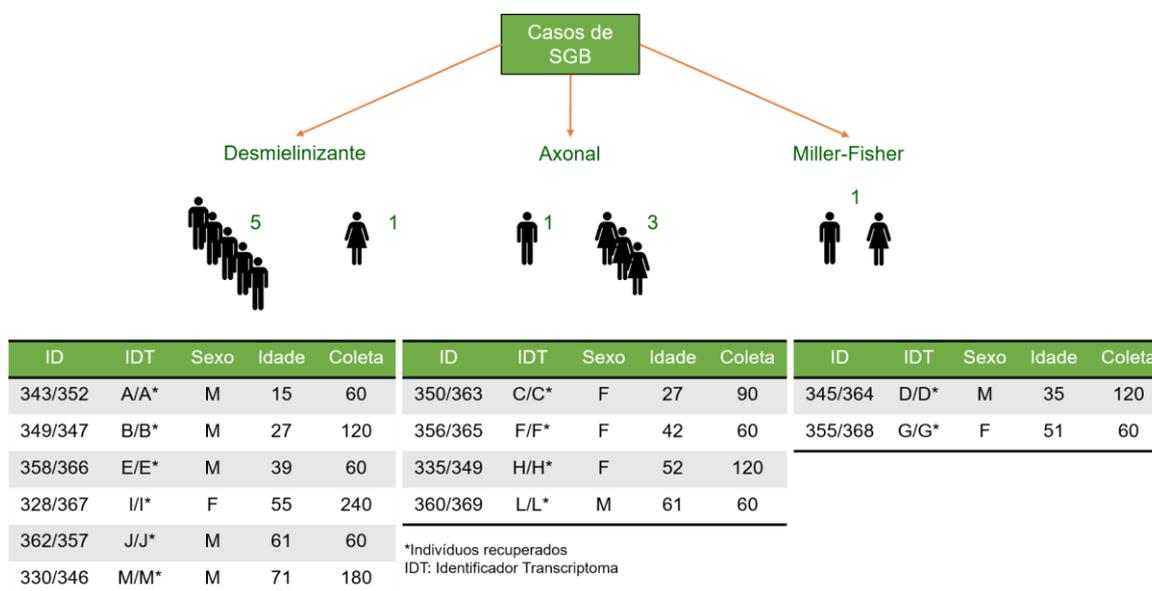
- Mineração de dados transcriptômicos sobre SGB.
- Analisar a expressão diferencial de transcriptomas de pacientes brasileiros com SGB.
- Avaliar genes e vias proeminentes nas bibliotecas transcriptômicas de pacientes acometidos por SGB no Brasil e Espanha.
- Indicar os possíveis alvos biotecnológicos que possam servir como alvos-terapêuticos e biomarcadores para SGB.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Características dos casos estudados

A figura 5 apresenta o sumário das características dos casos brasileiros estudados, diferenças entre dias de coleta, idade e identificadores das amostras transcriptômicas. Dados adicionais sobre as amostras, como dados de eletromiografia e fases de coleta, podem ser obtidos na tese de doutorado de DOURADO JUNIOR (2015).

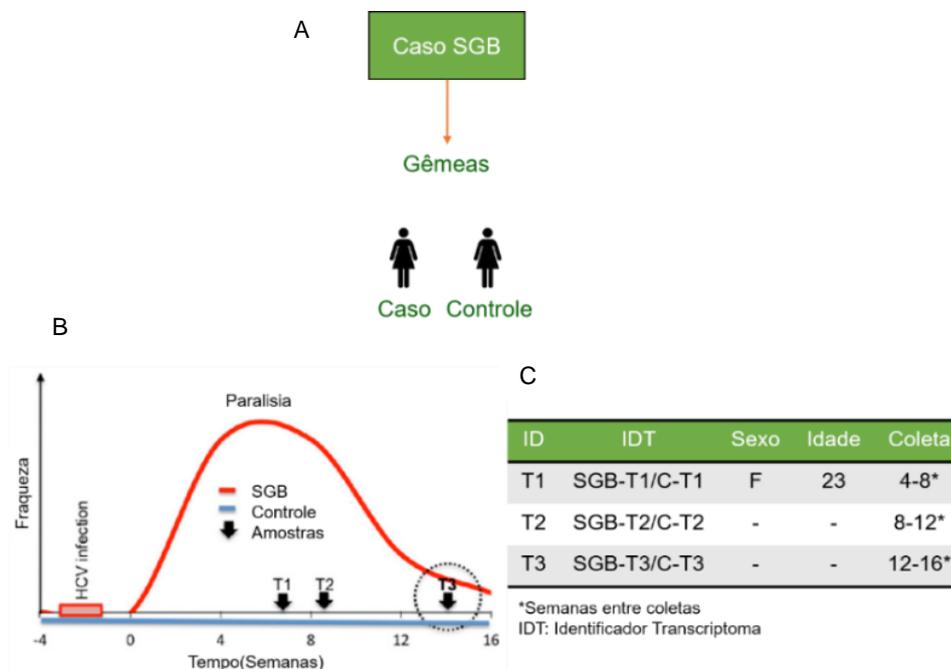
Figura 5. Características dos casos brasileiros: Identificadores, Sexo, Idade e Coleta. Informação obtidas na tese de doutorado de DOURADO JUNIOR (2015).



Fonte: Elaborado pelo autor com dados de DOURADO JUNIOR (2015).

A figura 6 apresenta o sumário das características do caso espanhol estudado, tempos de coleta, idade e identificadores das amostras transcriptômicas. A análise e os resultados encontrados para esses dados foram descritos originalmente por DONCEL-PÉREZ e colaboradores (2016). O estudo realizado pelo grupo chinês (CHANG et al., 2012) foi considerado, contudo após criteriosa reanálise dos dados realizada com o pacote *limma* do R (RITCHIE et al., 2015), não foi encontrada expressão diferencial significativa entre os casos, assim sendo desconsiderados no presente estudo.

Figura 6. Características do caso espanhol: Identificadores, Sexo, Idade e Tempo de coleta. Informações obtidas e modificadas do artigo publicado por DONCEL-PÉREZ e colaboradores (2016).



Fonte: Elaborado pelo autor com dados de DONCEL-PÉREZ et al., 2016.

## 5.2 Workflow de análise

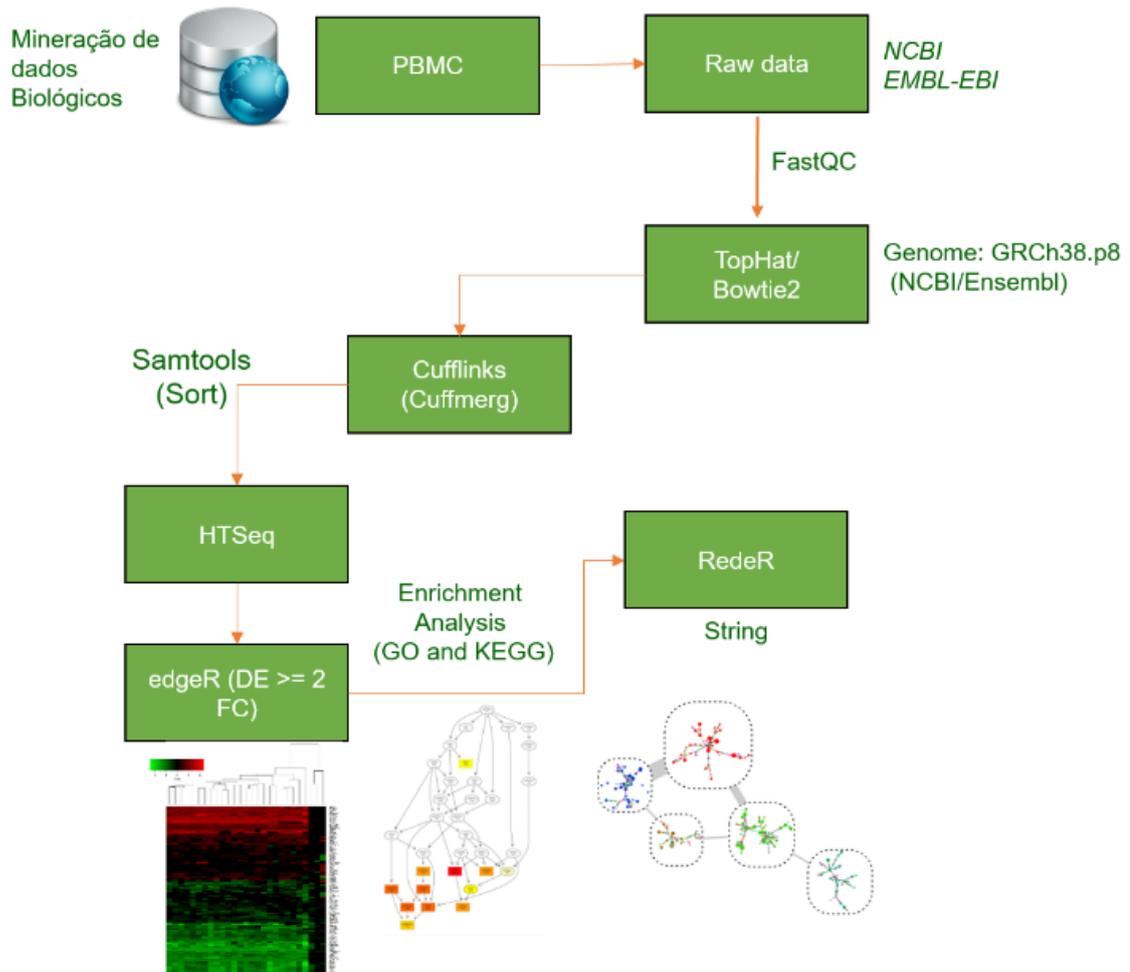
Resumo dos passos seguidos para aquisição de dados e abordagem bioinformática utilizada (FIGURA 7).

## 5.3 Bibliotecas

As bibliotecas utilizadas no presente estudo foram compostas por um grupo 1 de pacientes brasileiros e outro (grupo 2) por paciente espanhol. O sequenciamento de ambas bibliotecas foi realizado pela mesma plataforma Illumina HiSeq, com leituras de tamanho 100 bp. O grupo um é composto 12 pacientes humanos (6 na forma desmielinizante, 4 na forma axonal e 2 na forma Miller-Fisher) do Rio Grande de Norte - Brasil, ao diagnóstico da Síndrome Guillain Barré e pós recuperação, o estudo foi realizado pelo Instituto de Medicina Tropical do Rio Grande do Norte (IMT-RN) (DOURADO JUNIOR, 2015). O grupo 2 trata-se de caso de SGB com dados disponibilizados no NCBI/*Gene Expression Omnibus* sob nº GSE72748, foram

realizadas 3 coletas durante a progressão de doença para tentar identificar vias relacionadas a progressão e recuperação, em cada ponto de coleta simultaneamente foi coletado material da gêmea saudável (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE72748>).

Figura 7. Workflow da metodologia utilizada.



Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 5.4 Estratégia de Montagem e Análise da expressão global e diferencial

O processamento, a montagem e análise dos dados de transcriptoma foram realizados em um servidor computacional Linux/UNIX contendo capacidade total de 72 núcleos de processamento, 128 Gb de memória RAM, alocado no Instituto de Medicina Tropical do Rio Grande do Norte (IMT-RN), além de supercomputador disponibilizado pelo NPAD/IMD. Os dados brutos no formato fastq (contendo

informações de sequência e qualidade) foram avaliados com base em valores de *Phred* pelo programa *FastQC*, somente as leituras com bases de qualidade *Phred*  $\geq 30$  serão mantidas na análise (EWING; GREEN, 1998; KROLL et al., 2014).

O genoma de referência *Homo sapiens* (GCF\_000001405.26) foi retirado do Genbank, National Center for Biotechnology Information (NCBI) e indexado e alinhado usando o programa *Bowtie 1.1.1* (LANGMEAD et al., 2009). O mapeamento foi realizado com a ferramenta *TopHat 2.0.13* (TRAPNELL; PACHTER; SALZBERG, 2009). O pacote de programas *Cufflinks 2.2.1* será utilizado para a montagem do transcriptoma e comparações entre amostras (TRAPNELL, 2012). Os arquivos de saída da ferramenta *Cufflinks* de todos os pacientes em estudo foram fusionados pela ferramenta *Cuffmerge* para montagem de uma anotação única que serviu como base para obtenção das contagens individuais.

As abundâncias foram estimadas pelo programa em Python *HTSeq* (ANDERS; PYL; HUBER, 2014). A filtragem dos dados e diferenças de expressão foi obtida utilizando-se o pacote *edgeR* do ambiente R (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010). Foram consideradas as abundâncias observadas em pelo menos 70% em todas as bibliotecas e com contagens por milhão (CPM)  $\geq 0,5$  em pelo menos  $\frac{3}{4}$  das repetições nos casos brasileiros e de 1 para o caso espanhol. O modelo para obtenção da expressão diferencial de genes levou em consideração a observação da dispersão biológica e individual dos genes, dos pesos e o modelo *glmRT*. Foram considerados para as análises posteriores os genes com valor de *false discovery rate* (FDR)  $\leq 0,05$  e *fold change* de +/- 2 vezes de mudança de expressão. Os gráficos foram obtidos por meio da utilização do ambiente de linguagem estatística computacional R (<http://www.r-project.org>).

### **5.5 Análise de enriquecimento dos termos de GO, KEGG pathway e construção de redes de interação**

A análise de enriquecimento dos termos de GO e *KEGG pathway* foi realizada utilizando-se as funções *goana* e *kegga*, ambas disponíveis no pacote *edgeR*, sendo considerados para as análises posteriores apenas os termos ou vias com *p* ajustado  $\leq 0.05$ . A abordagem de redes de interação (*Interatoma*) foi utilizada para analisar eventos de coexpressão e interação com base em proteínas e possíveis moduladores

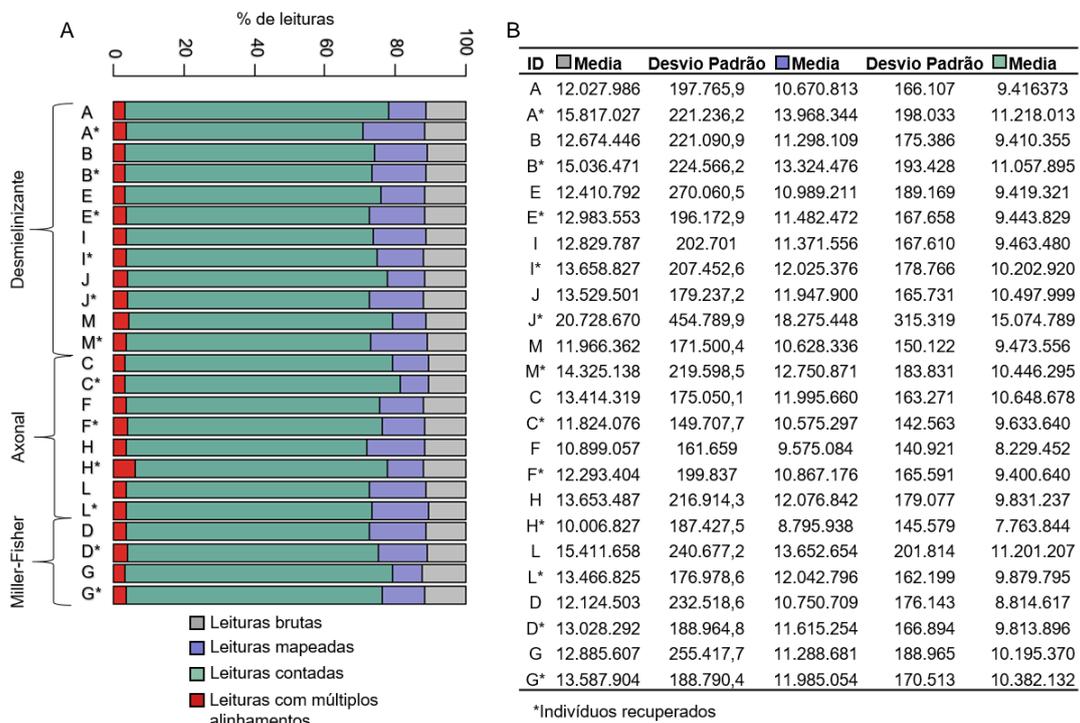
farmacológicos da rede. Os bancos de dados serão obtidos na base de dados do site STRING versão 10 ([www.string-db.org](http://www.string-db.org)) utilizando-se o pacote STRINGdb do R (SZKLARCZYK et al., 2015). As redes regulatórias foram reconstruídas utilizando o pacote RedeR do R (CASTRO et al., 2012).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Definição dos perfis transcricionais de células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) em 10 casos brasileiros com SGB, tendo como referência o estado de recuperação em todos os casos e por subtipo

Os resultados do alinhamento ao genoma de referência de *Homo sapiens*, revelaram uma média de 88% em leituras mapeadas, considerando o número de repetições e as fases para cada caso (FIGURA 8A). Destas, uma média de aproximadamente 77% permaneceu após contagem, para múltiplos alinhamentos foi de aproximadamente 4%. A figura 8B, apresenta as quantidades numéricas de leituras consideradas em cada etapa da análise, desde dados brutos até os resultados de contagens.

Figura 8. Quantidade das leituras brutas, alinhadas, contadas e com múltiplos alinhamentos. A. Demonstração em porcentagem e B. quantidades numéricas totais. Os quadrados indicam: cinza - leituras brutas, azul - leituras mapeadas, verde – leituras contadas e vermelho - leituras com múltiplos alinhamentos. Foram considerados para análise apenas as leituras com valores de Phred  $\geq 30$ .



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a análise da expressão relativa levou-se em consideração os resultados de estática descritiva para as abundâncias dos transcritos (FIGURA 9). A variação de dados vista em *Boxplot* releva diferença entre os quartis de forma mais evidente nos casos C e H, ambos Axonais, G - Miller-Fisher e M - Desmielizante (Figura 9A). Esses resultados sugerem impactos posteriores ao se analisar as diferenças de expressão entre as fases sintomáticas e recuperadas, também podendo representar reflexos da diferença entre os períodos de coleta e possíveis comorbidades associadas, detalhes podem ser consultado no Anexo 1. A média da Frequência da distribuição de transcritos em logaritmo do CPM por subforma de SGB é mostrada pela figura 9B, onde é possível observar diferenças de abundâncias entre as fases em estudo.

O escalonamento multidimensional baseado no logaritmo do *fold change* demonstra uma não separação entre as subformas consideradas no presente estudo, contudo é possível observar afastamento entre as fases sintomáticas e de recuperação para o mesmo paciente (FIGURA 9C). Pode-se considerar influência das diferenças individuais (idade) e de coletas nessa distribuição, impactando nas fontes de variações que acabam por não permitir uma maior separação.

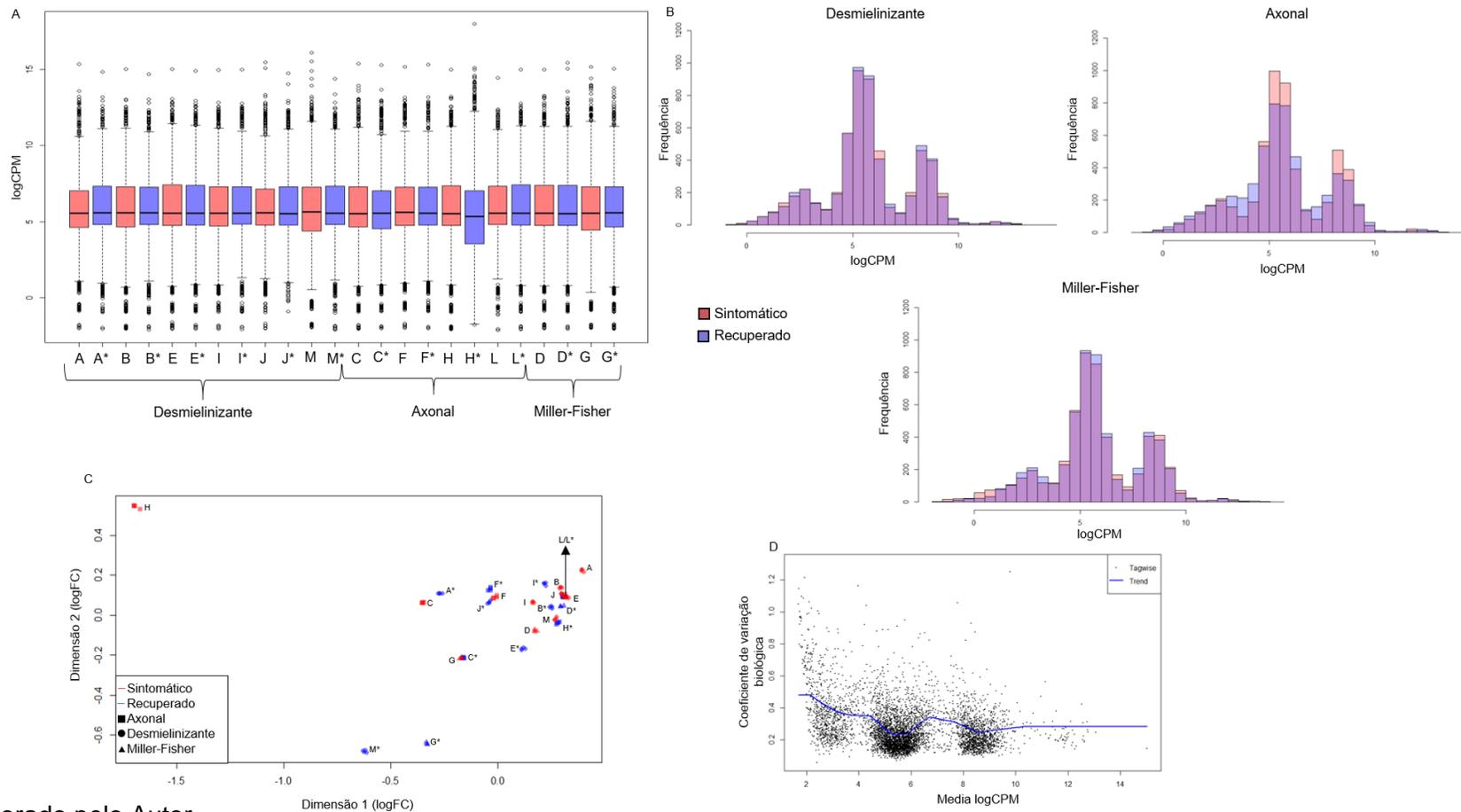
Ainda, chama-se atenção pelo distanciamento entre a amostra H sintomática das demais, esse resultado tem impactos diretos na estimativa da expressão relativa de genes. Tendo em vista essa observação, bem como na variação vista no *Boxplot*, as amostras H e M passaram por segunda filtragem, levando em conta as contagens brutas e as observações de frequência para cada fase nesses casos. A figura 9D mostra a variação biológica tendo como base as abundâncias dos transcritos. Tendo em vista esses resultados, para a análise em grupo foram desconsiderados os casos M - Desmielizante e H - Axonal.

A figura 10 e a tabela 1 apresentam os genes com variações em suas expressões relativas entre os estados sintomático e recuperação, levando em consideração apenas valores com duas vezes de variação. Levando-se em consideração o grupo geral, foi possível verificar que *Complement C1q B Chain (C1QB)*, *Heparin Binding EGF Like Growth Factor (HBEGF)*, *Immunoglobulin Lambda Variable (IGLV) 1-40* e *Immunoglobulin Heavy Constant Gamma (IGHG3)* tiveram suas expressões aumentadas, enquanto *Ciliary Rootlet Coiled-Coil, Rootletin Family Member 2 (CROCC2)*, *Hemoglobin Subunit Beta (HBB)* e *Hemoglobin Subunit Alpha 2 (HBA2)* tiveram diminuídas. Quando considerados os genes diferencialmente

expressos isoladamente para os casos do subtipo Axonal (Sintomático x Recuperado), surgem de modo específico: *Stabilin 1 (STAB1)*, *Septin 4 (SEPT4)*, *Junction Plakoglobin (JUP)*, *Cytochrome C Oxidase Assembly Protein (SCO2)*, *EPH Receptor B2 (EPHB2)*, *IGLV7-43*, *Immunoglobulin Kappa Variable (IGKV)2-30* e *Sialic Acid Binding Ig Like Lectin 1 (SIGLEC1)* com expressões positivas e *NCR1*, *CXCR1* e *CXCR2* com negativas.

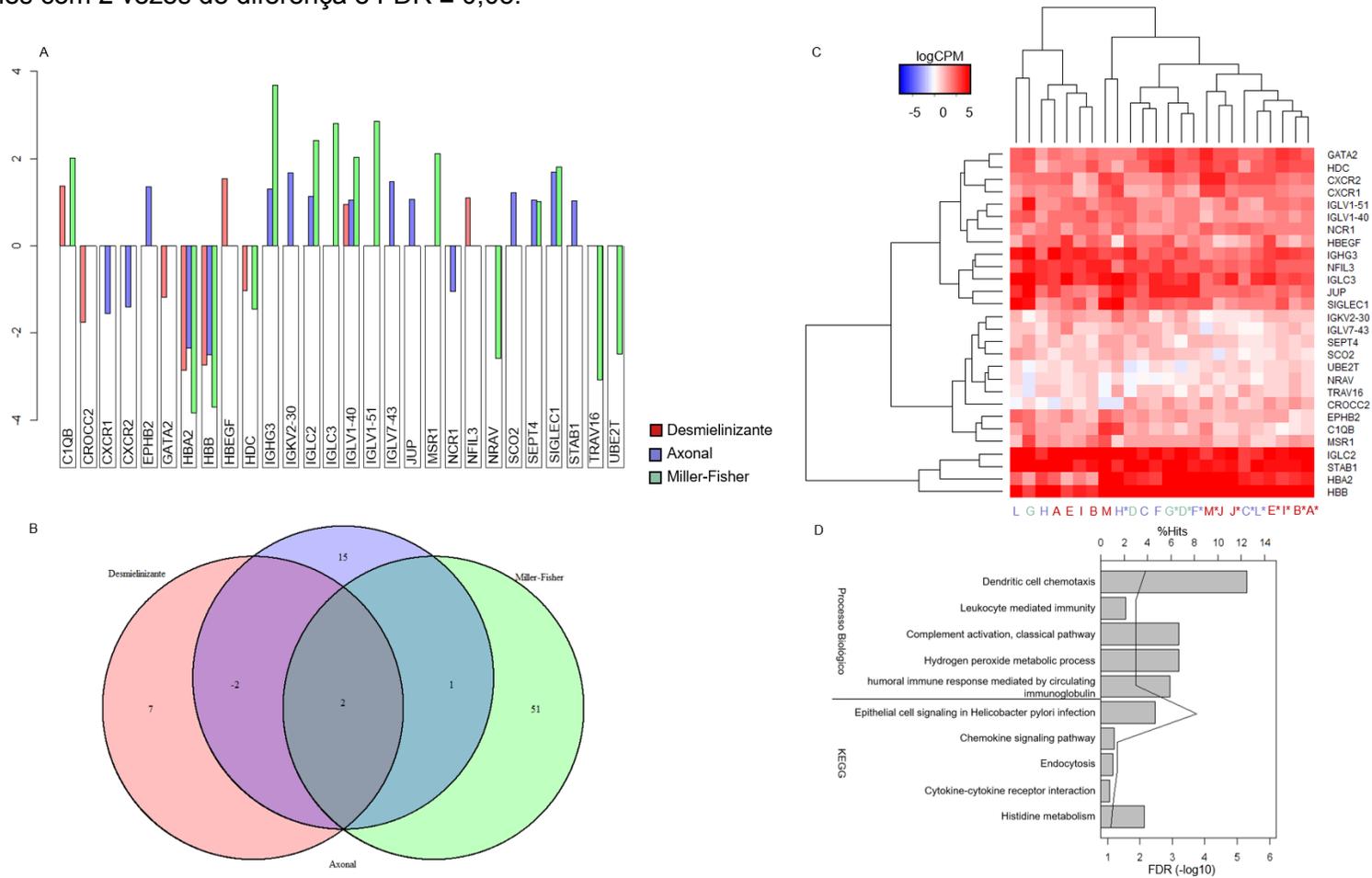
Para os casos Desmielinizantes foram os genes *Nuclear Factor Interleukin 3 Regulated (NFIL3)* e *GATA Binding Protein 2 (GATA2)* com expressão positiva e negativa, respectivamente. O subtipo Miller-Fisher demonstrou 68 genes diferencialmente expressos (MATERIAL SUPLEMENTAR X), vale ressaltar que para esse grupo o *n* é de 2. Os genes com maiores variações para esse grupo foram: positivas - *IGLV1-51*, *Macrophage Scavenger Receptor 1 (MSR1)*, *IGLC2* e *3*; negativas - *T-Cell Receptor Alpha Variable 16 (TRAV16)*, *Negative Regulator of Antiviral Response (NRAV)*, *Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 T (UBE2T)* e *Histidine Decarboxylase (HDC)*. Considerando os grupos e os genes que demonstraram variações iguais ou acima de 2 vezes, foi possível a verificação de sobreposição entre os subtipos. Os subtipos Axonais e Miller-Fisher tiveram sobreposição para *Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme Catalytic (APOBEC3A)* e *IGLC2*, ambos com expressão positiva, enquanto Desmielinizante e Miller-Fisher somente *C-C Motif Chemokine Receptor (CCR3)* com expressão negativa.

Figura 9. Estatística descritiva dos resultados dos transcriptomas considerados na análise. A. *Boxplot* das contagens após normalização considerando a médias da repetição em cada caso, na fase sintomática e de recuperação, e B. Distribuição de frequência das contagens após normalização considerando as medias por subclassificação de SGB, as cores vermelha e azul indicam fase sintomática e recuperada, respectivamente. C. Escalonamento multidimensional das amostras considerando a expressão genes, as subclassificações de SGB são indicadas: quadrado - Axonal, círculo - Desmielinizante e triângulo - Miller-Fisher, com as cores vermelha e azul indicando fase sintomática e de recuperação, respectivamente. D. Coeficiente de variação biológica considerando as 96 observações transcriptomicas em estudo.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Figura 10. Genes diferencialmente expressos entre os estados sintomáticos e de recuperação, considerando os subtipos estudados (Desmielinizante, Axonal e Miller-Fisher). A. Gráfico de barras com os valores de expressão relativa. B. Diagrama de Venn demonstrando a sobreposição de genes entre os subtipos de SGB estudados. C. Heatmap com a expressão absoluta dos genes considerados, representada em logCPM. As cores vermelha, azul e verde indicam o subtipo Desmielinizante, Axonal e Miller-Fisher, respectivamente. Foram considerados apenas os genes com 2 vezes de diferença e  $FDR \leq 0,05$ .

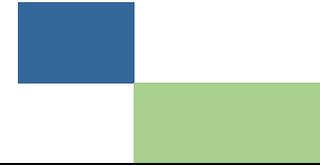


Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 1. Genes diferencialmente expressos entre os estados sintomáticos e de recuperação, considerando os subtipos estudados (Desmielinizante, Axonal e Miller-Fisher). Foram considerados apenas os genes com 2 vezes de diferença e FDR  $\leq 0,05$ .

ID	Nome do gene	Subtipo		
		Desmielinizante	Axonal	Miller-Fisher
<i>C1QB</i>	Complement C1q B Chain	■	■	■
<i>CROCC2</i>	Ciliary Rootlet Coiled-Coil, Rootletin Family Member 2	■	■	■
<i>CXCR1</i>	C-X-C Motif Chemokine Receptor 1		■	
<i>CXCR2</i>	C-X-C Motif Chemokine Receptor 2		■	
<i>EPHB2</i>	EPH Receptor B2		■	
<i>GATA2</i>	GATA Binding Protein 2	■		
<i>HBA2</i>	Hemoglobin Subunit Alpha 2	■	■	■
<i>HBB</i>	Hemoglobin Subunit Beta	■		■
<i>HBEGF</i>	Heparin Binding EGF Like Growth Factor	■		■
<i>HDC</i>	Histidine Decarboxylase			■
<i>IGHG3</i>	Immunoglobulin Heavy Constant Gamma 3	■	■	■
<i>IGKV2-30</i>	Immunoglobulin Kappa Variable 2-30		■	
<i>IGLC2</i>	Immunoglobulin Lambda Constant 2			■
<i>IGLC3</i>	Immunoglobulin Lambda Constant 3			■
<i>IGLV1-40</i>	Immunoglobulin Lambda Variable 1-40	■	■	■
<i>IGLV1-51</i>	Immunoglobulin Lambda Variable 1-51			■
<i>IGLV7-43</i>	Immunoglobulin Lambda Variable 7-43		■	
<i>JUP</i>	Junction Plakoglobin		■	
<i>MSR1</i>	Macrophage Scavenger Receptor 1			■
<i>NCR1</i>	Natural Cytotoxicity Triggering Receptor 1		■	
<i>NFIL3</i>	Nuclear Factor, Interleukin 3 Regulated	■		
<i>NRAV</i>	Negative Regulator of Antiviral Response (Non-Protein Coding)			■
<i>SCO2</i>	SCO2, Cytochrome C Oxidase Assembly Protein		■	
<i>SEPT4</i>	Septin 4		■	

*SIGLEC1* Sialic Acid Biding Ig Like Lectin 1  
*STAB1* Stabilin 1  
*TRAV16* T-Cell Receptor Alpha Variable 16  
*UBE2T* Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 T



Fonte: Elaborado pelo autor.

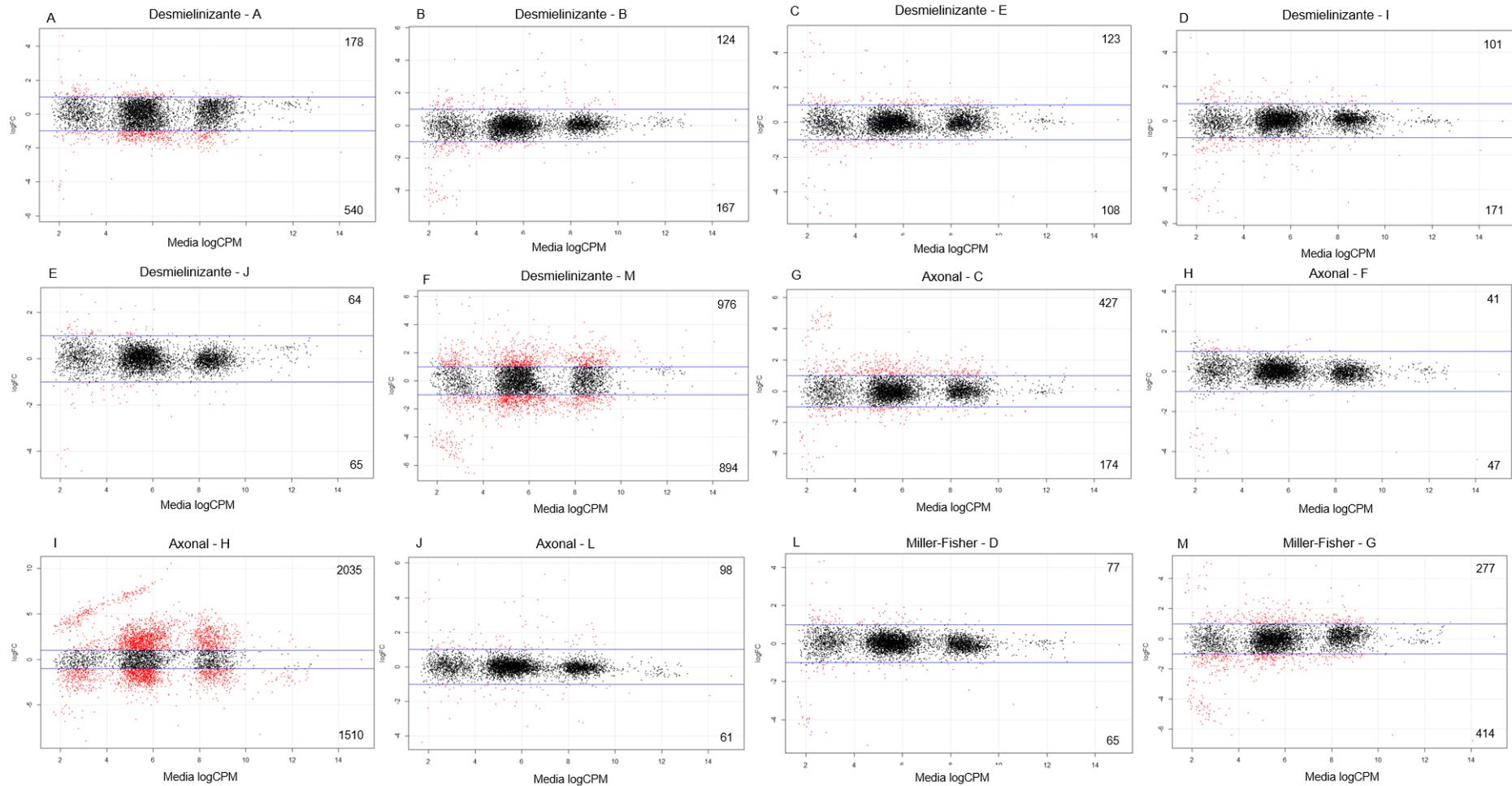
## **6.2 Definição dos perfis transcricionais de células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) em 12 casos brasileiros com SGB, tendo como referência seus respectivos estados de recuperação**

Foi realizada análise por caso afim de averiguar um maior número de vias associadas a SGB. A expressão relativa está representada na Figura 11. Houve variação no número de genes influenciados em cada caso. Os casos H e M apresentaram elevado número de genes diferencialmente expressos, refletindo a estatística descritiva demonstrada. Ambos os casos passaram por etapa de filtragem adicional. Levando-se em consideração os dados de prontuário, chama-se atenção para o caso H que levou bastante para voltar a andar. O caso M teve um intervalo de 180 dias entre coletas. Tendo em vista a heterogeneidade da amostragem, é possível que os transcriptomas representem resultados relacionados a períodos de resposta diferenciados, com alguns mais próximos a fase aguda e outros demonstrem a tentativa de saída dessa fase.

A figura 12 apresenta os genes com maiores variações em suas expressões relativas. Foram considerados as 4 maiores variações por paciente. Genes codantes de imunoglobulinas, *Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A (NR4A)*, *Early Growth Response (EGR)1* e *EGR2* são alguns dos demonstrados na figura 8A, em expressão absoluta. Pode-se observar que de modo geral as expressões tendem a estar próximas nos estados sintomáticos e recuperados. Esses genes podem representar fontes marcadoras de resposta a SGB. As tabelas contendo as informações de expressão para cada caso estão demonstradas no material suplementar (MATERIAL SUPLEMENTAR 1).

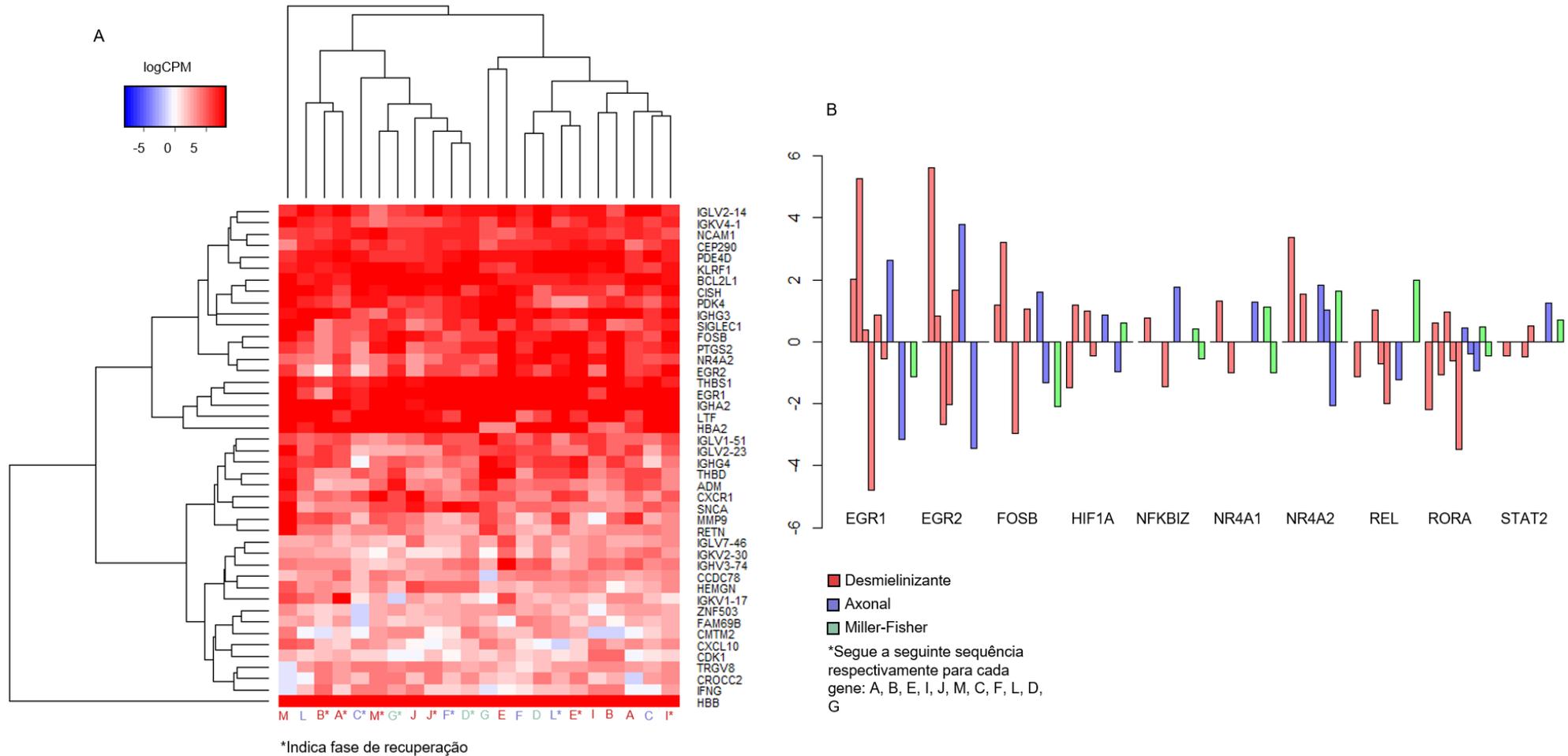
Fatores de transcrição que tiveram expressão diferencial na fase sintomática, estão representados na figura 12B. Para nortear as análises consideramos os genes que tiveram variações mais elevadas. Essa abordagem revelou os seguintes fatores com expressões positivas em pelo menos 4 casos: *EGR1*, *EGR2*, *Fos Proto-Oncogene (FOS)B*, *Hipoxia Inducible Factor 1 Alpha Subunit (HIF1A)*, *NR4A2* e *RAR Related Orphan Receptor A (RORA)*. Alguns desses genes já se apresentavam entres as maiores variações nos transcriptomas individuais.

Figura 11. Representação da expressão relativa de genes entre as fases sintomáticas e recuperadas para cada caso. Em vermelho estão indicados os genes com diferenças de expressão  $\geq 2$  vezes de variação (logaritmo na base 2 de *fold change*), indicado pela linha azul. Os casos Desmielinizantes estão indicados: Caso A – A, Caso B – B, Caso E – C, Caso I – D, Caso J – E, Caso M – F; Casos Axonais: Caso C - G, Caso F – H, Caso H – I, Caso L – H; Casos Miller-Fisher: Caso D – L, Caso G – M. Foram considerados apenas os genes com valores de FDR  $\leq 0,05$  e  $\log_{2}FC \leq 2$ .



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 12. Representação dos genes com maiores variações positivas e negativas nos transcriptomas em estudo. Em vermelho estão indicados os genes para os casos Desmielinizantes, em azul os casos Axonais e em verde os casos Miller-Fisher. C. HeatMap com os valores de expressão absolutos dos genes em logCPM considerados nos subitens A e B. Foram considerados apenas os genes com valores de FDR  $\leq 0,05$ . HeatMap com os fatores de transcrição que tiveram variações em suas expressões. Foram considerados os genes com expressão diferencial em pelos menos um dos casos e com valores de FDR  $\leq 0,05$ .



Fonte: Elaborado pelo autor.

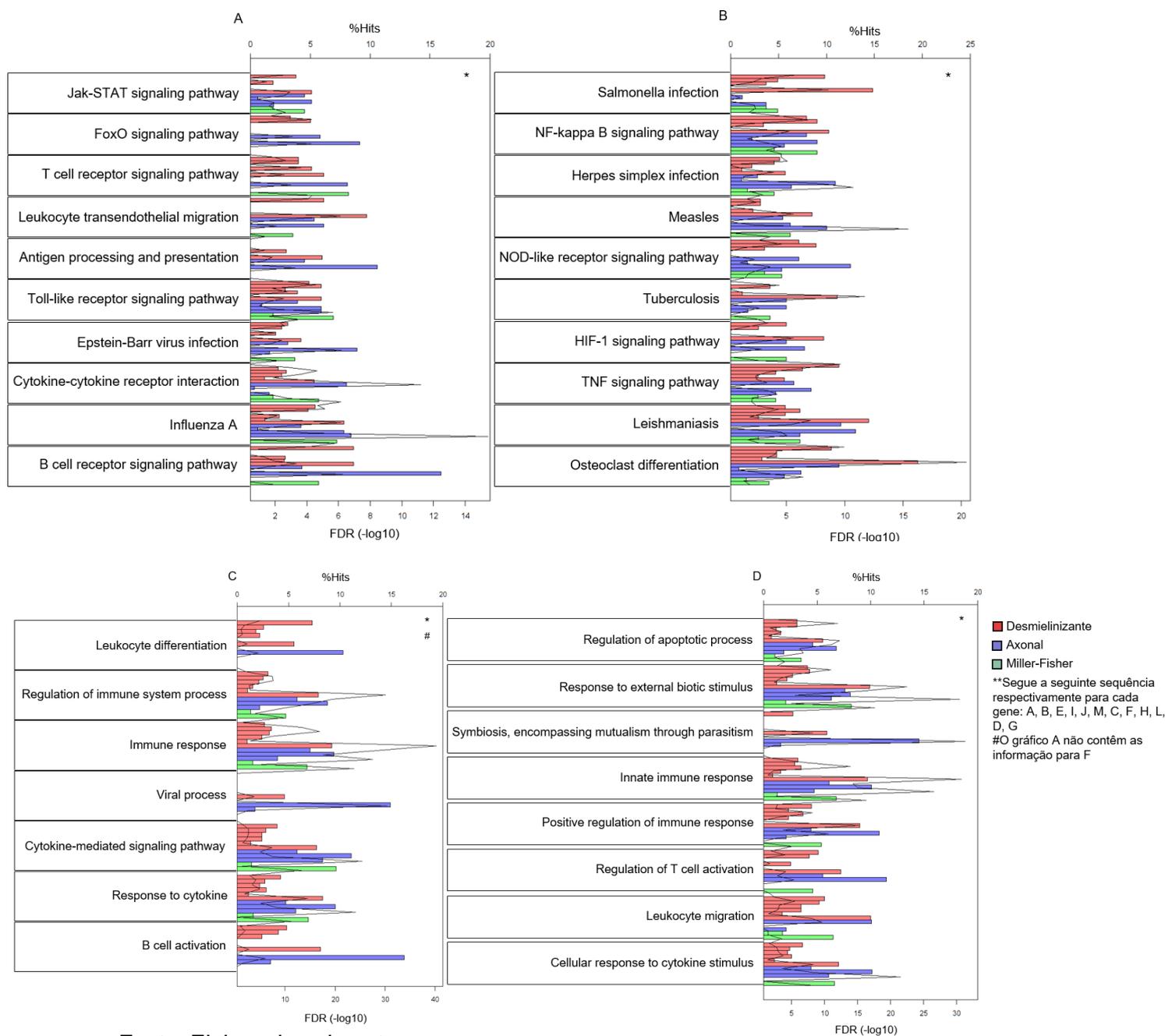
Para associação funcional dos genes diferencialmente expressos, utilizou-se análise de enriquecimento (FIGURA 13). Os resultados demonstraram vias de sinalização, tais como Jak-STAT e TNF, receptores como *Toll-like* e *NOD-like*, além das vias de metabolismos energético (FIGURA 13A e B). Algumas rotas de infecção foram anotadas: bactérias, vírus e protozoários. Para os termos de GO, conseguiu-se enriquecimento para processos relacionados a resposta imunológica, tais como Resposta de citosinas e respostas do sistema imune inato, a resposta a agentes virais, entre outros (FIGURA 13C e D). Também foi possível a observação de termos relacionados ao parasitismo. Esses resultados demonstram sobreposição de respostas entre os casos analisados, a despeito do momento ou o modo como esses genes estão sendo modulados.

Afim de montar uma resposta sobreposta e de forma que represente o momento de cada paciente, usamos abordagem de biologia de sistemas com base em informações de interação proteínas-proteína. Modelo representativo para o subtipo desmielinizante pode ser visto na Figura 14. O caso A - Desmielinizante apresenta uma maior proporção de genes regulados negativamente em rede (APÊNDICE 1). A ancoragem de *EGR1* junto a suas interações mais próximas, permitiu a formação de modulo que parece ter influência sobre o restante dos genes de forma indireta/direta. Dentre os *party-hubs*, estão *JunD Proto-Oncogene (JUND)*, *Fc Receptor Like (FCRL)A*, *Interleukin 1 Receptor Antagonist (IL1RN)*, *Membrane-Bound Immunoglobulin-Associated Protein (CD)79A* e *HIF1A* com expressões positivas e *HIF1A* e *RORA* com expressões negativas. Esse resultado fornece o panorama de mudanças que estão acontecendo em determinado momento para o paciente, podendo significar modulações necessárias que levem a recuperação.

O caso B - Desmielinizante, os genes que permaneceram na rede após corte pela confiança, fornecem um panorama de genes com expressões positivas preferencialmente (APÊNDICE 2A). Os genes *C-X-C Motif Chemokine Ligand (CXCL)8*, *EGR1*, *EGR2*, *HBEGF*, *FOSB*, *FOSL2*, *NFIL3*, *TNF Alpha Induced Protein (TNFAIP)3*, *Prostaglandin-Endoperoxide Synthase (PTGS)2* e *NR4A2* estão todos com expressão positiva. *GATA2* demonstrou expressão negativa. Para o caso E – Desmielinizante, também com a maioria dos genes com expressões positivas, destacando-se na rede *CD163*, *TLR4*, *TRL8*, *Fc Fragmento of IgG Receptor (FCGR)2A* e *C-Type Lectin Domain Family (CLEC)4E* (APÊNDICE 2B). O caso J,

Desmielinizante, os genes *EGR1*, *EGR2*, *FOSB*, *GATA2* e *PTGS2* regulados negativamente, destacando-se *NR4A2* e *TNFAIP3* regulados positivamente (APÊNDICE 3A).

Figura 13. Representantes de *KEGG pathways* e termos de *GO* enriquecidos para os genes diferencialmente expressos observados em todos os casos. A e B demonstram as vias *KEGG*, C e D os termos de *GO*. Em vermelho estão indicados os genes para os casos Desmielinizantes, em azul os casos Axonais e em verde os casos Miller-Fisher. Foram consideradas apenas as vias *KEGG* ou termos de *GO* com valores de  $FDR \leq 0,05$ .



Fonte: Elaborado pelo autor.

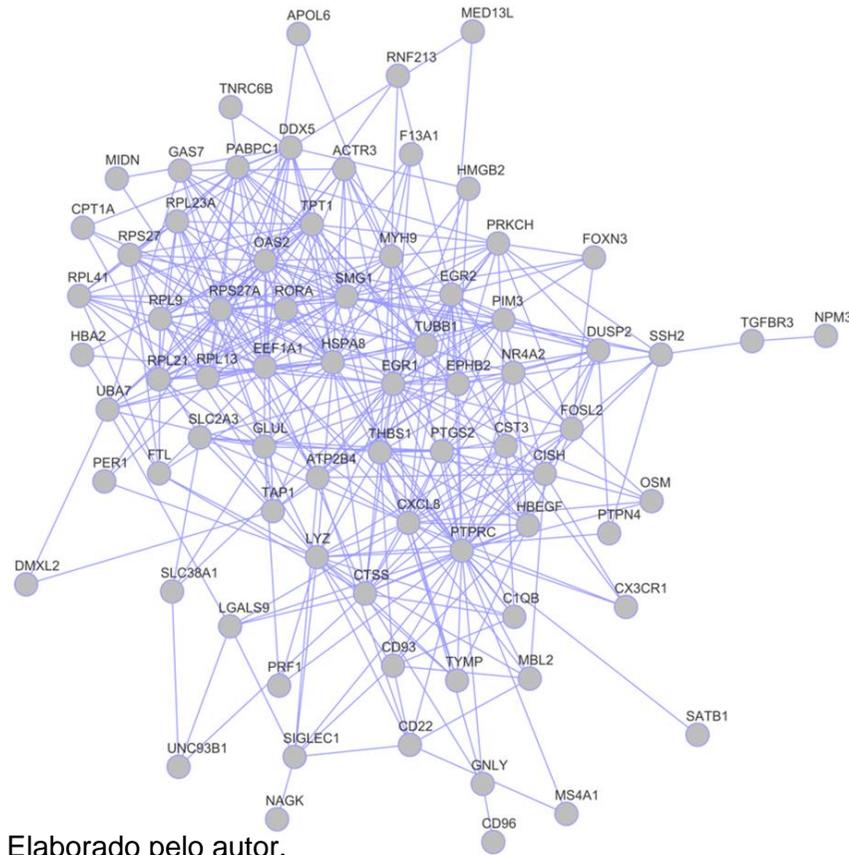
A rede montada para o caso M - Desmielinizante, apresenta maior proporção de genes com expressões positivas (APÊNDICE 3B). Os genes *CD14*, *CD163*, *CD300E*, *FCGR2A*, *FCGR1G*, *IGLC2*, *MYD88*, *NFKB Inhibitor (NFKBI)A*, *STAB1* e *TLR4* surgiram com expressões positivas, incluem receptores e vias relacionadas a imunidade inata e adaptativa. Modelo representativo para o subtipo Axonal pode ser visto na Figura 15. O caso C, Axonal, apresentou maioria dos genes regulados positivamente (APÊNDICE 4). *EGR1*, *EGR2* e *NFKBIZ* são os fatores de transcrição diferencialmente expressos. Além destes, apresentaram-se os genes *CD36*, *CD163*, *HBEGF*, *FCRLA*, *FCGR2CA* e *TRL4* expressos positivamente. Para o caso Axonal L, é possível observar expressão negativa para os genes *EGR1* e *EGR2*, além de outros, enquanto os genes que codificam *Interferon Induced Protein With Tetratricopeptide (IFIT)1*, *JUP*, *SIGLEC1* e *STAT2*, estão com expressões positivas (APÊNDICE 5).

Modelo representativo para o subtipo Miller-Fisher pode ser visto na Figura 16. últimas redes apresentam os resultados para os casos Miller-Fisher, D e G. No caso D é possível observar *CXCL8*, *NR4A2* e *PTGS2* com expressões positivas (APÊNDICE 6A). No caso G, a proporção de genes regulados positivamente é vista para a rede montada, destacam-se os genes *CD93*, *CD163*, *CD302*, *C-X-C Motif Chemokine Receptor (CXCR)4*, *EGR1*, *IGLC3*, *SERPING* e *SIGLEC1* (APÊNDICE 6B). Os resultados em rede proporcionaram uma visão panorâmica das mudanças apresentadas pelos transcriptomas, demonstrando de os diferentes genes expressos em cada caso. Ainda, foi possível observar que em períodos específicos certos fatores estão ativos em detrimento de outros, não sabemos se há uma dependência direta ou se é resultante das mudanças nas redes de transcrição com passar do tempo.



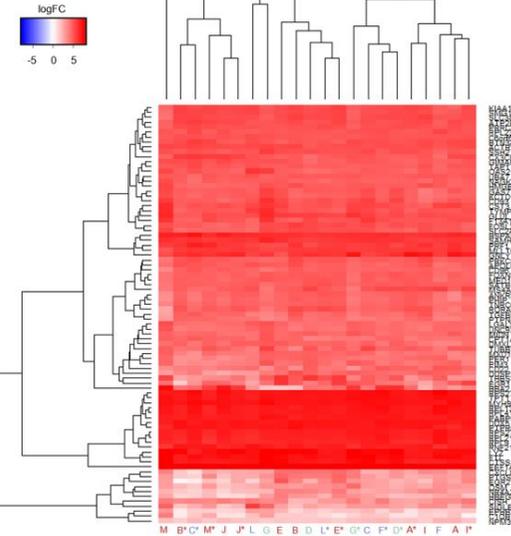
Figura 15. Rede de interação proteína-proteína (PPI) com informações para *Homo sapiens*, contendo genes diferencialmente expressos em comum entre os casos para o subtipo Axonal. A. Demonstra o panorama da rede contendo 97 genes, B. HeatMap com os valores de expressão absolutos em logCPM e C. Vias metabólicas e Processos biológicos enriquecidos para os 97 genes considerados em rede. Foram considerados as vias enriquecidas com valores de FDR  $\leq 0.05$  e com valores de confiança na rede de 0.400.

A



Fonte: Elaborado pelo autor.

B



C

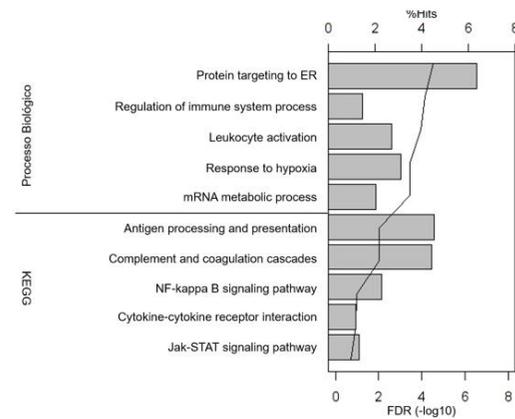
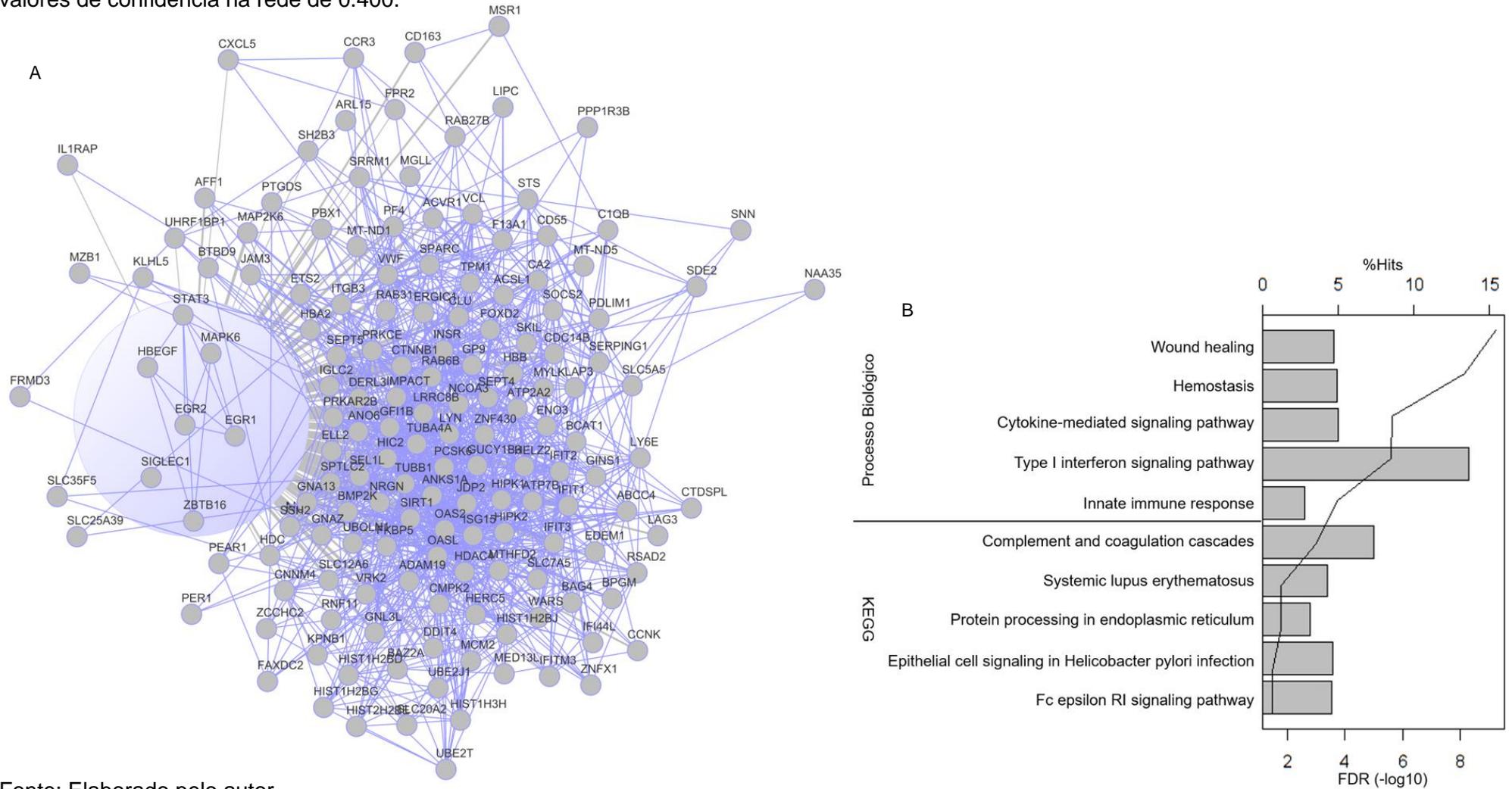


Figura 16. Rede de interação proteína-proteína (PPI) com informações para *Homo sapiens*, contendo genes diferencialmente expressos em comum entre os casos para o subtipo Miller-Fisher. A. Demonstra o panorama da rede contendo 246 genes e B. Vias metabólicas e Processos biológicos enriquecidos para os 246 genes considerados em rede. Foram considerados as vias enriquecidas com valores de FDR  $\leq 0.05$  e com valores de confiança na rede de 0.400.



Fonte: Elaborado pelo autor.

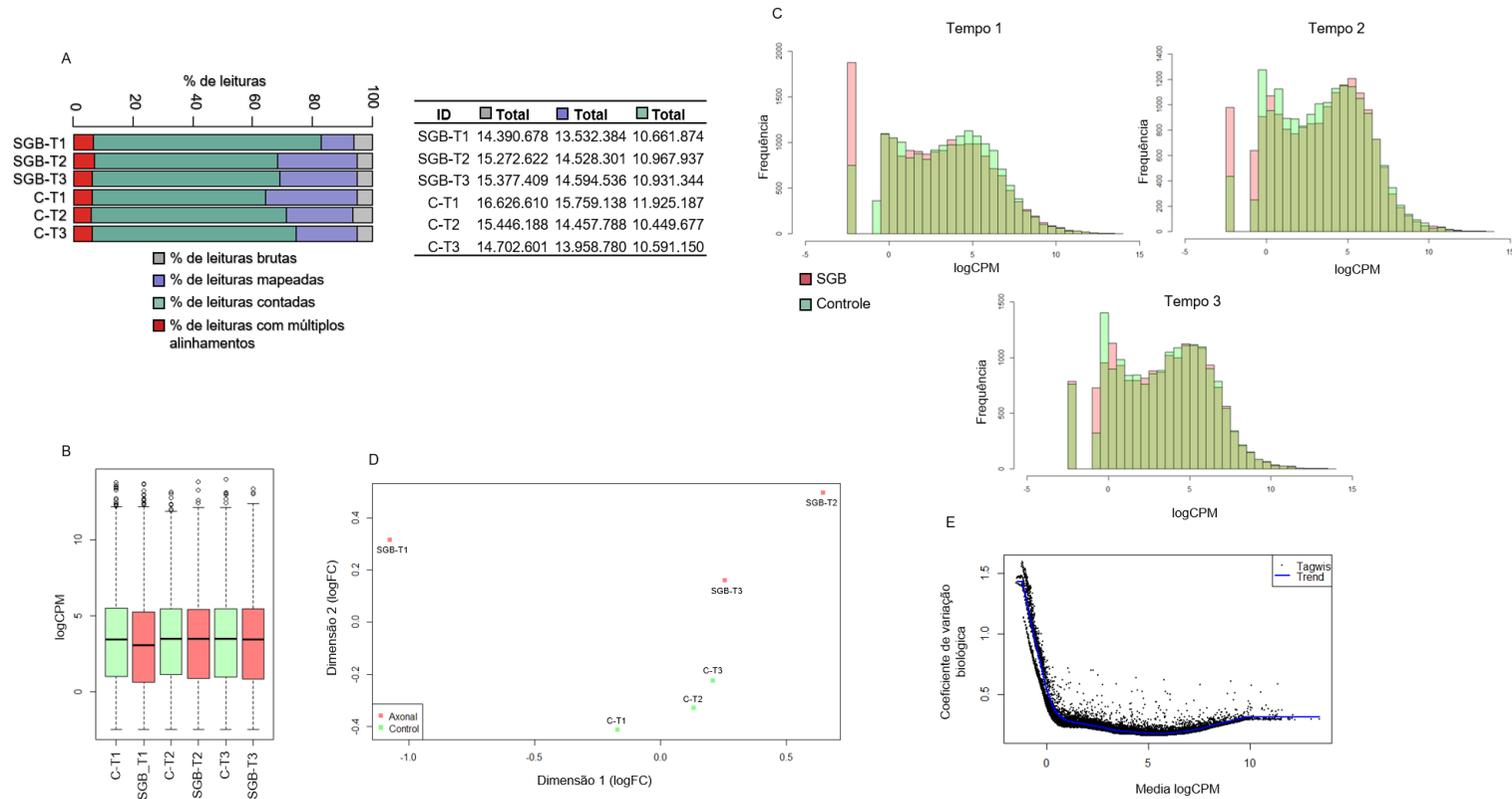
### 6.3 Comparação entre os perfis obtidos nos casos brasileiros a outros estudos transcriptômicos com SGB em Humanos

Dois outros estudos analisaram os perfis transcriptômicos em células mononucleadas no sangue periférico em pacientes com SGB. O primeiro foi publicado em 2012, tratava-se da comparação entre grupo controle (com 7 pessoas) e casos de SGB (com 7 pessoas) na população chinesa. Contudo, a reanálise dos dados depositados no *NCBI* deste estudo não revelou genes com valores de FDR significativos (dados não mostrados), a análise foi feita utilizando-se o pacote *limma* (CHANG et al., 2012; RITCHIE et al., 2015). O outro estudo foi publicado em 2016, onde verificou-se três pontos de progressão de SGB, a cada ponto também foi coletado material do controle, que era a irmã gêmea saudável.

A reanálise desses dados confirmou os resultados observados originalmente, além de expandi-los. O sumário dos resultados de alinhamento e mapeamento podem ser vistas na figura 17A. A estatística descritiva das observações demonstra variação entre os pontos de coleta com base na frequência e vistas pelos quartis, além separação entre as amostras no escalonamento multidimensional (Figura 17B, C, D e E).

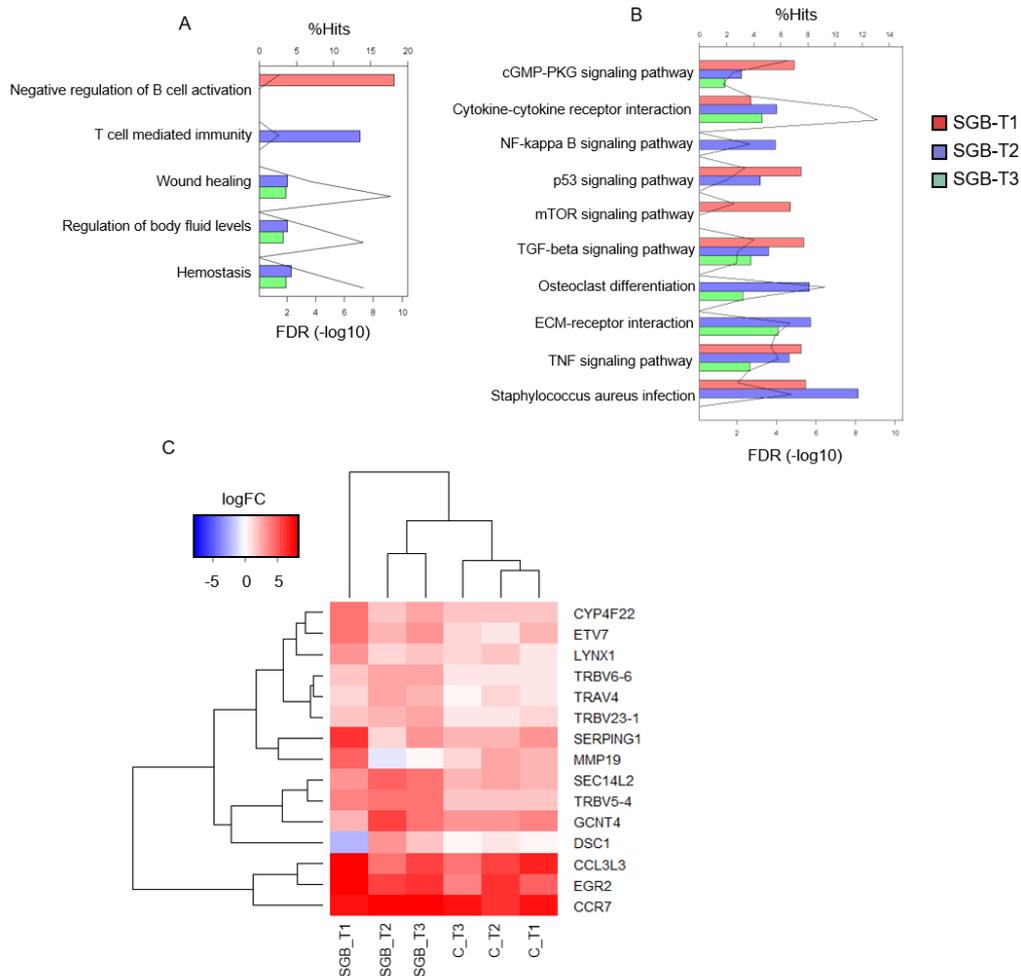
A figura 18 apresenta os resultados de enriquecimento para os três pontos de coleta durante a progressão de SGB. Os autores realizaram as coletas em pontos distintos, durante meses, o terceiro ponto representa o paciente em recuperação. A cada ponto é possível observar mudança nas abundâncias na expressão de genes, bem como surgimento e desaparecimento de genes entre as coletas. A análise de enriquecimento mostra termos de GO e vias KEGG a cada ponto da progressão, com algumas tendo sobreposição, principalmente entres os tempos 2 e 3 em referência aos processos biológicos considerados, como regulação negativa de células B, células T mediando a imunidade e regulação dos fluidos corpóreos, também vistas nos casos brasileiros. Também encontramos vias de sinalização, como TNF e NF-KB, além das relacionadas a infecções e de metabolismo geral. O desenho experimental é limitado pelo número de repetições, contando apenas com uma observação transcriptômica por ponto de coleta. Por esse motivo, não mostramos os resultados de diferenças de expressão de genes no global ou diferencial, tendo em vista que a modelagem estatística é limitada ao se fornecer esse número de observações.

Figura 17. Quantidade das leituras brutas, alinhadas, contadas, com múltiplos alinhamentos e Estatística descritiva dos resultados dos transcriptomas considerados na análise. A. Demonstração em porcentagem e quantidades numéricas totais. Os quadrados indicam: cinza - leituras brutas, azul - leituras mapeadas, verde – leituras contadas e vermelho - leituras com múltiplos alinhamentos. Foram considerados para análise apenas as leituras com valores de Phred  $\geq 30$ . B. Boxplot das contagens após normalização considerando os pontos de coleta, nas distintas fases de progressão de SGB, e C. Distribuição de frequência das contagens após normalização considerando os pontos de coleta, as cores vermelha e verde indicam indivíduo com SBG e sua gêmea saldável - Controle, respectivamente. D. Escalonamento multidimensional das amostras considerando as abundancias dos genes, as cores vermelha e verde indicam indivíduo com SBG e sua gêmea saldável - Controle, respectivamente. E. Coeficiente de variação biológica considerando as 6 observações transcriptômicas em estudo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 18. Representantes de termos de GO enriquecidos e KEGG pathways no caso de SGB considerado pelo grupo espanhol. A. Termos de GO e B. Vias KEGG. A cor vermelha indica ponto coleta 1, em azul ponto de coleta 2 e em verde o ponto de coleta 3. Foram consideradas as vias KEGG ou termos de GO com valores de FDR  $\leq 0,05$ . C. Heatmap com as expressões absolutas de alguns genes vistos nas bibliotecas transcriptômicas consideradas no estudo espanhol.



Fonte: Elaborado pelo autor.

## 7 DISCUSSÃO

### 7.1 Principais genes e vias moduladas em células mononucleadas do sangue periférico nos casos estudados de SGB

A avaliação em grupo e individual dos casos brasileiros proporcionou a anotação de vias e genes que respondem ao estado sintomático quando comparados a fase de recuperação de SGB, embora as coletas tenham sido feitas na fase aguda da doença e no estado de recuperação. Vale ressaltar, que o tratamento desse dado como um grupo é desafiador, tanto do ponto de vista das variações individuais como da própria complexidade em se trabalhar com o tecido sanguíneo. Em trabalho de revisão Fan e Hegde (2005) citam fatores complicadores, como os vários tipos celulares e os diferentes estágios em que os mesmos se encontram, impactando nos perfis de expressão. Saídas metodológicas estão no campo dos métodos/técnicas de isolamento, como é o caso do PBMC.

Embora o tecido sanguíneo apresente desafios inerentes na análise de transcriptômica, ele permite o estudo de doenças em humanos sem deixar sequelas. Como SGB é uma enfermidade que se caracteriza por danos ocasionados aos nervos periféricos, a realização de coletas dificilmente não deixaria sequelas. Do ponto de vista dos modelos estatísticos para o tratamento de dados oriundos de abordagens transcriptômicas de RNA-Seq, estes incluem rigor desde o momento do alinhamento das leituras (*reads* de sequência) até a definição dos processos celulares. Song e colaboradores (2017) discutem os desafios em se encontrar biomarcadores no tecido sanguíneo, definindo um modelo para busca de respostas coerentes e robustas em análises de infecção e em doenças autoimunes, incluindo a verificação e demarcação de genes correlatos à situação em estudo. O presente trabalho, guiou-se pela estatística descritiva dos dados, além da utilização de um modelo estático para análise diferencial de genes, levando em consideração a observação de pesos, variações entre as repetições e mudanças comuns de genes entre os casos (ZHOU; LINDSAY; ROBINSON, 2014; LIU et al., 2015).

A reanálise utilizando o pacote *limma* no R dos dados disponíveis para SGB por esse viés estatístico revelou que o trabalho desenvolvido pelo grupo chinês (CHANG et al., 2012; GSE31014) não apresentou resultados significativamente diferentes entre os grupos, a saber, 7 casos com SGB comparados a 7 pessoas

saudáveis. Por outro lado, o estudo realizado pelo grupo espanhol (DONCEL-PÉREZ et al., 2016; GSE72748), demonstra desenho único, com a comparação entre uma paciente com SGB e sua irmã gêmea saudável, embora não apresente um número de repetições necessárias para uma para uma análise de expressão diferencial com o necessário rigor estatístico (CONESA et al., 2016; SCHURCH et al., 2016). Por esse motivo, apenas os resultados revelados por *qPCR* citado no artigo publicado pelo grupo espanhol serão considerados, tais resultados foram gerados pela observação da expressão gênica em 7 casos com SGB. Desse modo, é clara a escassez de dados moleculares com desenho robustos que possam ser utilizados para a predição de redes regulatórias de expressão gênica e vias responsáveis pela progressão de SGB. O trabalho desenvolvido pelo grupo brasileiro (DOURADO JÚNIOR, 2015), representa uma fonte de dados que pode servir para a identificação de genes e vias moduladas durante a fase sintomática de SGB, além de poder fornecer potenciais genes-alvos para fins terapêuticos.

A partir de uma análise de enriquecimento utilizando os genes diferenciamente expressos, um mapeamento de vias de sinalização imunológicas, inflamatórias, foi obtido. Chama-se atenção que durante o desencadeamento de SGB vias comuns as relatadas para infecção com o vírus Epstein-Barr e o vírus da Herpes parecem estar ativas. Algumas vias relacionadas ao sistema imune adaptativo também foram enriquecidas, tais como a via de sinalização de células T. Além destas, foi possível encontrar vias dos receptores *NOD-like* e *Toll-like* representando parte da resposta do sistema imunológico inato. Esses resultados permitiram a observação de delineamento geral em vias que podem estar relacionadas a progressão de SGB.

Como demonstrado na análise de expressão relativa considerando os casos, foi possível a identificação de genes responsáveis pela codificação de fatores de transcrição. Dentre estes, destacam-se *EGR1* e *EGR2*. Mudanças na expressão de *EGR2* foram relatadas como um importante fator durante a recuperação de SGB, e por este motivo este FT pode ser indicando como biomarcador desta fase em SGB (DONCEL-PÉREZ et al., 2016). Safford e colaboradores (2005) descreveram *EGR2* e *3* como moduladores negativos da ativação de células T, ou seja, moduladores anérgicos. Células T reguladoras estão envolvidas na manutenção da auto-tolerância e homeostase imune. Recentemente foi descrito o controle exercido por esses FTs durante a resposta imune adaptativa, tendo como alvos as células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>

(MIAO et al., 2017). Neste mesmo trabalho foi demonstrado que EGR2 exerce suas funções ligando-se e regulando a expressão de *MYB Proto-Oncogene Transcription Factor (MYB)* e *MYC Proto-Oncogene Transcription Factor (MYC)*, a diferenciação de repressores B-Cell CLL/Lymphoma 6 (BCL6) e Inhibitor Of DNA Binding 3 HLH Protein (ID3), além de reprimir a expressão dos fatores de transcrição *Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2 (ZEB2)*, RORA, RORC e *Basic Helix-Loop-Helix Family Member E40 (BHLHE40)*.

Morita e colaboradores (2016) demonstraram que EGR2 e 3 regulam a reação de centro germinal, pela promoção da síntese *Transforming Growth Factor (TGF)-β3*, sugerindo a utilização desses TFs como potenciais alvos para criação de terapias em doenças autoimunes. Deficiência de ambos os fatores em modelos de camundongos levou ao desenvolvimento de Lupus (MORITA et al., 2016). Adicionalmente, há relatos de que o *EGR2* pode induzir a conversão de células T CD4<sup>+</sup> *naive* em formas ativas secretoras de IL-10 (OKUMARA et al., 2009). Além desses achados, WARNER e colaboradores (1999) avaliaram as consequências funcionais de mutações no gene de *EGR2* correlacionadas à severidade em miopatias humanas, incluindo a doença Charcot-Marie-Tooth. Uma análise em 47 famílias coreanas com pacientes diagnosticados com essa revelou que mutações em *EGR2*, podem estar ligadas a uma pré-disposição a doença Charcot-Marie-Tooth (CHOI et al., 2004). Tal doença é classificada como um grupo heterogêneo de desordens genéticas que apresentam o fenótipo de neuropatia crônica progressiva que afeta os nervos motores e sensoriais (SZIGETI; LUPSKI, 2009).

O aumento da expressão de *EGR1* e *EGR2* em alguns casos do estudo brasileiro pode estar relacionado a uma tentativa de recuperação do controle imunológico, possivelmente representando a resposta necessária para a transição ao estado de recuperação. Desse modo é possível, que os casos com aumentos da expressão destes TFs (A, B, C, E, J e M) representem uma resposta de retomada do controle imunológico ou tentativa de saída da fase aguda, por meio da supressão da auto-tolerância em SGB. Nossos resultados juntamente aos relatos do grupo espanhol (DONCEL-PÉREZ et al., 2016), dão suporte de que *EGR2* funcione como um importante fator de transcrição durante a progressão de SGB, possivelmente ligado a retomada da normalidade imunológica, podendo representar um biomarcador do

estado de recuperação e um potencial alvo para desenvolvimento de terapias para acelerar o início desta fase.

Para confirmação deste potencial são necessários estudos que apresentem um maior número pontos de coleta/acompanhamento durante o curso da SGB, como proposto pelo *International Guillain-Barré Syndrome Outcome Study* - IGOS (JACOBS et al., 2017). Ainda não é clara a participação de EGR1 nesse processo, embora aumento da expressão do mesmo tenha sido observado em SGB nos casos espanhóis em recuperação (DONCEL-PÉREZ et al., 2016). Este FT é descrito como importante durante a diferenciação e mitogênese celular, sendo também sugerido como um gene supressor de tumores (OBEN et al., 2017).

Foi possível a observação dos receptores NR4A1 e 2 diferencialmente expressos em alguns dos casos avaliados. Tratam-se de receptores de fatores de transcrição pertencentes a superfamília de *Steroid-thyroid hormone-retinoid receptor*. Suas expressões podem estar implicadas em respostas mitogênicas e em vias de sobrevivência e morte celular (LI et al., 2006). Um estudo *in vitro* demonstrou NR4A1/3 envolvidos no desenvolvimento de tímócitos, além de sua participação em vias de maturação de células T, podendo estar participando de processos pró-apoptóticos e anti-apoptóticos. Ainda, foi reportado que a expressão diminuída de NR4A2 no PBMC está correlacionada a inflamações crônicas em pacientes com diabetes do tipo 2 (LI et al., 2006; XU et al., 2015). No presente estudo, tais receptores podem estar participando de um mecanismo de modulação do sistema imune, do processo de maturação de células T ou mesmo promovendo apoptose. No entanto, os resultados aqui apresentados ainda não elucidam de forma clara o papel que essas proteínas podem ter em SGB.

*EGR1*, *EGR2* e receptor *NR4A1*, representam potenciais marcadores do período de resposta celular a fase sintomática aguda e possivelmente tentativa de retomada da homeostase imunológica. Tendo como referência os dados de prontuário, os casos A, E, J e M levaram entre 5 a 22 dias para apresentarem os primeiros dados de melhoria aos sintomas, enquanto os casos B e C levaram entre 45 a 60 dias para a melhoria aos sintomas relacionados a fase aguda. Pelas funções descritas para esses genes, levando-se em consideração seus níveis de expressão, é possível que tais casos possam estar na fase inicial de retomada do “controle” da resposta produzida por células imunes autoreativas. Nos casos onde não foi possível

a observação de expressão positiva ou em que esses genes estavam sendo expressos negativamente, podem representar as variações individuais de resposta, além de poder ser reflexo da diferença de dias entre as coletas (a 1° coleta representa a fase aguda e a 2° coleta representa fase de recuperação).

HBEGF surgiu como diferencialmente expresso para os casos do subtipo desmielinizante, tanto durante a análise em grupo como durante a análise caso-específica. Tal proteína, que pertence à família EGF, é um fator de crescimento que intermedia seus efeitos via EGFR, ERBB2 e ERBB, ligando-se ao receptor de EGF com maior afinidade (PUSCHMANN et al., 2013). É um parálogo de *Amphiregulin* (AREG), que é um fator de crescimento autócrino membro da família dos fatores de crescimento epidermal. Este estimula a proliferação de astrócitos, células de Schwann, fibroblastos e está relacionado a regulação de danos induzidos por infecções virais (ZAISS et al., 2015; MCCARVILLE; AYRES, 2018). Aumento da expressão de HBEGF pode estar correlacionada à neuroproteção e ao reparo tecidual, assim como restauração da neurogênese (JIN et al., 2002). Em 2015, HOFFMANN e colaboradores demonstraram que o aumento da expressão de HBEGF induzido por *Fingolimod* (FTY720), em cultura de astrócitos humanos, estava relacionado a neuroproteção. Em contraste, a inibição do receptor de *EGF* levou a diminuição da severidade em modelo experimental de encefalite autoimune, indicando sua possível utilização como alvo terapêutico (AKAMA-GARREN; SWANSON; ROBINSON, 2012).

Também, *NFIL3* e *GATA2* apresentaram-se diferencialmente expressos quando considerado o grupo para o subtipo Desmielinizante. O primeiro (*NFIL3/E4BP4*) é um TF do tipo zíper de leucina (KOBAYASHI et al., 2011). KAMIZONO e colaboradores (2009) demonstraram que em camundongos *NFIL3* está relacionado ao desenvolvimento de linhagem de células NK. SEILLET e colaboradores (2014) mostraram que essa proteína tem papel no desenvolvimento em células NK na medula e no Timo. Além destes, há relatos de sua participação no desenvolvimento de células dendríticas e células linfoides inatas, como nas células da mucosa intestinal e Placa de Peyer (KASHIWADA et al., 2011; GEIGER et al., 2014; SEILLET et al., 2014), assim como papel na indução de tolerância em células T (ZHU et al., 2015; ZHU et al., 2016). O presente estudo fornece o primeiro relato de associação dessa proteína a SGB.

GATA2 é um fator de transcrição pertencente à família GATA *zinc-finger* (IPR013088). Participa de via crítica para sobrevivência e proliferação de células tronco hematopoiéticas, diferenciação de células progenitoras de granulócitos-monócitos e diferenciação de basófilos e mastócitos (LI et al., 2016). Deficiência de GATA2 está atrelada a desordens hematopoiéticas, linfáticas e da imunidade (SPINNER et al., 2014). No presente estudo verificou-se diminuição da expressão de GATA2 nos casos desmielinizantes, o papel desse fator de transcrição na progressão da doença deve ser alvo de maior investigação.

*Ephrin type-B receptor 2* (EPHB2) pertence a família Eph de receptores transmembrana tirosina kinase, relacionados a transmissão sináptica (DALMAU; GEIS; GRAUS, 2016). Expressão positiva para esse gene foi demonstrado para o grupo de casos Axonais. Ele possui papel na adesão celular durante respostas inflamatórias inatas e adaptativas, além de alterações da permeabilidade vascular, regulação da hematopoese e modulação da atividade de células T (BUTLER; SCHMIDT, 2016). Em células sanguíneas EPHB2 é expresso preferencialmente em monócitos e macrófagos (PFAFF et al., 2008). Altos níveis dessa proteína no soro foram encontrados em pacientes com Lúpus, também correlacionados à doença em estado ativo (AZZOUZ et al., 2016). É possível que essa proteína esteja relacionada a resposta inflamatória nos casos Axonais. No entanto, há relatos da presença de homólogo desse receptor na junção neuromuscular (LAI; IP, 2003).

STAB1 foi outro gene alterado positivamente no grupo de casos Axonais. Ele codifica uma proteína receptora de membrana, contendo 7 domínios *fasciclin*, 16 domínios *EGF-like* e 2 *lectin-like* do tipo C (POLITZ et al., 2002). Essa proteína está presente nos vasos linfáticos, endotélio sinusoidal e população de macrófagos tipo II (KARIKOSKI et al., 2009; PARK et al., 2009). Foi demonstrado *in vivo* que STAB1 é responsável pela interação de linfócitos e endotélio linfático, e o seu bloqueio resultou na diminuição da inflamação (KARIKOSKI et al., 2009). Em contraste, PALANI e colaboradores (2015) demonstraram em cultura de células que monócitos com altos níveis de STAB1 estão relacionados à diminuição da expressão de genes pró-inflamatórios, podendo funcionar como uma molécula imunossupressora *in vivo*. Esse gene também é relatado em populações de macrófagos infiltrados no tecido hepático como tendo papel na manutenção da homeostase e proteção contra o estresse oxidativo (SHETTY et al., 2017). Aumento da expressão desse gene em SGB para o

subtipo Axonal pode representar via para diminuição da resposta inflamatória, contudo, também é descrito sua interação com o tráfego de leucócitos nos vasos linfáticos. Tendo em vista esses achados, é difícil precisar o papel que essa proteína pode ter na progressão de SGB.

*Natural Cytotoxicity Triggering Receptor 1* (NCR1) pertence à família de receptores de sinais a células NK para produção de citocinas em respostas a células prejudiciais (HUDSPETH; SILVA-SANTOS; MAVILIO, 2013). No presente estudo foi demonstrado expressão diminuída para *NCR1* no grupo de casos do subtipo axonal. Células NK são leucócitos inatos cruciais para o controle de infecções, possuindo receptores que discriminam entre células saudáveis e prejudiciais (KOCH et al., 2013; MARTINET; SMYTH, 2015). Entre as citocinas produzidas por esse tipo celular estão: *Interferon-γ* (IFN $\gamma$ ), CCL3, CCL4 e CCL5 (MARTINET; SMYTH, 2015). Relata-se que o NCR1 atua mediando MHC I no processamento e apresentação de antígenos. O bloqueio desse receptor resultou na inibição da lise de células infectadas pelo vírus Epstein-Barr (MORETTA et al., 2000). Diminuição da expressão de NCR1 pode representar parte da perda da discriminação entre células saudáveis e infectadas, podendo participar dos mecanismos que levam a autotolerância em SGB.

MSR1 foi um dos genes regulados positivamente para o grupo do subtipo Miller-Fisher. Pertence à classe A de receptores de eliminação de macrófagos, é uma glicoproteína integral de membrana (GREAVES; GORDON, 2009). Estudo recente associou DAMPs advindos de células isquêmicas cerebrais internalizados por MSR1, onde a diminuição dessa proteína resultou em quadro inflamatório mais severo (SHICHITA et al., 2017). HAASKEN e colaboradores (2013) demonstraram em modelo de camundongos deficientes de MSR1 diminuíram a incidência e a severidade de artrite, embora com níveis elevados de autoanticorpos séricos circulantes. Aumento da expressão dessa proteína pode estar associada a resposta imune inata, com possíveis impactos na resposta imune adaptativa.

Ainda para esse subtipo, os genes *HDC*, *NRAV* e *TRAV16* estão entre os genes modulados negativamente. O gene *HDC* codifica membro de descarboxilase do grupo II relacionada à síntese de histamina. A histamina participa de vias fisiológicas críticas, como inflamação e modulação imunológica (JUTEL et al., 2002). NAKAZAWA e colaboradores (2014) sugeriram que a histamina promove a maturação de mastócitos e age como mediador pró-inflamatório. *Negative regulator of antiviral*

*response* (NRAV) é um gene de RNA, não codificante. Diminuição da expressão desse gene é correlacionada a algumas infecções virais, podendo participar da modulação da resposta antiviral mediada por interferon (OUYANG et al., 2014). *T-cell receptor alpha variable region* (TRAV) está ligada ao reconhecimento de antígenos de células T processados como peptídeos pequenos, mediado pelo complexo de histocompatibilidade (LI et al., 2007).

Fatores de transcrição destacados na análise individual foram: HIF1A, NFKBIZ e RORA. HIF1A é um importante regulador de transcrição ao metabolismo correlato a deficiência de oxigênio, promovendo as adaptações necessárias a condições de hipóxia (NIZET; JOHNSON, 2009). Sua expressão permite que macrófagos e neutrófilos consigam realizar suas funções em condições de hipóxia nos tecidos infectados, assim promovendo a resposta imune inata. NF-KB contribui para o aumento da expressão de *HIF1A*, ambos parecem ter ações sinérgicas (RIUS et al., 2008). Aumento da expressão de tais FTs é descrito na resposta a infecções de origem bacteriana, pois HIF favorece atividade bactericida e correlata a resposta desencadeada por receptores TLR4 (NIZET; JOHNSON, 2009). Nesse contexto, NFKBIZ é relatado em vias inflamatórias de resposta ao LPS, modulando a resposta inata por meio da inibição de NF-KB (SUNDARAM et al., 2016).

RORA é membro da subfamília de *orphan nuclear receptors*, participando da regulação de múltiplos processos celulares, como crescimento, diferenciação e apoptose (DZHAGALOV; GIGUERE; HE, 2004; JETTEN et al., 2009; TUONG et al., 2016). É expresso em vários tecidos e regula a resposta inflamatória, desenvolvimento neuronal, metabolismo do tecido ósseo e diferenciação de células CD4<sup>+</sup> Th17 (YANG et al., 2008). Polimorfismos nesse gene estão ligados a susceptibilidade a Esclerose Múltipla (EFTEKHARIAN et al., 2016). RORA pode estar associado a origem de células T autoreativas em SGB, mais estudos são necessários para verificar os reais efeitos da expressão desse gene em pessoas acometidas por essa síndrome.

Além destes, *FOS*, *FOSB*, *FOSL2*, *JUND* e *STAT2* foram genes demonstrados diferencialmente expressos para alguns casos. *FOS*, *FOSB* e *FOSL2* pertencem à mesma família de genes e seus produtos podem dimerizar com proteínas da família JUN, formando o fator de transcrição AP1 com especificidades para diferentes para regiões de sequências (WYNNE et al., 2017). AP1 é responsivo a

fatores de crescimento e citosinas, controla proliferação, diferenciação, transformação e morte celular (SHAULIAN; KARIN, 2002).

STAT constitui uma família de proteínas transdutoras de sinais e ativadoras da transcrição, estando envolvidas com a resposta imunológica, proliferação, apoptose e diferenciação celular (MAJOROS et al., 2016; VARIKUTI et al., 2016). Formas desreguladas de membros de STAT estão associadas a esclerose múltipla (YAN et al., 2016). STAT2 pode estar relacionada as respostas inflamatórias na fase aguda de SGB. Nesse contexto, SOCS3 é relatado como modulador negativo de membros da família STAT, deleções desse gene em camundongos resultou em encefalite autoimune (YAN et al., 2016). Boontanrart e colaboradores (2016) demonstraram que o aumento da expressão de SOCS3 na micróglia pela suplementação de vitamina D via aumento da expressão de IL10, estava relacionada a resposta anti-inflamatória.

Outro gene diferencialmente expresso visto na análise em grupo e individual foi o codificante de C1QB, que é um componente do sistema do complemento sérico. O sistema do complemento do mecanismo imune inato é antigo e evolutivamente conservado, sendo dividido em três vias: Clássica, Alternativa e Lectina (VIGNESH et al., 2017). Excessiva ativação e descontrole do sistema do complemento pode resultar em doenças autoimunes. C1q faz parte da via clássica, ligando-se a porção Fc (IgG ou IgM) exposta durante a formação do complexo antígeno-anticorpo (MERLE et al., 2015). Deficiência dessa proteína está relacionada ao Lúpus (LINTNER et al., 2016; VIGNESH et al., 2017). Aumento da expressão desse gene pode indicar uma correlação de SGB ao sistema do complemento clássico.

Esses genes representam importantes pontos de modulação das respostas e processos celulares, incluindo fatores de transcrição, receptores e transdutores de sinais. Podem representar fonte de biomarcadores ou prováveis alvos terapêuticos. Ainda, alguns genes que estão entre os que têm suas abundâncias alteradas de forma elevada entre as fases, são: *CXCR1*, *CXCR2*, *CXCL6*, *CXCL8*, *CD36*, *CD86*, *Myocyte Enhancer Factor (MEF)2A*, *Neurogranin (NRGN)* e *Noggin (NOG)*. *CXCR1* e *CXCR2* são membros da família de receptores acoplados a proteína G, ambos receptores de IL8 (MOEPPS, 2017; MOUSSOURAS et al., 2017). Promovem a migração de neutrófilos aos sítios de inflamação (TODD et al., 2016). Ambos os genes tiveram expressão diminuída no grupo de casos Axonais. A regulação negativa desses genes

pode estar relacionada a diminuição da resposta inflamatória inata mediada por neutrófilos em SGB.

CXCL6 e 8 são codificadas por genes pertencentes a família de quimosinas CXC, principais mediadores da resposta inflamatória. São sintetizadas por neutrófilos e servem como fatores quimiotáticos-guia aos sítios de infecções. CXCL8 é relatada como um dos agentes que promovem o crescimento de tumores e sua posterior migração (XIAO; WU; POLTORATSKY, 2017). Foram encontrados altos níveis dessa quimosina no líquido cefalorraquiano de pacientes com HIV-1 associados com demência (ZHENG et al., 2008). Os autores demonstram que IL1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , produzidos por macrófagos infectados por HIV-1, levam ao aumento de produção de CXCL8 nos astrócitos, assim culminando em danos, desferidos por macrófagos ativados, aos neurônios.

Para esclerose múltipla, CXCL6 e TNF- $\alpha$  são relatados como mediadores pró-inflamatórios, promovendo a invasão ao tecido nervoso (WU; SHEN, 2016). CD4<sup>+</sup> Th1 e Th17 são as células consideradas cruciais na promoção da neuroinflamação, contudo a infiltração depende da ação de interleucinas e quimiocinas pró-inflamatórias sintetizadas por células locais (JIMÉNEZ-DALMARONI; GERSWHIN; ADAMOPOULOS, 2016; CHOI et al., 2016; WU; SHEN, 2016). Os genes *CXCL6* e *8* podem estar relacionados à promoção da inflamação em SGB, podendo representar uma via de recrutamento das possíveis células T e/ou B autoreativas.

Nesse contexto, foi possível verificação da variação de expressão de genes codificadores de CD, moléculas marcadoras de superfície como receptores ou ligantes. Foram observadas variações na expressão de CD36 e CD86. CD36 teve sua expressão descoberta em células B ligadas às respostas inatas, denominadas células B da zona marginal. A formação de células B em centros germinais e a produção de autoanticorpos coincide com baixa na expressão de CD36 de células B da zona marginal. Por exemplo, pacientes com Lupus apresentaram baixo número de células CD36 (DUHLIN et al., 2017). Tais células podem ter papel na progressão de SGB, podendo representar importante ponto de modulação da inflamação e/ou imunidade, podem estar associadas a saída da fase aguda em SGB e prosseguimento para fase de recuperação.

Em centros germinais, CD86 é relatada como participante de via pivô em doenças autoimunes como o Lupus (HAN et al., 2017). Em trabalho com citometria de

fluxo, ZHU e colaboradores (2016) demonstraram aumento das quantidades de CD86 em células CD5<sup>+</sup>B em pacientes com anemia hemolítica. Além disso relataram uma correlação negativa com a quantidade de hemoglobinas. Os resultados no presente trabalho demonstraram que no geral os casos sintomáticos demonstraram diminuição da expressão de genes codificadores de cadeias de hemoglobinas, a citar: HBM, HBG2, HBG1. Uma quantitativa desses transcritos durante o curso de SGB pode representar um ensaio que indique o possível estágio em que os pacientes estão, contudo, mais resultados são necessários para indicar com maior certeza se essa correlação permanece no nível de proteínas durante a SGB.

Outros genes diferencialmente expressos nos casos estudados foram *NOG* e *MEF2A*. *NOG* codifica um polipeptídeo que faz parte do complexo formador do fator de crescimento-beta (TGF- $\beta$ ). Este foi recentemente relatado como crucial mediador da imunomodulação de precursores em células neurais, tendo potencial para utilização em terapias de esclerose múltipla (DE FEO et al., 2017). *MEF2A* codifica fator de transcrição MEF2A, pertencente à família *myocyte enhancer factor 2* composta de quatro proteínas, que desempenham funções no desenvolvimento muscular, diferenciação neuronal e apoptose (PON; MARRA, 2016). Em células sanguíneas, tem papel na diferenciação de células hematopoiéticas, MEF2B e C estão envolvidas com os centros germinais de formação de células B e manutenção da latência ao vírus Epstein-Barr (GRUFFAT; MANET; SERGEANT, 2002; WILKER et al., 2008). Nossos resultados não fornecem indícios das implicações do aumento da expressão de *MEF2A* em SGB, tendo em vista que não há relatos que apontem o papel que esse fator pode desempenhar em células sanguíneas, embora existam relatos para outros membros da sua família proteica.

SIGLEC1 é membro da superfamília de imunoglobulinas, tratando-se de uma proteína do tipo lectina- ligante a glicoconjugados de superfície contendo ácido silílico (ZHENG et al., 2015). É um receptor central de apresentação de antígenos em modelo de SGB induzido por *Campylobacter jejuni* em camundongos (MALIK et al., 2015). EAKIN e colaboradores (2016) descreveram o potencial de *SIGLEC1* e *2* como potenciais biomarcadores em doenças autoimunes, tendo em vista as flutuações em vias de glicosilação, podendo demonstrar características clínicas de remissão ou recuperação. Aumento da expressão desse gene nos casos do subtipo Axonal e Miller-Fisher, corroboram com os vistos em modelos de camundongos. Ainda é

possível que esse gene ou proteína represente um provável alvo-terapêutico biomarcador de progressão destes subtipos em SGB.

Foi também possível a observação da expressão diferencial em dois outros genes codificantes de lectinas do tipo C, são eles: *CLEC1B* e *CLEC4E*. Tendo em vista as funções desempenhadas por CLR's no sistema inato e conseqüentemente na resposta adaptada gerada, tais moléculas têm despertado interesse como alvos terapêuticos (GEIJTENBEEK; GRINGHUIS, 2009). O bloqueio ou a geração de antagonistas tem demonstrado resultados positivos na redução da mortalidade de camundongos em quadro de dengue hemorrágica (CHEN et al., 2008). Relatos correlacionam nocaute ou produção aberrantes de tais proteínas com o surgimento de doenças autoimunes como LES e AR (GEIJTENBEEK; GRINGHUIS, 2009). Também há descrições de desordens de cunho alérgico (DAMBUZA; BROWN, 2015). Esse quadro apresenta e justifica a procura de fármacos com base no bloqueio em CLR's e *Siglecs*, que podem vir a diminuir a intensidade da resposta imunológica, ajudando na recuperação de pacientes acometidos por SGB.

*IGLV1-40*, *IGHG3*, *IGLV7-43*, *IGLV2-30*, *IGLV1-51*, *IGLC2* e *IGLC3* também foram genes identificados diferencialmente expressos na análise em grupo e por subtipo, todos com expressões positivas. São genes codificantes de imunoglobulinas (Ig), conhecidas como anticorpos produzidas por células B, podem estar associadas a membrana da célula ou secretadas (FOREMAN et al., 2007). A diversidade de anticorpos é conseguida por dois mecanismos: 1. Recombinação entre as regiões variáveis (V), diversidade (D) e junção (J) nos estágios iniciais de desenvolvimento na medula óssea; 2. Hipermutação somática de genes Ig funcionais de células B ativadas por antígenos, juntamente a órgãos linfoides (MEFFRE; WARDEMANN, 2008). Esses processos podem dar origem a clones que expressam/produzem autoanticorpos, gerando a autoimunidade caso os processos de checagem de clones falhem (MEFFRE; WARDEMANN, 2008; MELCHERS, 2015; MALKIEL et al., 2016).

A tolerância de células B é regulada em estágios de células imaturas pela deleção de clones, envolvendo apoptose e edição de receptores (NEMAZEE, 2017). A presença de autoanticorpos IgG já é reconhecida para SGB e base para o tratamento atual. Além de representar 80% da população de imunoglobulinas. Deste modo o aumento da expressão de genes relacionados a sua síntese nos transcriptomas analisados já era esperada. Mecanismos que levam a produção de

autoanticorpos em SGB ainda não são completamente entendidos, principalmente do mecanismo envolvendo células B e T que levam a autoimunidade.

Os fatores genéticos que levam a uma pré-disposição a SGB, bem como os mecanismos que culminam em danos aos nervos periféricos, continuam sendo um desafio nessa doença autoimune. Alguns trabalhos associaram polimorfismos em genes que codificam Receptores para a porção IgG a uma possível pré-disposição à SGB (DOURADO JUNIOR, 2015). Contudo, esses achados são controversos, muito embora se tenha resultados que correlacionam a presença do domínio Fc $\gamma$ RIII em macrófagos a danos nos nervos periféricos (SUSUKI et al., 2003; ZHANG et al., 2014). FcRs compõem família de receptores glicoproteicos, presentes em todas as células do sistema imune e são classificados com base na especificidade de ligação determinada pela porção gamma:  $\gamma$ RI - ligantes a monômeros de IgG com alta afinidade,  $\gamma$ RII e  $\gamma$ RIII, ambos com baixa afinidade de ligação imunocomplexos de IgG (FRIDMAN, 1991). Participam de vias para a regulação do sistema imune pelo ajuste da concentração de anticorpos, iniciação da citotoxicidade e envolvimento com respostas de hipersensibilidade (DAVIS et al., 2002).

No presente estudo, foi possível a observação do aumento de expressão de FcRs em casos Axonais e Desmielinizantes: FCRLA, FCGR1G e FCGR2A. Essas proteínas podem estar relacionadas a progressão de SGB. Baranov e colaboradores (2012) demonstraram níveis de expressão elevados de *FCRL1* em células B no sangue periférico de pacientes com Esclerose múltipla, arterite de Takayasu e doença von Willebrand. Aumento da expressão desses genes podem estar relacionados a progressão de SGB, provavelmente em mecanismos de ajuste da concentração de anticorpos tendo em vista a concentração de IgG no sangue periférico.

Em meio a esse cenário alguns trabalhos recentes demonstraram relação de SGB com os receptores *PAMPs*. Na busca de evidências que pudessem nortear os fatores/vias ligadas patogenicidade de SGB, Du e colaboradores (2015) realizaram comparação de expressão de mRNAs entre células monoclonais do sangue periférico de pacientes com SGB frente a grupo controle. Os autores relataram aumentos da expressão de TLR2, TLR4, MyD88 e NF- $\kappa$ B, o que fornece indícios da participação de receptores *Toll-like* em SGB. Huizinga e colaboradores (2015) relataram que uma forte resposta advinda de TLR4 pode ser crítica para o desencadeamento de SGB após

infecção por *C. jejuni*, além de também terem observado aumento na expressão de células CD38 e CD40.

Esses achados correlacionam SGB a receptores de *Toll-like*, já vistos como tendo expressões alteradas para outras autoimunes. Podem contribuir ou estar relacionados ao desequilíbrio entre sistema imune inato e sistema imune adaptativo atrelado a SGB. Além disso, podem representar fonte de dados para criação de terapias que sejam mais efetivas ou possam ser associadas as já existentes, assim reduzindo o tempo de recuperação ou mesmos possíveis sequelas em detrimento ao tempo.

Os genes e suas vias associadas permitiram a anotação das principais respostas que podem estar relacionadas a fase aguda da doença e que levam a recuperação. Como visto, são poucos os dados na literatura com estudos transcriptômicos. Esses resultados representam ponto de partida para um melhor entendimento de SGB, busca por alvos terapêuticos que possam ser associados aos tratamentos clássicos dessa síndrome, podendo diminuir a janela entre a fase aguda e de recuperação, principalmente para os casos de alto risco.

## **7.2 Proposição de modelo com os genes biomarcadores em SGB e alvos-terapêuticos.**

Com base nos resultados transcriptômicos e as funções relacionadas aos genes com maiores variações entre os pacientes, foi possível a proposição de um modelo com os principais genes que acreditamos estarem envolvidos com a fase aguda e possível recuperação em SGB. Através da ativação da resposta inflamatória, as células do sistema imune inato e citocinas para polimerização, promovem a diferenciação de células CD4 T naïve em T helper (Th). Th17 são células proeminentes em vias de desenvolvimento de doenças autoimunes (HERNANDEZ et al., 2015).

A formação de células B responsivas ao agente infeccioso requer interação com células Th foliculares nos centros germinais (SHINNAKASU et al., 2016). Os centros germinais são estruturas transitórias que se formam em torno de redes células dendríticas foliculares localizadas nos órgãos linfóides após 4 a 7 dias, devido a chegada de células T dependentes de antígeno (KRAUTLER et al., 2017). A via de

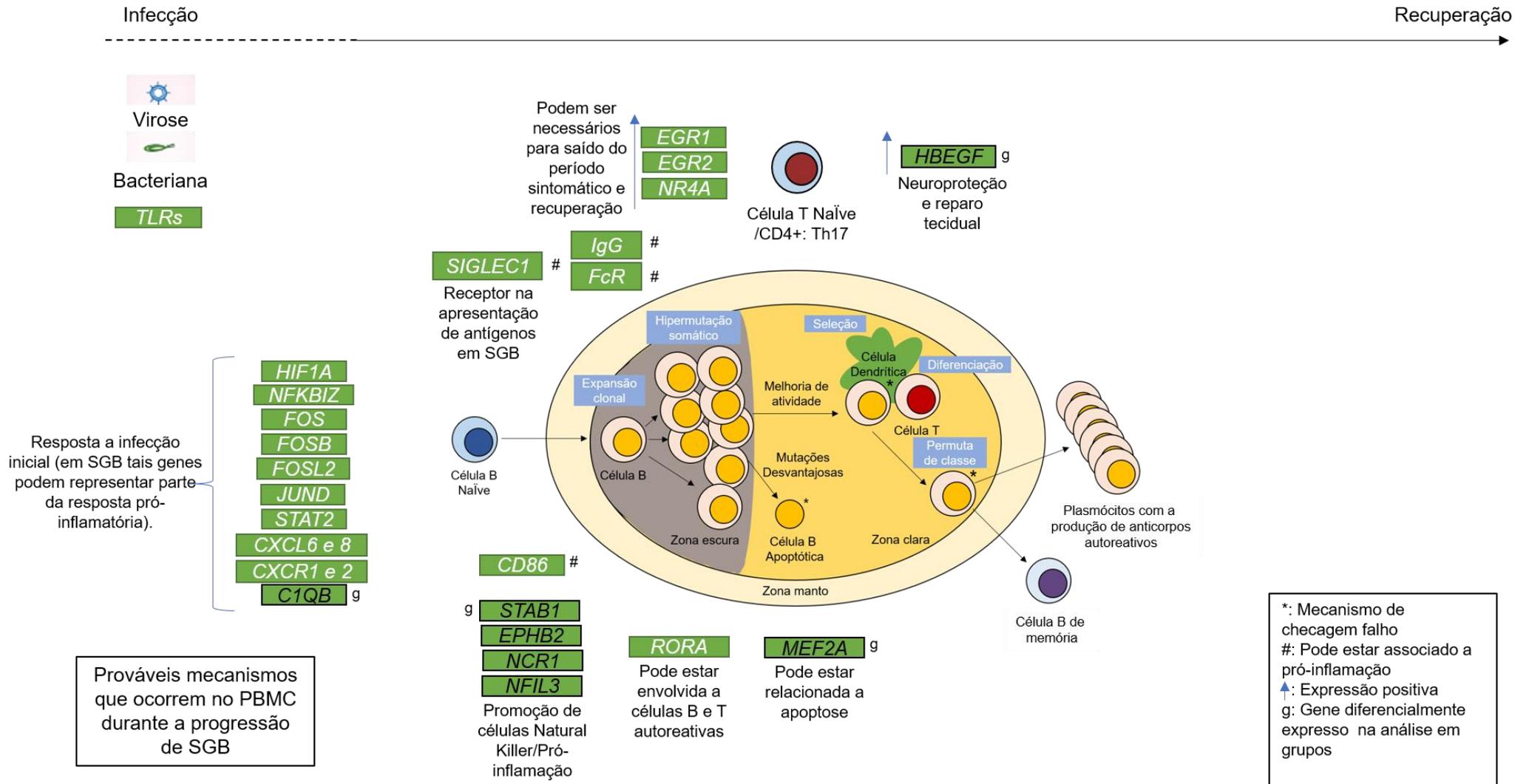
sinalização utilizando STAT1 em células B é central para a formação de centros germinais espontâneos e com a autoimunidade (DOMEIER et al., 2016). A seleção do antígeno-específico de células B ocorre pelo processo de hipermutação somática, sua diferenciação em células B secretoras é restrita a antígenos específicos. Os detalhes desse processo ainda são pouco entendidos. Em doenças autoimunes, a formação de células B autoreativas se dá por deficiências durante o processo de hipermutação somática, que em condições normais levariam a apoptose celular.

Tendo em vista os resultados observados, propomos um modelo que pode representar os genes e mecanismos associados que podem estar ocorrendo durante o curso de SGB nos casos avaliados (FIGURA 19). Acreditamos que os principais moduladores pró-inflamatórios persistentes sejam FOS, FOSB, FOSL2, JUND, CXCL6 e 8, CXCR1 e 2. Membros de STAT podem estar relacionados a formação de células do sistema imune adaptativo, pela promoção da formação de centros germinais e estarem relacionados a formação de células B autoreativas. Receptores pertencentes a família *Toll-like* devem participar das respostas inatas iniciais, dependendo do agente infecciosos. *SIGLEC1*, os genes codificantes de cadeias de IgG e FcR são os principais representantes da resposta imune adaptativa, todos já descritos como participantes na progressão de SGB em humanos ou em modelos em animais de SGB. *SIGLEC1* apresenta potencial alvo-terapêutico via seu bloqueio.

Como moduladores positivos anti-inflamatórios e de recuperação, destacamos *EGR1* e 2, *NR4A1* e *HBEGF*. *EGR2* pode representar ponto de modulação da resposta imunológica que leva a recuperação, podendo mediar o controle de células T autoreativas. *HBEGF* pode participar de mecanismo de reparo de tecido alvo da inflamação.

Por fim, nossos resultados para *EGR2*, junto aos propostos pelo grupo espanhol, corroboram para que o mesmo possa ser utilizado como biomarcador de recuperação. Adicionalmente, indicamos *ERG1* também com esse potencial. Esses fatores de transcrição junto ao *HBEGF* podem representar pontos importantes na modulação da resposta imune, assim sugerimos como genes-alvo para estudos futuros que busquem alvos terapêuticos.

Figura 19. Principais genes e possíveis mecanismos que podem estar envolvidos durante a progressão de SGB. Construído com base nas funções desempenhadas pelos genes.



Fonte: Elaborado pelo autor. Modificado de Wikimedia/Wikipedia.

## 8 CONCLUSÃO

SGB é uma doença autoimune com mecanismos moleculares ainda pouco entendidos. Os estudos transcriptômicos com modelos focados em PBMC representam fontes importantes de dados para o entendimento da progressão de SGB, mapeamento de genes e fatores de transcrição proeminentes durante a resposta na fase sintomática, além de indicar possíveis biomarcadores. As respostas vistas permitiram a observação de vias que podem estar associadas a inflamação e resposta imunológica persistentes. *EGR1* e *2*, *HBEGF* e *SIGLEC1* surgem como candidatos a estudos que busquem por alvos-terapêuticos e biomarcadores, permitindo que no futuro sejam associados ao tratamento tradicional em SGB, principalmente em casos com fatores de risco atrelados, afim de se evitar sequelas ou óbito. *TLRs* podem representar receptores inatos importantes para a progressão de SGB, resultados recentes juntamente aos vistos no presente estudo aumentam a discussão sobre a participação dos mesmos nessa síndrome. Estudo mais aprofundados com os genes indicados são requeridos, mas a demonstração das respostas no presente trabalho vai permitir um delineamento experimental mais focado as respostas buscadas, além de indicar candidatos a biomarcadores e possíveis alvos terapêuticos.

## REFERÊNCIAS

- AKAMA-GARREN, E.; SWANSON, C.; ROBINSON, W. H. Epidermal Growth Factor Receptor Inhibition Treats Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **MURJ Reports**, San Francisco, v.22, p.20-27, 2012.
- ANDERS, S.; Pyl, P. T.; Huber, W. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 31, p. 166-169, 2014.
- ANTICO, A.; et al. Can supplementation with vitamin D reduce the risk or modify the course of autoimmune diseases? A systematic review of the literature. **Autoimmunity Reviews**, Amsterdam, v. 12, p. 127-136, 2012.
- ASTHANA, P.; et al. Dissecting the Role of Anti-ganglioside Antibodies in Guillain-Barré Syndrome: an Animal Model Approach. **Mol Neurobiol**, San Francisco, v. 53, p. 4981-4991, 2016.
- AZZOUZ, D. F.; et al. Anti-Ephrin Type-B Receptor 2 (EphB2) and Anti-Three Prime Histone mRNA EXonuclease 1 (THEX1) Autoantibodies in Scleroderma and Lupus. **PlosONE**, San Francisco, p.1-19, 2016.
- BARANOV, K. O.; et al. Expression of Human B-Cell Specific Receptor FCRL1 in Healthy Individuals and in Patients with Autoimmune Diseases. **Molecular Biology**, Braranov, v.46, p.450-457, 2012.
- BHARGAVA, P.; Calabresi, P. A. Novel therapies for memory cells in autoimmune diseases. **Clinical & Experimental Immunology**, London, v. 180, p. 353-360, 2014.
- BLANCO, P.; Palucka, A. K.; Pascual, V.; Banchereau, J. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, Port St. Lucie, v. 19, p. 41-52, 2008.
- BOONTANRART, M.; et al. Vitamin D3 alters microglia immune activation by an IL-10 dependent SOCS3 mechanism. **Journal of Neuroimmunology**, Columbus, v.292, p.216-136, 2016.
- BUTLER, N. S.; SCHMIDT, N. W. EphB2 Receptor Tyrosine Kinase: A Novel Regulator of Infection- and Inflammation-induced Liver Fibrosis. **Hepatology**, New York, v.62, p.680-683, 2016.
- CAMPOS, G. S.; Bandeira, A. C.; Sardi, S. I. Zica virus outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Scandinavian, v. 21, p. 1885-1886, 2015.
- CARNEIRO, L. A. M.; et al. Nod-like proteins in inflammation and disease. **Journal of Pathology**, New York, v. 214, p. 136-148, 2008.
- CASTRO, M. A. A.; et al. RedeR: R/Bioconductor package for representing modular structures, nested networks and multiple levels of hierarchical associations. **Genome Biology**, London, v. 13, p. 11, 2012.
- CHANG, K. H.; et al. Identification of Gene Networks and Pathways Associated with Guillain-Barré Syndrome. **PlosOne**, San Francisco, v.7, 2012.

- CHEN, S. T.; et al. CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease. **Nature**, New York, v. 453, p. 672–676, 2008.
- CHI, V.; et al. Development of a sea anemone toxin as an immunomodulator for therapy of autoimmune diseases. **Toxicon**, San Francisco, v. 59, p. 529-546, 2012.
- CHOI, B-O.; et al. Mutational Analysis of *PMP22*, *MPZ*, *GJB1*, *EGR2* and *NEFL* in Korean Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Patients. **Human Mutation**, London, v.24, n.2, p.185-186, 2004.
- CHOI, J.; et al. Chemokine and chemokine receptors in autoimmunity: the case of primary biliary cholangitis. **Expert Review of Clinical Immunology**, London, v.12, 2016.
- CONESA, A.; et al. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. **Genome Biology**, London, v.17, p.1-19, 2016.
- CUTOLO, M.; et al. Vitamin D, steroid hormones, and autoimmunity. **Annals of New York Academy of Sciences**, New York, v. 1317, p. 36-46, 2014.
- DALMAU, J.; GEIS, C.; GRAUS, F. Autoantibodies to synaptic receptors and neuronal cell surface proteins in autoimmune diseases of the central nervous system. **Physiol Rev**, New York, v.97, p.839-887, 2017.
- DAMBUZA, I. M.; Brown G. D. C-type lectins in immunity: recent developments. **Current Opinion in Immunology**, San Francisco, v. 35, p. 21-27, 2015.
- DAVIS, R. S.; et al. Fc receptors and immunoglobulin binding factors. **International Immunology**, Oxford, v.14, p.1075-1083, 2002.
- DE FEO, D.; et al. Neural precursor cell–secreted TGF- $\beta$ 2 redirects inflammatory monocyte-derived cells in CNS autoimmunity. **The Journal of Clinical Investigation**, San Francisco, v.127, n.11, p.3937-3953, 2017.
- DOMEIERS, P. P.; et al. IFN- $\gamma$  receptor and STAT1 signaling in B cells are central to spontaneous germinal center formation and autoimmunity. **JEM The Journal of Experimental Medicine**, New York, v.213, n.5, 715-733, 2016.
- DONCEL-PÉREZ, E.; et al. Expression of Early Growth Response Gene-2 and Regulated Cytokines Correlates with Recovery from Guillain–Barré Syndrome. **The Journal of Immunology**, New York, v.196, n.3, p.1102-1107, 2016.
- DONCEL-PÉREZ, E.; et al. Expression of early Growth Response gene-2 and regulated cytokines correlates with recovery from Guillain-Barré Syndrome. **J Immunol**, New York, v. 196, p. 1102-1107, 2016.
- DOURADO JÚNIOR, M. E. T. Síndrome de Guillain-Barré: epidemiologia, prognóstico e fatores de risco. 2015. 90f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.
- DRANOFF, G. Cytokines in Cancer Pathogenesis and Cancer Therapy. **Nature Reviews**, New York, v. 4, p. 11-23, 2004.

DU, C.; et al. MicroRNA miR-326 regulates Th-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. **Nature Immunology**, New York, v 10, p. 1252-1262, 2009.

DU, Y.; et al. Toll-like receptor 2 and 4 are involved in the pathogenesis of Guillain-Barré syndrome. **Molecular Medicine Reports**, London, v. 12, p. 3207-3213, 2015.

DUHLIN, A.; et al. Scavenger receptor CD36 on B cells senses modified self-antigens to prevent autoimmunity. **The Journal of Immunology**, New York, v.198, p.211-215, 2017.

DZHAGALOV, I.; GIGUERE, V.; HE, Y.W.; Lymphocyte development and function in the absence of retinoic acid-related orphan receptor alpha. **J. Immunol.**, New York, v.173, n.5, p.2952–2959, 2004.

EAKIN, A. J.; et al. Siglec-1 and -2 as potential biomarkers in autoimmune disease. **Proteomics Clinical Applications**, New York, v.10, p.635-644, 2016.

EFTEKHARIAN, M.M.; et al. RAR-related orphan receptor A (RORA): A new susceptibility gene for multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**, San Francisco, v.369, p.259-262, 2016.

EWING, B.; Green, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome research**, Cold Spring Harbor v. 8. 186-194, 1998.

FAN, H.; HEGDE, P. S. The Transcriptome in Blood: Challenges and Solutions for Robust Expression Profiling. **Current Molecular Medicine**, Guangzhou, v.5, n.1, p.3-10, 2005.

FARH, K. K. H.; et al. Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants. **Nature**, New York, v. 518, p. 337-358, 2015.

FEJES, A. P.; et al. Human variation database: an open source database template for genomic discovery. **Bioinformatics**, Oxford, v. 27, n. 8, p. 1155T6, 2011.

FOREMAN, A. L.; et al. B cells in autoimmune diseases: Insights from analyses of immunoglobulin variable (Ig V) gene usage. **Autoimmunity Reviews**, San Francisco, v.6, p.387-401, 2007.

FRIDMAN, W. H. Fc receptors and immunoglobulin binding factors. **FASEB J.**, Rockville Pike, v.12, p.2684-2690, 1991.

FUKATA, M.; et al. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. **Seminars in Immunology**, San Francisco, v. 21, p.242-253, 2009.

FURER, V.; et al. The role of microRNA in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. **Clinical Immunology**, San Francisco, v. 136, p. 1-15, 2010.

GABAY, C.; et al. Tocilizumab monotherapy versus adalimumab monotherapy for treatment of rheumatoid arthritis (ADACTA): a randomised, double-blind, controlled phase 4 trial. **The Lancet**, San Francisco, v. 381, p. 1541-1551, 2013.

GEIGER, T. L.; et al. Nfil3 is crucial for development of innate lymphoid cells and host protection against intestinal pathogens. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v.211, p.1723-1731, 2014.

- GEIJTENBEEK, T. B. H.; Gringhuis, S. I. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. **Nature Reviews**, New York, v. 9, p. 465-480, 2009.
- GHADERI, S.; et al. Risk of Guillain-Barre´ syndrome after exposure to pandemic influenza A (H1N1) pdm09 vaccination or infection: a Norwegian population-based cohort study. **Eur J Epidemiol**, London, v. 31, p. 67-72, 2015.
- GILLIET, M.; CAO, W.; LIU, Y. J. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. **Nature Reviews**, New York, v. 8, p. 594-607, 2008.
- GOLL, J.; et al. METAREP: JCVI metagenomics reports open source tool for high performance comparative metagenomics. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26, n. 20, p. 2631T2, 2010.
- GREAVES, D. R., GORDON, S. The macrophage scavenger receptor at 30 years of age: current knowledge and future challenges. **Journal of Lipid Research**, New York, v.50, p.282-286, 2009.
- GRUFFAT, H.; MANET, E.; SERGEANT, A. MEF2-mediated recruitment of class II HDAC at the EBV immediate early gene BZLF1 links latency and chromatin remodeling. **EMBO reports**, Berlin, v.3, p.141–146, 2002.
- GUILAIN, J. B. G.; STROHL, A. Surin syndrome de radiculo-nevrite avec hyperalbuminose du liquide cephalo-rachidien sans reaction cellulaire. Remarques sur les caracteres clinique et graphique des reflexes tendinaux. **Bulletins et Memories de la Societe Medicale des Hopitaux de Paris**, Paris, vol. 40, p. 1462–1470, 1916.
- HAASKEN, S.; et al. Macrophage Scavenger Receptor 1 (Msr1, SR-A) Influences B Cell Autoimmunity by Regulating Soluble Autoantigen Concentration. **The Journal of Immunology**, New York, v.191, p.1055-1062, 2013.
- HABJAN, M.; et al. Processing of genome 5' termini as a strategy of negative-strand RNA viruses to avoid RIG-I-dependent interferon induction. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 3, p 1-8, 2008.
- HAN, L.; et al. A monoclonal antibody against CD86 and its protection in a murine lupus nephritis model of chronic graft-versus-host disease. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, London, v.39, p.285-291, 2017.
- HANDEL, A. E.; et al. Vitamin D receptor ChIP-seq in primary CD4+ cells: relationship to serum 25-hydroxyvitamin D levels and autoimmune disease. **BMC Medicine**, London, v. 11, p. 163-174, 2013.
- HERNANDEZ, J. B. The CREB/CRTC2 pathway modulates autoimmune disease by promoting Th17 differentiation. **Nature Communications**, New York, v.6, p.1-9, 2015.
- HOFFMANN, F. S.; et al. Fingolimod induces neuroprotective factors in human astrocytes. **Journal of Neuroinflammation**, London, v.12, p.184-197, 2015.
- HOVING, J. C.; Wilson, G. J.; Brown, G. D. Signalling C-Type lectin receptors, microbial recognition and immunity. **Cellular Microbiology**, New York, v. 16, p. 185-194, 2014.

HUDSPETH, K.; SILVA-SANTOS, B.; MAVILIO, D. Natural cytotoxicity receptors: broader expression patterns and functions in innate and adaptive immune cells. **Frontiers in Immunology**, New York, v.4, p.1-15, 2013.

HUIZINGA, R.; et al. Innate Immunity to *Campylobacter jejuni* in Guillain-Barré Syndrome. **American Neurological Association**, New York, v. 78, p. 343-354, 2015.

INÊS, L.; et al. Classification of Systemic Lupus Erythematosus: Systemic Lupus International Collaborating Clinics versus American college of rheumatology criteria. A comparative study of 2,055 patients from a real-life, international systemic lupus erythematosus cohort. **Arthritis Care & Research**, London, v. 67, p. 1180-1185, 2015.

IQBAL, S.; et al. Relationship between Guillain–Barré syndrome, influenza-related hospitalizations, and influenza vaccine coverage. **Vaccine**, San Francisco, v. 33, p. 2045-2049, 2015.

IWASAKE, A.; Medzhitov, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nature Immunology**, New York, v. 16, p. 343-354, 2015.

IWASAKI, A.; Medzhitov, R. Regulation of Adaptive Immunity by the Innate Immune System. **Science**, Pensilvânia, v. 327, p. 291-295, 2010.

JACOBS, B. C.; et al. International Guillain-Barré Syndrome Outcome Study: protocol of a prospective observational cohort study on clinical and biological predictors of disease course and outcome in Guillain-Barré syndrome. **Journal of the Peripheral Nervous System**, New York, v. 22, p. 68-76, 2017.

JETTEN, A.M. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. **Nucl. Recept. Signal.**, London, v.7, 2009.

JIMÉNEZ-DALMARONI, M.J.; GERSWHIN, M.E.; ADAMOPOULOS, I.E. The critical role of toll-like receptors From microbial recognition to autoimmunity: A comprehensive review. **Autoimmunity Reviews**, San Francisco, v.15, p.1-8, 2016.

JIN, K.; et al. Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-Like Growth Factor: Hypoxia Inducible Expression *In Vitro* and Stimulation of Neurogenesis *In Vitro* and *In Vivo*. **Journal of Neuroscience**, New York, v.22, n.13, p.5365-5373, 2002.

JUTEL, M., et al. Immune regulation by histamine. **Current Opinion in Immunology**, San Francisco, v.14, p.735-740, 2002.

KAMIZONO, S.; et al. Nfil3/E4bp4 is required for the development and maturation of NK cells in vivo. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v.206, p.2977-2986, 2009.

KARIKOSKI, M.; et al. Clever-1/Stabilin-1 regulates lymphocyte migration within lymphatics and leukocyte entrance to sites of inflammation. **European Journal of Immunology**, Berlin, v.39, p.3477-3487, 2009.

KASHIWADA, M.; et al. NFIL3/E4BP4 is a key transcription factor for CD8 $\alpha^+$  dendritic cell development. **Immunobiology**, San Francisco, v.117, p.6193-6199, 2011.

KATO, H.; et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. **Nature**, New York, v. 441, p. 101-105, 2006.

- KATO, H.; Fujita, T. RIG-I-like receptors and autoimmune diseases. **Current Opinion in Immunology**, San Francisco, v. 37, p. 40-45, 2015.
- KOBAYASHI, K. S.; et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. **Science**, Pensilvânia, v. 307, p. 731-734, 2005.
- KOBAYASHI, T.; et al. NFIL3 is a regulator of IL-12 p40 in Macrophages and Mucosal Immunity. **The Journal of Immunology**, New York, v.186, p.4649-4655, 2011.
- KOCH, J.; et al. Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in câncer and infection. **Trends in Immunology**, New York, v.34, p.182-192, 2013.
- KOGA, M.; et al. Ambiguous value of anti-ganglioside IgM autoantibodies in Guillain-Barré syndrome and its variants. **J Neurol.**, Berna, v. 262, p. 1954-1960, 2015.
- KROLL, K. W.; et al. Quality Control for RNA-Seq (QuaCRS): An Integrated Quality Control Pipeline. **Cancer informatics**, London, v. 13, p.7-14, 2014.
- KUHN, M.; et al. STITCH: integration of protein-chemical interactions with user data. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 42, p. 401-407, 2013.
- LAI, K-O; IP, N. Y. Central synapse and neuromuscular junction: same players, different roles. **Trends in Genetics**, San Francisco, v.19, p.395-403, 2003.
- LANGMEAD, B.; et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. **Genome biology**, London, v. 10, p. 10, 2009.
- LEBRUN, G.; et al. Guillain–Barre syndrome after chikungunya infection. **Emerg Infect Dis.**, New York, v. 15, p. 495-496, 2009.
- LI, Q. X.; et al. NR4A1, 2, 3--an orphan nuclear hormone receptor family involved in cell apoptosis and carcinogenesis. **Histology and Histopathology**, Murcia, v. 21, n. 5, p.533-540, 2006.
- LI, Y.; et al. GATA2 is critical for mast cell differentiation and maintenance. **The Journal of Immunology**, New York, v.196, p.202-204, 2016.
- LI, Y.; et al. *TRAV* and *TRBV* repertoire, clonality and the proliferative history of umbilical cord blood T-cells. **Transplant Immunology**, San Francisco, v.18, p.151-158, 2007.
- LINTNER, K. E.; et al. Early Components of the Complement Classical Activation Pathway in Human Systemic Autoimmune Diseases. **Frontiers in Immunology**, New York, v.7, p.1-22, 2016.
- LIU, R.; et al. Why weight? Modelling sample and observational level variability improves power in RNA-seq analyses. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 43, p.97-108, 2015.
- LOLY, J. P.; et al. Guillain–Barre syndrome following hepatitis E. **World J Gastroenterol**, Pequín, v. 15, p. 1645-1647, 2009.
- LOO, Y. M.; et al. Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. **J. Virol.**, San Diego, v. 82, p. 335-345, 2008.
- LOO, Y. M.; Gale, M. Jr. Immune signaling by RIG-I-like receptors. **Immunity**, New York, v. 34, p. 680-692, 2011.

- LUBBERTS, E. Role of T Lymphocytes in the Development of Rheumatoid Arthritis. Implications for Treatment. **Current Pharmaceutical Design**, New York, v. 21, p. 142-146, 2015.
- LUI, Y. U.; Yin, H.; Zhao, M.; Lu, Q. TLR2 and TLR4 in Autoimmune Diseases: a Comprehensive Review. **Clinic Rev Allerg Immunol**, Berna, v. 47, p.136-147, 2014.
- MA, Y.; et al. Applications of Next-generation Sequencing in Systemic Autoimmune Diseases. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, San Francisco, v. 13, p. 242–249, 2015.
- MAJOROS, A.; et al. Response to interferons and antibacterial innate immunity in the absence of tyrosine-phosphorylated STAT1. **EMBO reports**, Berlin, v.17, p. 367-382, 2016.
- MALIK, A.; et al. *Campylobacter jejuni* induces autoimmune peripheral neuropathy via Siglec-1 and IL-4 axes (MUC5P.746). **The Journal of Immunology**, New York, v.194, p.138-142, 2015.
- MALKIEL, S.; et al. Checkpoints for Autoreactive B Cells in the Peripheral Blood of Lupus Patients Assessed by Flow Cytometry. **Arthritis & Rheumatology**, New York, v.68, p.2210-2220, 2016.
- MARRACK, P.; KAPPLER, J.; KOTZIN, B. L. Autoimmune disease: why and where it occurs. **Nature Medicine**, New York, v.7, p.899-905, 2001.
- MARTINET, L.; SMYTH, M. J.; Balancing natural killer cell activation through paired receptors. **Nature Reviews Immunology**, New York, v.15, p.243-255, 2015.
- MCCARVILLE, J. L.; AYRES, J. S. Disease tolerance: concept and mechanisms. **Current Opinion in Immunology**, San Francisco, v. 50, p. 88-93, 2018.
- MCCORMACK, W. J.; et al. Toll-like receptors and NOD-like receptors in rheumatic diseases. **Arthritis Research & Therapy**, London, v. 11, p. 243- 250, 2009.
- MCGROGAN, A.; et al. The epidemiology of Guillain-Barré syndrome worldwide. A systematic literature review. **Neuroepidemiology**, Berlin, v. 32, p. 150-163, 2009.
- MEFFRE, E.; WARDEMANN, H. B-cell tolerance checkpoints in health and autoimmunity. **Current Opinion in Immunology**, San Francisco, v.20, p.632-638, 2008.
- MELCHERS, F. Checkpoints that control B cell development. **The Journal of Clinical Investigation**, New York, v.125, p.2203-2210, 2015.
- MERLE, N. S.; et al. Complement system part II: role in immunity. **Frontiers in Immunology**, New York, v.6, p.1-26, 2015.
- MIAO, T.; et al. Egr2 and 3 control adaptive immune responses by temporally uncoupling expansion from T cell differentiation. **J. Exp. Med.**, New York, v.214, n.6, p.1787-1808, 2017.
- MOEPPS, B. Capitulo: CXCR1 and CXCR2 and Ligants. Livro: Compendium of Inflammatory Diseases. 2017. Springer, Basel.
- MOHAN, N.; et al. Demyelination Occurring During Anti-Tumor Necrosis Factor alfa Therapy for Inflammatory Arthritides. **Arthritis & Rheumatism**, New York, v. 44, p. 2862-2869, 2001.

MORETTA, A.; et al. Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. **Immunology Today**, San Francisco, v.21, p.228-235, 2000.

MORITA, K.; et al. Egr2 and Egr3 in regulatory T cells cooperatively control systemic autoimmunity through Ltbp3-mediated TGF- $\beta$ 3 production. **PNAS**, New York, v.30, p.8131-8140, 2016.

MORITA, K.; et al. Emerging roles of Egr2 and Egr3 in the control of systemic autoimmunity. **Rheumatology**, Oxford, v.55, p.76-81, 2016.

MOUSSOURAS, N. A.; et al. Differences in Sulfotyrosine Binding amongst CXCR1 and CXCR2 Chemokine Ligands. **International Journal of Molecular Sciences**, San Francisco, v.18, p.1894-1909, 2017.

NAKAZAWA, S.; et al. Histamine synthesis is required for granule maturation in murine mast cells. **European Journal of Immunology**, Berlin, v.44, p.204-214, 2014.

NAKHAEI, P.; et al. RIG-I-like receptors: sensing and responding to RNA virus infection. **Seminars in Immunology**, San Francisco, v. 21, p. 215-222, 2009.

NEMAZEE, D. Mechanisms of central tolerance for B cells. **Nature Reviews Immunology**, v.17, New York, p.281-295, 2017.

NIZET, V.; JOHNSON, R.S. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. **Nature Reviews Immunology**, New York, v. 9, p.609-618, 2009.

O'NEILL, L. A. J.; Bryant, C. E.; Doyle, S. L. Therapeutic targeting of Toll-like receptors for infectious and inflammatory diseases and cancer. **Pharmacol Rev**, New York, v. 61, p. 177-197, 2009.

OBEN, K. Z.; et al. Radiation Induced Apoptosis of Murine Bone Marrow Cells Is Independent of Early Growth Response 1 (EGR1). **PlosOne**, San Francisco, 2017.

O'CONNELL, R. M.; et al. MicroRNA-155 Promotes Autoimmune Inflammation by Enhancing Inflammatory T Cell Development. **Immunity**, New York, v. 33, p. 607-619, 2010.

O'CONNELL, R. M.; et al. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. **Nature Reviews**, New York, v. 10, p. 111- 122, 2010.

OKADA, Y.; et al. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. **Nature**, New York, v. 506, p. 376-381, 2014.

OKAMURA, T.; et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAG3<sup>+</sup> regulatory T cells controlled by the transcription factor Egr-2. **PNAS**, New York, v.106, n.33, 13974-13979, 2009.

OSORIO, F.; Sousa, C. R. Myeloid C-type Lectin Receptors in Pathogen Recognition and Host Defense. **Immunity**, New York, v. 27, p. 651-664, 2011.

OUYANG, J.; et al. NRAV, a Long Noncoding RNA, Modulates Antiviral Responses through Suppression of Interferon-Stimulated Gene Transcription. **Cell Host & Microbe**, New York, v.16, p.616-626, 2014.

- PAL, A. D.; Banerjee, S. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A mediated activation of sonic hedgehog pathway induces HLA class Ia downregulation in gastric cancer cells. **Virology**, San Francisco, v. 484, p. 22-32, 2015.
- PALANI, S.; et al. Monocyte Stabilin-1 Suppress the Activation of Th1 Lymphocytes. The **Journal of Immunology**, New York, v.196, p.115-123, 2015.
- PANG, B.; et al. Direct antigen presentation and gap junction mediated cross-presentation during apoptosis. **J. Immunol**, New York, v. 183, p. 1083-1090, 2009.
- PARK, S. Y.; et al. Stabilin-1 mediates phosphatidylserine-dependent clearance of cell corpses in alternatively activated macrophages. **Journal of Cell Science**, London, v.122, p.3365-3374, 2009.
- PATEL, S.; et al. Guillain-Barre Syndrome Associated with Acute Hepatitis A Infection. **American Journal of Clinical Neurology and Neurosurgery**, New York, v. 1, p. 10-12, 2015.
- PAZ, S.; et al. Induction of IRF-3 and IRF-7 phosphorylation following activation of the RIG-I pathway. **Cell. Mol. Biol**, New York, v. 52, p. 17-28, 2006.
- PETROLLO, M. G.; et al. GITR + regulatory T cells in the treatment of autoimmune diseases. **Autoimmunity Reviews**, Amsterdam v. 14, p. 117-126, 2015.
- PFAFF, D.; et al. Involvement of endothelial ephrin-B2 in adhesion and transmigration of EphB-receptor-expressing monocytes. **Journal of cell science**, London, v.121, p.3842-3847, 2008.
- POLITZ, O.; et al. Stabilin-1 and -2 constitute a novel Family of fasciclin-like hyaluronan receptor homologues. **Biochemical Journal**, Liverpool, v.362, p.155-164, 2002.
- PON, J.R.; MARRA, M.A. MEF2 transcription factors: developmental regulators and emerging cancer genes. **Oncotarget**, New York, v.7, n.3, p.2297-2312, 2016.
- PONS, L.; et al. A New Observation of an Atypical and Severe Variant of the Guillain-Barre Syndrome in a Child: Remaining Challenges for Diagnosis, Nosologic Classification, and Therapeutic Course. **Child Neurology Open**, San Francisco, p. 1-6, 2015.
- PUSCHMANN, T. B.; et al. HB-EGF affects astrocyte morphology, proliferation, differentiation, and the expression of intermediate filament proteins. **Journal of Neurochemistry**, London, v.128, p.878-889, 2014.
- RABINOVICH, G. A.; Croci, D. O. Regulatory Circuits Mediated by Lectin-Glycan Interactions in Autoimmunity and Cancer. **Immunity**, New York, v. 36, p. 322-335.
- RIESE, D. J.; CULLUM, R. L. Epiregulin: Roles in normal physiology and cancer. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, San Francisco, v.28, p.49-56, 2014.
- RITCHIE, M.E.; et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.43, n.7, 2015.
- RIUS, J.; et al. NF- $\kappa$ B links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1 $\alpha$ . **Nature Letters**, New York, v.453, p.807-813, 2008.

ROBINSON, M. D.; McCarthy, D. J.; Smyth, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26, p. 139-140, 2010.

ROELSE, J.; Gromme, M.; Momburg, F., Hammerling, G.; Neefjes, J. Trimming of TAP-translocated peptides in the endoplasmic reticulum and in the cytosol during recycling. **J. Exp. Med.**, New York, v. 180, p. 1591-1597, 1994.

SCHURCH, N. J.; et al. How many biological replicates are needed in an RNA-seq experiment and which differential expression tool should you use? **RNA**, Cold Spring Harbor, v. 22, p.839-851, 2016.

SAFFORD, M.; et al. Egr-2 and Egr-3 are negative regulators of T cell activation. **Nature Immunology**, New York, v.6, n.5, 2005.

SAHA, R.; CHOWDHURY, A.; MARANAS, C. D. Recent advances in the reconstruction of metabolic models and integration of omics data. **Current Opinion in Biotechnology**, San Francisco, v.29, p.39-45, 2014.

SAITO, T.; et al. Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, New York, v. 104, p. 582-587, 2007.

SAUTEUR, P. M. M.; et al. Severe childhood Guillain-Barré syndrome associated with Mycoplasma pneumoniae infection: a case series. **Journal of the Peripheral Nervous System**, London, v. 20, p. 72-78, 2015.

SEILLET, C.; et al. Differential Requirement for Nfil3 during NK Cell Development. **The Journal of Immunology**, New York, v.192, p.2667-2676, 2014.

SEILLET, C.; et al. Nfil3 is required for the development of all innate lymphoid cell subsets. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v.211, p.1733-1740, 2014.

SHANNON, P.; et al. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v.13, p.2498-2504, 2003.

SHAULIAN, E.; KARIN, M. AP-1 as a regulator of cell life and death. **Nat. Cell Biol.**, New York, v.984, p.131-136, 2002.

SHICHITA, T.; et al. MAFB prevents excessive inflammation after ischemic stroke by accelerating clearance of damage signals through MSR1. **Nature Medicine**, New York, v.23, p.723-735, 2017.

SHINNAKASU, R.; et al. Regulated selection of germinal-center cells into the memory B cell compartment. **Nature Immunology**, New York, v.17, p.861-869, 2016.

SINHA, A. A.; Lopez, M. T.; McDevitt, H. O. Autoimmune Diseases: The Failure of Self Tolerance. **Science**, Pensilvânia, v. 248, p. 1380-1386, 1990.

SMOLEN, J. S.; et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease modifying antirheumatic drugs: 2013 update. **Ann Rheum Dis**, London, v. 1, p. 1-18, 2013.

- SONG, F.; et al. The frontline of immune response in peripheral blood. **PlosOne**, San Francisco, v. 12, n. 8, p. 22, 2017.
- SPINNER, M. A.; et al. GATA2 deficiency: a protean disorder of hematopoiesis, lymphatics and immunity. **Blood**, New York, v.123, p.809-823.
- SUNDARAM, K.; et al. I $\kappa$ B $\zeta$  Regulates Human Monocyte Pro-Inflammatory Responses Induced by *Streptococcus pneumoniae*. **PlosOne**, San Francisco, v.11, n.9, 2016.
- SUSUKI, K.; et al. Acute motor axonal neuropathy rabbit model: immune attack on nerve root axons. **Ann Neurol**, New York, v. 54, p. 383-388, 2003.
- SZIGETI, K.; LUPSKI, J. R. Charcot-Marie-Tooth disease. **European Journal of Human Genetics**, London, v. 17, p. 703-710, 2009.
- SZKLARCZYK, D.; et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 43, p. 447-452, 2015.
- TAKEUCHI, M. T.; et al. Roles of retinoic acid-inducible gene-I-like receptors (RLRs), Toll-like receptor (TLR) 3 and 2 O<sup>-5</sup> O oligoadenylate synthetase as viral recognition receptors on human mast cells in response to viral infection. **Immunol Res**, London, v. 61, p. 240-249, 2015.
- TANABE, T.; et al. Sarcoidosis and NOD1 variation with impaired recognition of intracellular *Propionibacterium acnes*. **Biochim. Biophys. Acta**, San Francisco, v. 1762, p. 794–801, 2006.
- TANAKA, T.; et al. A new era for the treatment of inflammatory autoimmune diseases by interleukin-6 blockade strategy. **Seminars in Immunology**, San Francisco, v. 26, p. 88-96, 2014.
- TODD, C. M.; et al. The effects of a CXCR1/CXCR2 antagonist on neutrophil migration in mild atopic asthmatic subjects. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, San Francisco, v.41, p.34-39, 2016.
- TRAPNELL, C.; et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. **Nature protocols**, New York, v. 7, p. 562-578, 2012.
- TRAPNELL, C.; Pachter, L.; Salzberg, S. L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics**, Oxford, v. 25, p. 1105-1111, 2009.
- TU, C. X.; GU, J. S.; LIN, X. R. Increased interleukin-6 and granulocyte-macrophage colony stimulating factor levels in the sera of patients with nonsegmental vitiligo. **J. Dermatol. Sci.**, San Francisco, v. 31, p. 73-78, 2003.
- TUONG, Z. K.; et al., ROR alpha and 25-Hydroxycholesterol crosstalk regulates lipid droplet homeostasis in macrophages. **PLoSOne**, New York, v.11, n.1, 2016.
- UNCINI, A. 99 years of Guillain-Barré syndrome: pathophysiological insights from neurophysiology. **Pract. Neurol.**, London, v. 15, p. 88-89, 2015.
- VAN DOORN, P. A.; RUTS, L.; JACOBS, B. C. Clinical features, pathogenesis, and treatment of Guillain-Barre syndrome. **Lancet**, San Francisco, v. 7, p. 939-950, 2008.

VAN LIESHOUT, A. W. T.; et al. Enhanced interleukin-10 production by dendritic cells upon stimulation with Toll-like receptor 4 agonists in systemic sclerosis that is possibly implicated in CCL18 secretion. **Scand J Rheumatol**, London, v. 38, p. 282-290, 2009.

VARIKUTI, S.; et al. STAT4 is required for the generation of Th 1 and Th 2, but not Th 17 immune responses during monophosphoryl lipid A adjuvant activity. **International Immunology**, Oxford, v.28, p.565-570, 2016.

VARKI, A. Since there are PAMPs and DAMPs, there must be SAMPs? Glycan “self-associated molecular patterns” dampen innate immunity, but pathogens can mimic them. **Glycobiology**, Oxford, v. 21, p. 1121-1124, 2011.

VARZARI, A.; et al. Analysis of polymorphisms in RIG-I-like receptor genes in German multiple sclerosis patients. **J Neuroimmunol**, San Francisco, v. 277, p. 140-144, 2014.

VERITY, C.; et al. Pandemic A/H1N1 2009 influenza vaccination, preceding infections and clinical findings in UK children with Guillain–Barré syndrome. **Arch Dis Child**, New York, v. 99, p. 532-538, 2014.

VIGNESH, P.; et al. Complement in autoimmune diseases. **Clinica Chimica Acta**, San Francisco, v.465, p.123-130, 2017.

VOLLMER, J.; et al. Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. **J Exp Med**, New York, v. 202, p. 1575-1585, 2005.

WARNER, L. E.; et al. Functional consequences of mutations in the early growth response 2 gene (*EGR2*) correlate with severity of human myelinopathies. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v.8, n.7, p.1245-1251, 1999.

WEBB, A. J. S.; et al. Seasonal variation in Guillain-Barré syndrome: a systematic review, meta-analysis and Oxfordshire cohort study. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, London, p. 1-6, 2014.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. **Protocol: Protein Structure Prediction**, New York, v. 1137, p. 15, 2014.

WERTS, C.; Girardin, S. E.; Philpott, D. J. TIR, CARD and PYRIN: three domains for an antimicrobial triad. **Cell Death Different**, New York, v. 13, p. 798-815, 2006.

WIKIMEDIA. File: Germinal center.svg. Disponivel em: <  
[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Germinal\\_center.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Germinal_center.svg)>. New York, Acesso em:04 Nov. 2017.

WILKER, P.R.; et al. Transcription factor Mef2c is required for B cell proliferation and survival after antigen receptor stimulation. **Nature Immunology**, New York, v.9, p.603-612, 2008.

WILLISON, H.; Jacobs, B. C.; van Doorn, P. A. Guillain-Barré syndrome. **Seminar**, New York, v. 388, p. 717-727, 2016.

WINER, J. B. An Update in Guillain-Barré Syndrome. **Autoimmune Diseases**, New York, p.1-6, 2014.

WU, H.; SHEN, J. Focusing on caveolin-1 in CNS autoimmune disease: multiple sclerosis. **Neural Regeneration Research**, Pequin, v.11, n.12, 2016.

WYNNE, J. W.; et al. Comparative transcriptomics highlights the role of the AP1 transcription factor in the host response to Ebolavirus. **Journal of Virology**, San 2017.

XIAO, Z.; WU, W; POLTORATSKY, V. Metformin Suppresses LPS-induced CXCL8 Expression. **The Journal of Immunology**, New York, v.198, p.201-211. 2017.

XU, Y.; et al. Decreased expression levels of Nurr1 are associated with chronic inflammation in patients with type 2 diabetes. **Mol Med Rep.**, New York, v.12, n.4, 2015.

YAN, Z.; et al. Activation and infiltration of neutrophils in the cerebellum and brainstem is associated with the atypical experimental autoimmune encephalomyelitis phenotype. **The Journal of Immunology**, New York, v.196, p.188-197, 2016.

YANG, X.O.; et al., T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. **Immunity**, New York, v.28, n.1, p.29-39, 2008.

YAO, X.; et al. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers. **Pharmacology & Therapeutics**, San Francisco, v. 141, p. 125-139, 2014.

YONEYAMA, M.; et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. **Nat. Immunol.**, New York, v. 5, p. 730-737, 2004.

YUGI, K.; et al. Trans-Omics: How To Reconstruct Biochemical Networks Across Multiple 'Omic' Layers. **Trends in Biotechnology**, San Francisco, v.34, p.276-291, 2016.

ZAISS, D. M. W.; et al. Emerging Functions of Amphiregulin in Orchestrating Immunity, Inflammation, and Tissue Repair. **Immunity**, New York, v. 42, p. 216-227, 2015.

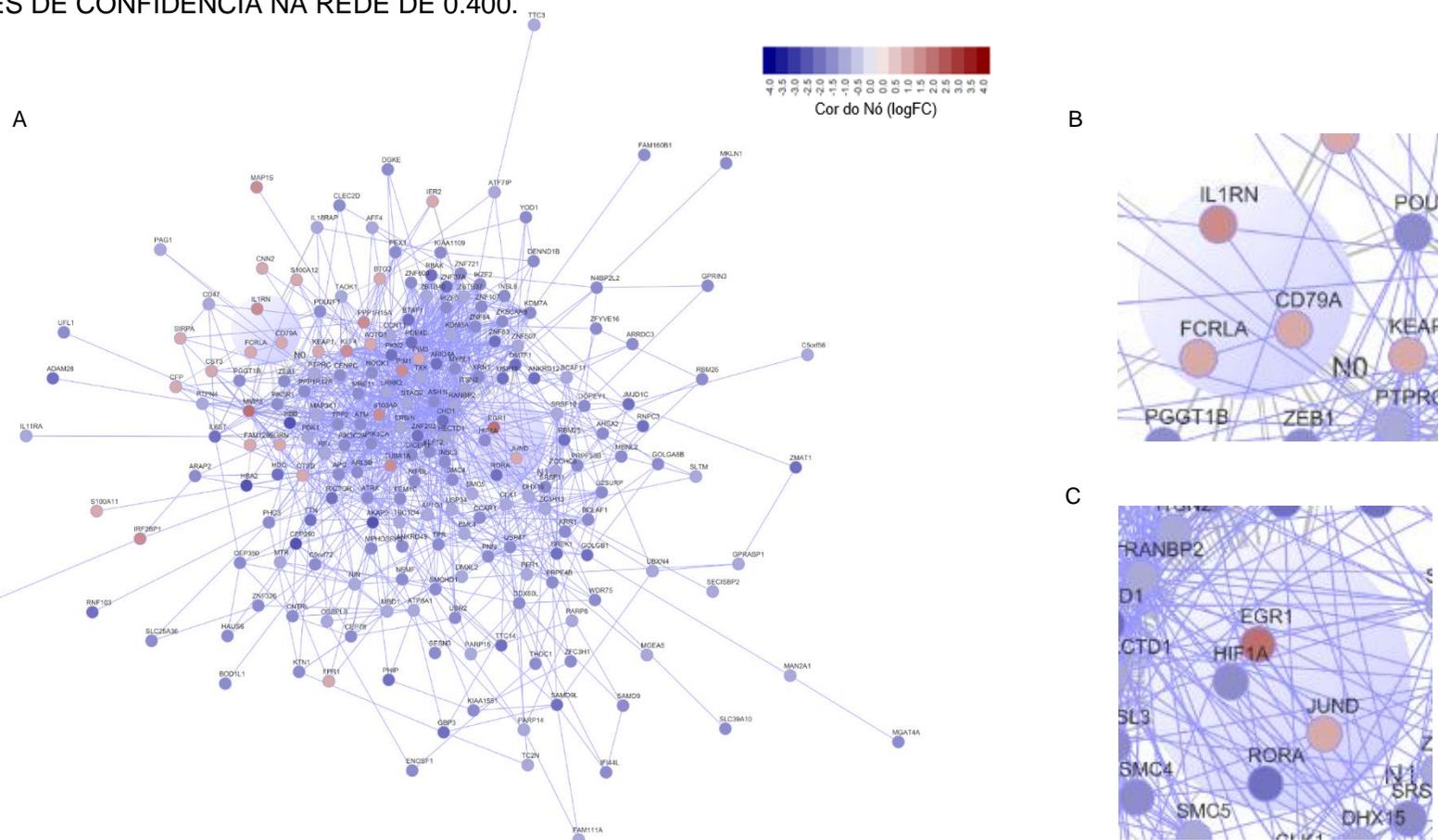
ZHANG, G.; et al. Fc gamma receptor-mediated inflammation inhibits axon regeneration. **PLoSOne**, San Francisco, v. 9, p. 1-13, 2014.

ZHANG, M.; et al. Association of Anti-GT1 a Antibodies with an outbreak of Guillain-Barré Syndrome and analysis of Ganglioside mimicry in an associated Campylobacter jejuni Strain. **PlosOne**, San Francisco, p. 13, 2015.

ZHENG, J. C.; et al. HIV-1-infected and/or immune-activated macrophages regulate astrocyte CXCL8 production through IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ : Involvement of mitogen-activated protein kinases and protein kinase R. **Journal of Neuroimmunology**, Columbus, v.200, p.100-110.

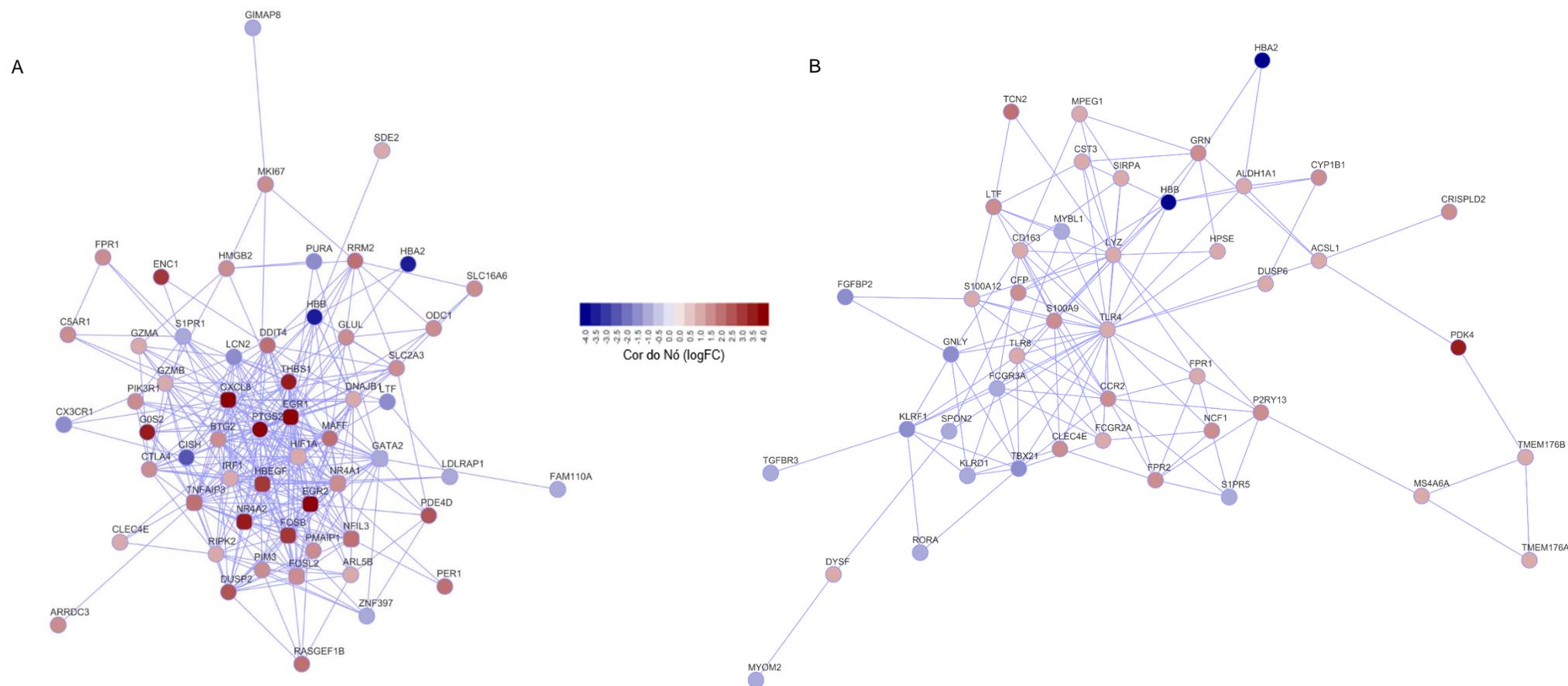
## APÊNDICES

**APÊNDICE 1** - REDE DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA (PPI) COM INFORMAÇÕES DE *HOMO SAPIENS*, CONTENDO EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES COM BASE NO CASO A - DESMIELINIZANTE. A. DEMONSTRA O PANORAMA DA REDE, B. E C. DESTACAM GENES RELACIONADOS A RESPOSTA INFLAMATÓRIO E FATORES DE TRANSCRIÇÃO QUE PODEM ESTAR ENVOLVIDOS COM A REGULAÇÃO DESSA RESPOSTA, RESPECTIVAMENTE. FORAM CONSIDERADOS OS GENES COM  $\text{LOG}_2\text{FC} \geq 1$ ,  $\text{FDR} \leq 0,05$  E COM VALORES DE CONFIDENCIA NA REDE DE 0.400.



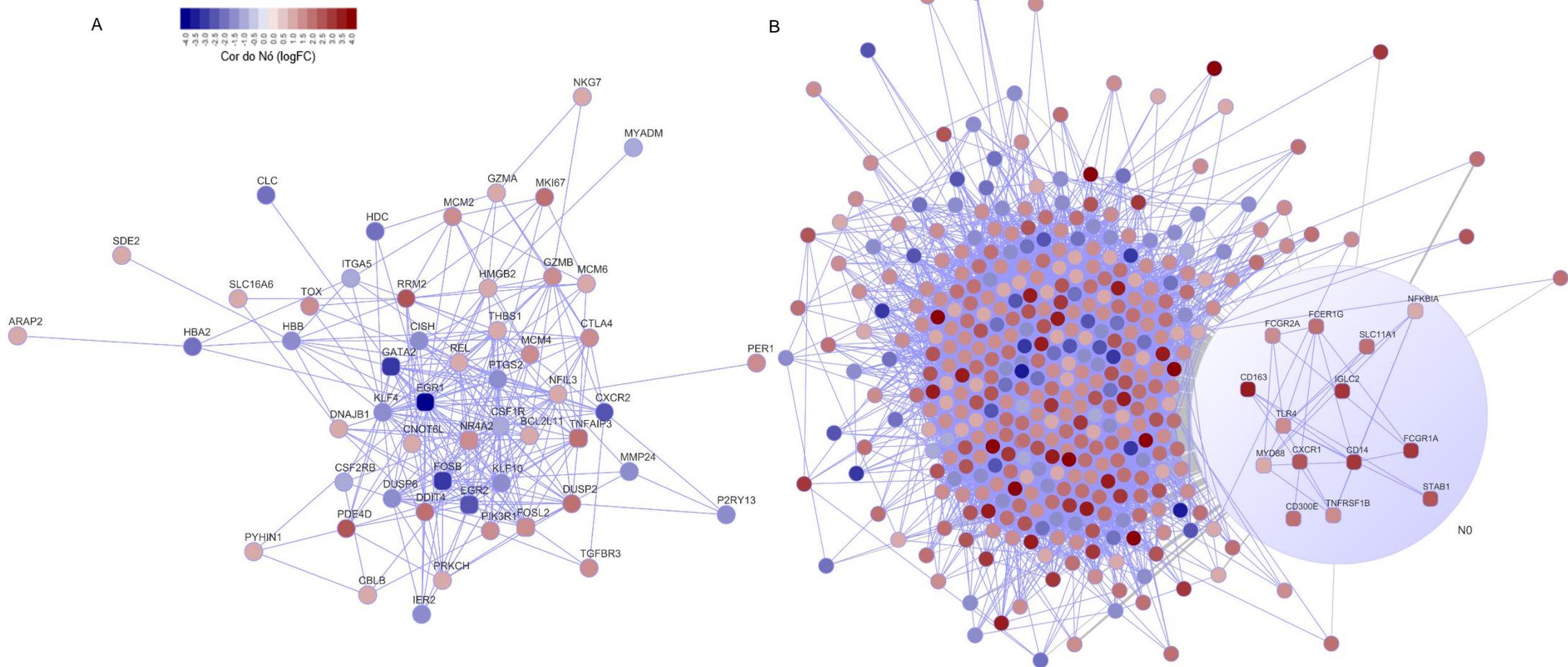
Fonte: Elaborado pelo autor.

**APÊNDICE 2** - PPI COM INFORMAÇÕES PARA *HOMO SAPIENS*, CONTENDO EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES COM BASE NOS CASOS B E E, AMBOS DESMIELINIZANTES. A. CASO B, EM RETÂNGULO ESTÃO DESTACADOS OS GENES CODIFICANTES DE PROTEÍNAS RELACIONADAS A RESPOSTA INFLAMATÓRIA, BEM COMO FATORES DE TRANSCRIÇÃO RELACIONADOS A REGULAÇÃO DESSAS RESPOSTAS. B. CASO E, PODE-SE OBSERVAR RECEPTORES MEMBROS DE *TOLL-LIKE* E *FC GAMMA* RELACIONADA A IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA, RESPECTIVAMENTE. FORAM CONSIDERADOS OS GENES COM  $\text{LOG}_2\text{FC} \geq 1$ ,  $\text{FDR} \leq 0,05$  E COM VALORES DE CONFIDENCIA NA REDE DE 0.400.



Fonte: Elaborado pelo autor.

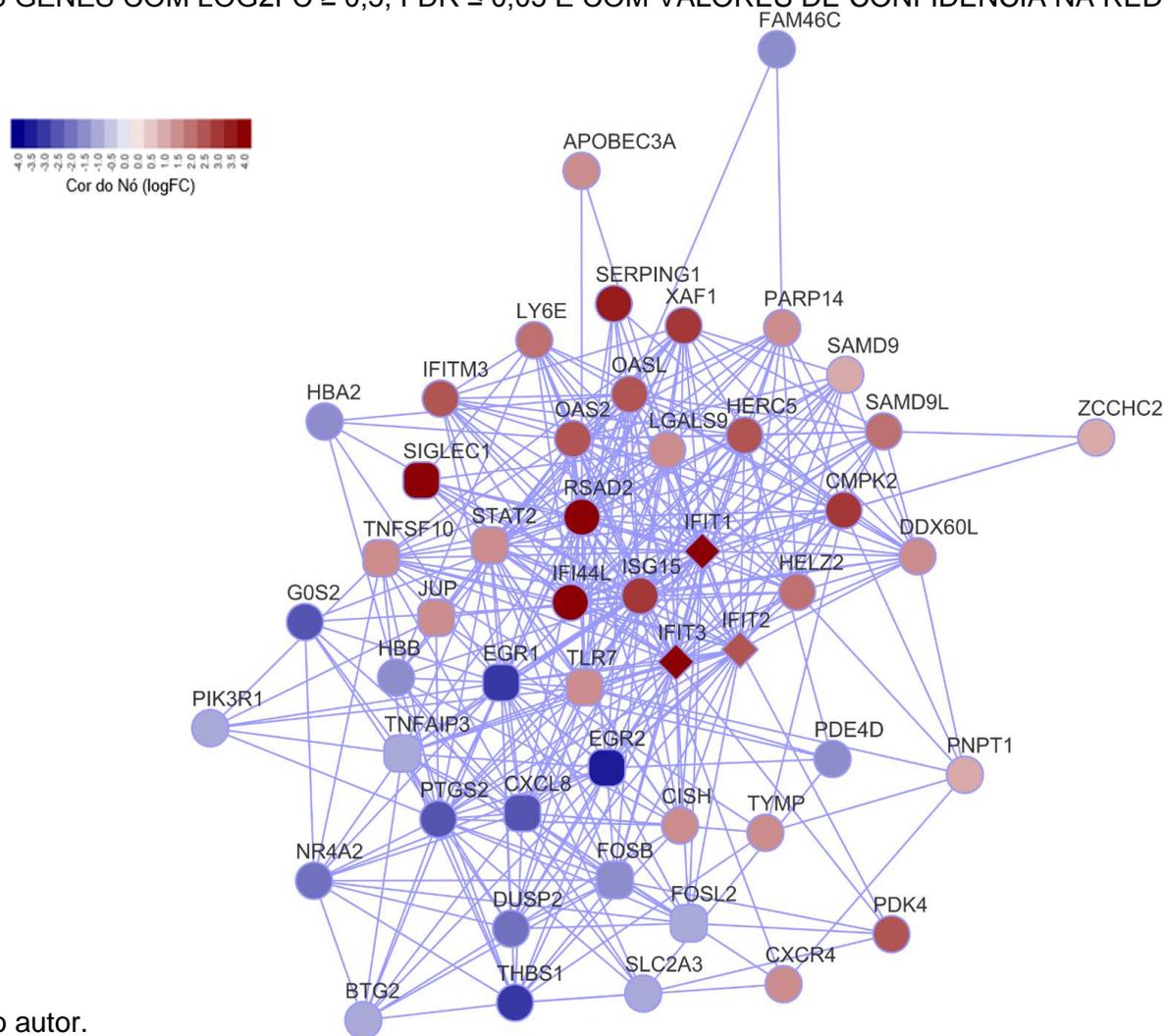
**APÊNDICE 3 - REDE REGULADORA TRANSCRICIONAL CONTENDO INFORMAÇÕES DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES COM BASE NOS CASOS J (A) E M (B), AMBOS DESMIELINIZANTES. FORAM CONSIDERADOS OS GENES COM  $\text{LOG}_2\text{FC} \geq 0,5$ ,  $\text{FDR} \leq 0,05$  E COM VALORES DE CONFIDENCIA NA REDE DE 0.400.**



Fonte: Elaborado pelo autor.

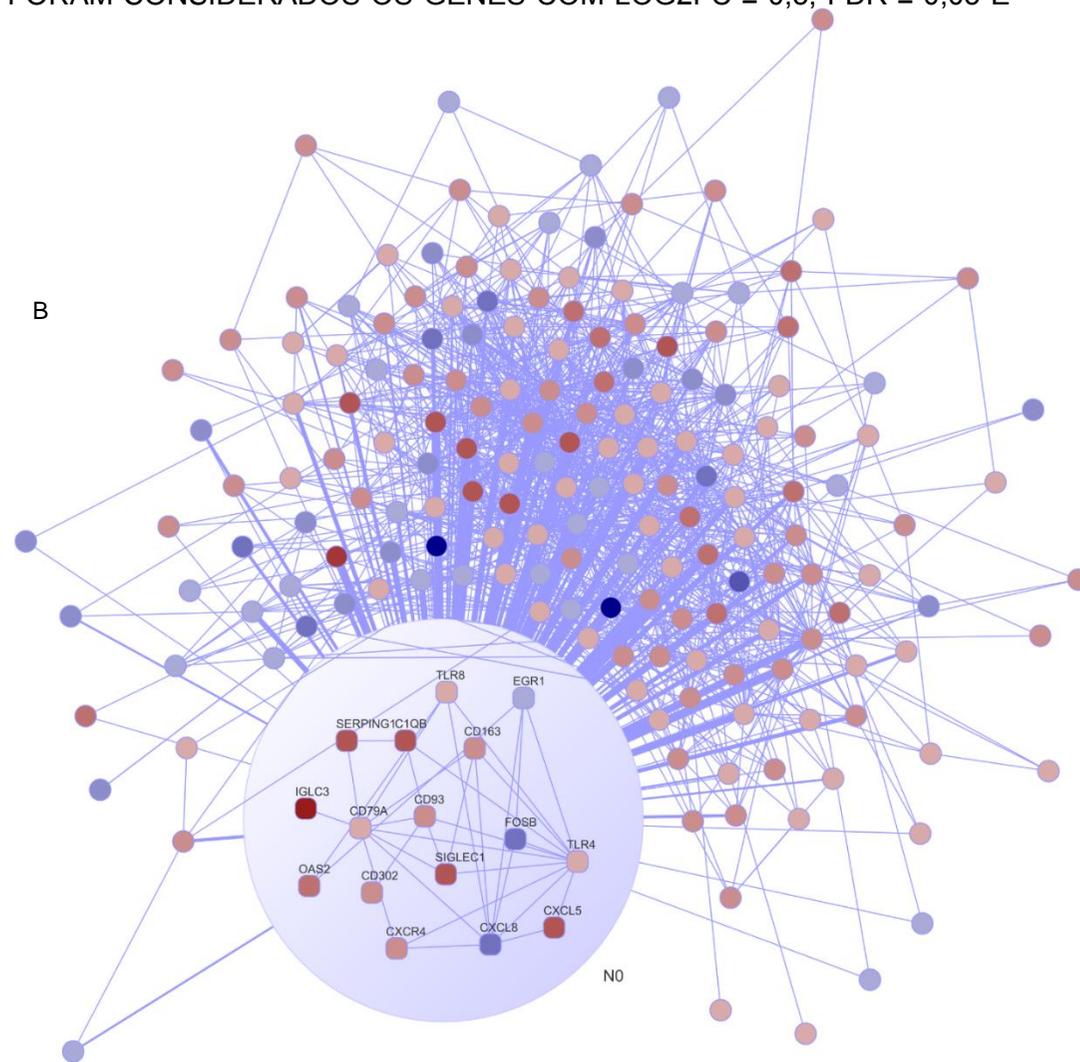
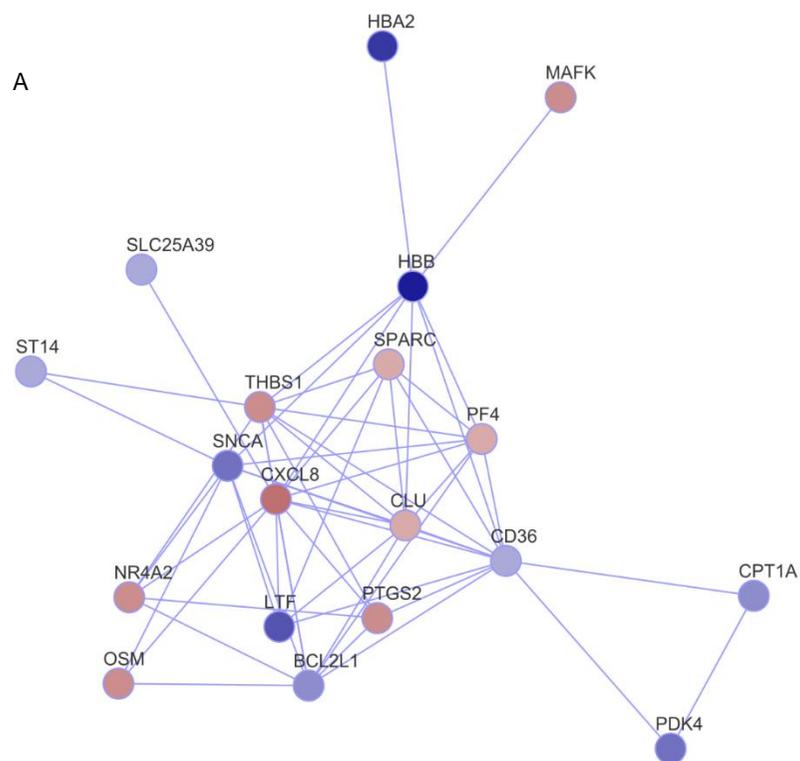
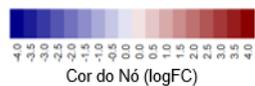


**APÊNDICE 5 - REDE REGULADORA TRANSCRICIONAL CONTENDO INFORMAÇÕES DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES COM BASE NO CASO L - AXONAL. A. DESTACA OS FATORES DE TRANSCRIÇÃO E B. DEMONSTRA A REDE DE FORMA GERAL. FORAM CONSIDERADOS OS GENES COM  $\text{LOG}_2\text{FC} \geq 0,5$ ,  $\text{FDR} \leq 0,05$  E COM VALORES DE CONFIÊNCIA NA REDE DE 0.400.**



Fonte: Elaborado pelo autor.

**APÊNDICE 6 - REDE REGULADORA TRANSCRICIONAL CONTENDO INFORMAÇÕES DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES COM BASE NOS CASOS D (A) E G (B), AMBOS; - MILLER-FISHER. FORAM CONSIDERADOS OS GENES COM  $\text{LOG}_2\text{FC} \geq 0,5$ ,  $\text{FDR} \leq 0,05$  E COM VALORES DE CONFIDENCIA NA REDE DE 0.400.**



Fonte: Elaborado pelo autor.

## ANEXO

### ANEXO 1 - TABELA RETIRADO DO TRABALHO REALIZADO POR DOURADO JUNIOR (2015), DEMONSTRA AS CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES COM BIBLIOTECAS TRANSCRIPTÔMICAS DO PBMC SEQUENCIADAS.

ID	Caso	Idade	Sexo	Variante/Sub-tipo	Nadir	EH*	Dias para melhorar**	Anti-Gg	Dias para a segunda amostra
<b>A</b>	1	15	M	Desmielinizante	10	3	5	-	60
<b>B</b>	2	27	M	Desmielinizante	8	4	60	-	120
<b>C</b>	3	27	F	Axonal	5	4	45	-	90
<b>D</b>	4	35	M	Miller-Fisher	7	3	7	GQ1b	120
<b>E</b>	5	39	M	Desmielinizante	10	4	22	-	60
<b>F</b>	6	42	F	Axonal	7	3	40	GM1	60
<b>G</b>	7	51	F	Miller-Fisher	10	4	10	GQ1b	60
<b>H</b>	8	52	F	Axonal	2	4	546	GM1, GD1a, GD1b	120
<b>I</b>	9	55	F	Desmielinizante	10	4	25	-	240
<b>J</b>	10	61	M	Desmielinizante	25	3	15	-	60
<b>L</b>	11	61	M	Axonal	3	4	100	GM1	60
<b>M</b>	12	71	M	Desmielinizante	8	5	10	-	180

M: Masculino.

F: Feminino.

\*Escala de Hughes no nadir da doença.

\*\*Dias para melhorar um ponto na escala de Hughes.

\*\*\*Intervalo de dias para coleta da segunda amostra de RNA.

Fonte: retirado do trabalho publicado por DOURADO JUNIOR, 2015.