Natale Cavaçana

Estudo genético-molecular de pacientes discordantes de

Paraplegia Espástica Hereditária do tipo 4

Molecular-genetic study of discordant patients with Hereditary

Spastic Paraplegia type 4

São Paulo

2014

Natale Cavaçana

Estudo genético-molecular de pacientes discordantes de

Paraplegia Espástica Hereditária do tipo 4

Molecular-genetic study of discordant patients with

Hereditary Spastic Paraplegia type 4

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências, na Área de BIOLOGIA/GENÉTICA

Orientadora: Profa. Dra. Mayana Zatz

São Paulo

2014

Cavaçana, Natale

Estudo genético-molecular de pacientes discordantes de Paraplegia Espástica Hereditária do tipo 4

83 páginas

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Paraplegia Espástica Hereditária, 2. SPG4 3. Microarranjo, I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Mayana Zatz

Orientadora

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos aqueles que iluminam nosso caminho.

Aos familiares e amigos.

Epígrafe

A meio caminho entre a fé e a crítica está a estalagem da razão.

A razão é a fé no que se pode compreender sem fé;

mas é fé ainda,

porque compreender envolve pressupor que há qualquer coisa compreensível.

Fernando Pessoa, Livro do Desassossego

Agradecimentos

Agradeço a todos que estiveram comigo ao longo desse trabalho.

Aos pacientes, por toda a colaboração, e sem o qual este trabalho nunca teria sido concretizado.

A minha orientadora, a Profa. Dra. Mayana Zatz, pela oportunidade, pelo espaço e suporte oferecido em seu laboratório durante esses anos.

Ao Prof. Dr. Fernando Kok e sua equipe, pela ajuda com o atendimento dos pacientes, com a definição da parte clínica, pelas sugestões e disponibilidade em ajudar.

Às colegas Daniele Yumi e Nubia Esteban pela ajuda no processamento e análise dos dados.

Também aos colegas Michel Naslavsky, Miguel Mitne, Melinda Beccari, Viviane Nunes, Monize Lazar, Marcos Valadares, Giuliana Castello, Juliana Gomes, Amanda Assoni, Thiago Rosa, Thalita Figueira Cunha, Natassia Vieira, Antônia Pereira de Cerqueira, Lúcia Inês, Bárbara de Bellis, Lucas Alvizi e aos companheiros e amigos de laboratório, pela ajuda e sugestões.

A Naila Lourenço por todo amor, companheirismo, amizade, por me motivar na busca do que acredito.

À minha família, pelo apoio.

Aos amigos, pelo incentivo.

A todos os colegas do CEPID, pela ajuda.

Ao Departamento de Biologia e Genética Evolutiva do IB-USP, que garantiram a estrutura para o desenvolvimento deste trabalho.

CNPq e à FAPESP, pelo auxílio financeiro.

Índice

I – Introdução	01
1. As Paraplegias Espásticas Hereditárias	01
2. Classificação das Paraplegias Espásticas Hereditárias	02
3. Manifestações clínicas	07
4. Diagnóstico	11
5. Diagnóstico diferencial	12
6. Epidemiologia	13
7. Teste genético	14
8. Tratamento	15
9. Fisiopatologia	15
10. Mecanismo de transporte axonal	17
11. SPG4 – Espastina	22
12. Espastina e o microtúbulo	25
13. SPG4 no Brasil	30
II – Objetivos	34
1. Objetivos específicos	34
III – Casuística e Métodos	34
1. Casuística	34
2. Coleta de material biológico	39
3. Microarranjos	39
IV – Resultados	45

1. Análise de qualidade dos microarranjos	45
2. Análise funcional (<i>in silico</i>) dos genes diferencialmente expressos	54
3. Análise dos dados de microarranjo de genotipagem	64
V – Discussão	67
VI – Conclusão	72
Resumo	74
Abstract	75
Bibliografia	76

I. Introdução

1. As Paraplegias Espásticas Hereditárias

As paraplegias espásticas hereditárias (PEH) são doenças geneticamente determinadas nas quais os axônios do trato corticoespinhal não se desenvolvem normalmente ou sofrem uma degeneração progressiva. A principal característica clínica de todas as PEH é a paraparesia espástica progressiva simétrica e bilateral, que pode ocorrer de forma isolada (PEH pura) ou em combinação com outras características (PEH complicada). Muitas das PEH, provavelmente todas as puras, estão associadas com neurodegeneração ao invés de neurodesenvolvimento anormal ^[3].

Prof. Dr. Adolf Strümpell

Figura 1. Foto de Strümpell ^[2].

Em 1880 o médico alemão Ernst Adolf Gustav Gottfried von Strümpell (1853 – 1925) publicou o que foi considerado a primeira descrição clara de paraplegia espástica hereditária. Em seu trabalho, ele reportou uma família em que dois irmãos eram afetados com paraplegia espástica e o pai foi descrito como “um pouco manco”, sugerindo assim um padrão de herança autossômica dominante. Alguns anos depois ele conseguiu demonstrar as bases patológicas da doença e tanto Strümpell (figura 1) como o médico francês Maurice Lorrain (1867 - ?) publicaram diversos casos de PEH nos anos seguintes, por isso as PEH também são conhecidas como Síndrome de Strümpell-Lorrain ^[4, 5].

Logo após as primeiras descrições da PEH, uma grande quantidade de relato de casos apareceu na literatura. As primeiras revisões sobre as PEH tentaram identificar casos “puros” como descritos por Strümpell e Lorrain, porém a definição de “puro” variava entre os autores. Até que em 1981 a pesquisadora irlandesa Anita Harding (1952 – 1995), após avaliação clínica detalhada de 22 famílias, sugeriu critérios para a classificação de PEH entre puro e complicado, sendo amplamente adotados desde então. Outra subdivisão para as PEH puras também foi proposta por Harding (figura 2), baseado na idade de início da doença ^[4, 6].

Figura 2. Foto de Harding ^[1].

Atualmente, as PEH são classificadas também pelo seu gene ou locos cromossômico específico, utilizando a sigla SPG (do inglês: *spastic gait* ou *spastic paraplegia*), seguido de um

número progressivo por ordem de descoberta (por exemplo, SPG1, SPG2). Os avanços no campo da biologia molecular sugerem esquemas novos de classificação. Se por um lado, a classificação baseada nos mecanismos genéticos sugere que uma única entidade clínica possa ser de fato subdividida em dezenas de formas genéticas de PEH, por outro lado, algumas das formas genéticas distintas de PEH podem ser agrupadas por seu mecanismo molecular, como disfunção mitocondrial ou problemas no transporte axonal [3, 7-9].

2. Classificação das Paraplegias Espásticas Hereditárias

A classificação proposta por Anita Harding para as PEH como puras ou complicadas foram baseadas nas características clínicas dos pacientes (tabela 1). A forma pura de PEH é caracterizada pela presença de um aumento do tônus muscular nos membros inferiores com ausência de outros sintomas neurológicos, porém algum grau de disfunção da sensação vibratória e incontinência urinária são observados. Além disso, as PEH puras são divididas entre o tipo I e o tipo II de acordo com a idade de início. A PEH pura do tipo I é caracterizada pelo início dos sintomas antes dos 35 anos de idade com uma lenta progressão da doença e a PEH pura do tipo II geralmente começa após os 35 anos de idade sendo caracterizada por uma progressão mais rápida dos sintomas, fraqueza muscular marcante e perda sensorial. As formas complicadas de PEH apresentam estes mesmos sinais além de diversos outros como envolvimento cognitivo, demência, sintomas cerebelares, amiotrofia, neuropatia periférica, surdez, epilepsia, sintomas na retina, catarata e sinais extrapiramidais [8].

Tabela 1. Classificação modificada da proposta de Anita Harding [4, 6].

Paraplegia espástica pura
Autossômico Dominante: idade de início geralmente antes dos 35 anos de idade (tipo I)
Autossômico Dominante: idade de início geralmente após os 35 anos de idade (tipo II)
Autossômico Recessivo
Recessivo ligado ao X
Paraplegias espásticas complicadas
Com amiotrofia
Quadriparesia espástica
Síndrome de Sjögren-Larsson
Com degeneração macular e retardo mental
Com atrofia óptica
Com sinais extrapiramidais
Com sinais cerebelares
Com neuropatia motora ou sensorial
Com doença de pigmentação da pele

Com corpo caloso mais fino
 Com lesões na matéria branco do cérebro
 Com convulsões
 Com distonia
 Com degeneração tálamo cerebelar
 Com demência

As PEH são geneticamente heterogêneas com muitos genes envolvidos na sua etiologia (tabela 2). Dentre elas, 19 PEH apresentam padrão de herança autossômico dominante (AD, AD-SPG), 32 com padrão de herança autossômico recessivo (AR, AR-SPG) e cinco são ligadas ao cromossomo X (XL, XL-SPG). Uma família foi descrita com herança materna (mitocondrial). Vinte locos e 38 genes foram identificados como causativos: 11 dentre as 19 AD-SPG, 23 dentre as 32 das AR-SPG e três dos cinco XL-SPG (tabela 3). Uma paraplegia espástica de início tardio, com claro envolvimento bioquímico mitocondrial, foi observada em diversos pacientes de uma família, portadores da mutação m.9176T>C no gene *MT-ATP6*. Esta mesma mutação foi associada a outras doenças, como a síndrome de Leigh, sugerindo que fatores modificadores podem estar envolvidos na variabilidade da expressão do fenótipo da doença. Existem indícios de que polimorfismos no DNA mitocondrial contribuam para o desenvolvimento das PEH ^[9, 10].

Tabela 2. Paraplegias espásticas hereditárias ^[9, 10].

Tipo	MH	Loco	Gene	Produto Gênico	Características adicionais
SPG1	XR	Xq28	<i>L1CAM</i>	NCAM	Retardo mental, hidroencéfalo, afasia, polegares aduzidos, corpo caloso fino
SPG2	XR	Xq21	<i>PLP1</i>	MPLP	Atrofia óptica, ataxia, nistagmo, lesões na matéria branca, polineuropatia, afasia, demência
SPG3A	AD	14q11-q21	<i>ATL1</i>	Atlantina-1	Síndrome de Silver
SPG4	AD	2p22	<i>SPAST</i>	Espastina	Demência, epilepsia, polineuropatia, tremor, ataxia, aborto, membros superiores afetados
SPG5A	AR	8q12-q13	<i>CYP7B1</i>	OAH1	Lesões na matéria branca
SPG6	AD	15q11.1	<i>NIPA1</i>	NIPA1	Polineuropatia, atrofia espinhal, epilepsia, disartria, distonia, membros superiores afetados
SPG7	AR	16q24.3	<i>SPG7</i>	Paraplegina	Atrofia óptica ou cerebelar, mitocôndrias anormais, disartria, disfagia, polineuropatia, corpo caloso fino
SPG8	AD	8q23-q24	<i>KIAA0196</i>	strumpelina	
SPG9	AD	10q23.3-24.1	-	-	Catarata, refluxo gastroesofágico, desgaste, neuropatia motora
SPG10	AD	12q13.3	<i>KIF5A</i>	Quinesina HC5A	Alélico a doença de Charcot-Marie-Tooth do tipo 2, síndrome de Silver, retardo mental, parkinsonismo, surdez
SPG11	AR	15q13-q15	<i>KIAA1840</i>	Espatacsina	Retardo mental, polineuropatia sensorial, corpo caloso fino, disartria, nistagmo, fraqueza dos membros superiores, ataxia, parkinsonismo, maculopatia, lesões na matéria branca, alélico a esclerose lateral amiotrófica do tipo 5, síndrome de Kjellin
SPG12	AD	19q13	<i>RTN2</i>	Reticulona 2	-
SPG13	AD	2q24-q34	<i>SPGD1</i>	Mt.HSP60	Distonia

SPG14	AR	3q27-q28	-	-	Retardo mental, neuropatia motora
SPG15	AR	14q22-q24	ZFYVE26	Espastizina	Maculopatia, polineuropatia, disartria, retardo mental, retinopatia pigmentosa, corpo caloso fino, lesões na matéria branca, alélico a síndrome de Kjellin
SPG16	XR	Xq11.2	-	-	Afasia, visão debilitada, retardo mental, incontinência
SPG17	AD	11q12-q14	BSCL2	Seipina	Síndrome de Silver, alélico a doença de Charcot-Marie-Tooth do tipo 2
SPG18	AR	8p12-8q11.22	ERLIN2	SPFH2	Declínio intelectual, epilepsia, deslocamento do quadril congênito
SPG19	AD	9q33-q34	-	-	-
SPG20	AR	13q12.3	SPG20	Espartina	Síndrome de Troyer (disartria, desgaste distal)
SPG21	AR	15q22.31	ACP33	Masparcina	Demência, envolvimento cerebelar, sinais extrapiramidais, corpo caloso fino, lesões na matéria branca
SPG22	XL	Xq21	SLC16A2	MCT8	Síndrome de Allan Herndon Dudley
SPG23	AR	1q24-q32	-	-	Lesões cutâneas pigmentares
SPG24	AR	13q14	-	-	Variável associada com disartria espástica e sinais pseudobulbares
SPG25	AR	6q23-q24	-	-	Hérnia de disco
SPG26	AR	12p11.1-q14	-	-	Disartria, amiotrofia distal nos membros superiores e inferiores, deficiência intelectual
SPG27	AR	10q22.1-q24	-	-	Disartria, polineuropatia, retardo mental
SPG28	AR	14q21.3-q22.3	-	-	-
SPG29	AD	1p31.1-21.1	-	-	Deficiência auditiva, vômitos persistentes de hérnia hiatal
SPG30	AR	2q37	KIF1A	Quinesina3	Sinais cerebelares leves, neuropatia sensorial, alélico a neuropatia sensorial e autônoma hereditária
SPG31	AD	9p21	REEP1	REEP11	Neuropatia axonal, similar a síndrome de Silver, ataxia cerebelar, tremor, demência
SPG32	AR	14q12-q21	-	-	Retardo mental, disrafia do tronco cerebral, atrofia cerebelar, deformidades dos pés
SPG33	AD	10q24.2	ZFYVE27	SBP	Deformidade dos pés
SPG34	XL	Xq25-27	-	-	-
SPG35	AR	16q21-q23	FA2H	FA2H	Declínio cognitivo, convulsão, lesões na matéria branca, alélico as síndromes de neurodegeneração com acúmulo de ferro no cérebro
SPG36	AD	12q23-24	-	-	Polineuropatia
SPG37	AD	8p21.1-q13.3	-	-	-
SPG38	AD	4p16-p15	-	-	Síndrome de Silver
SPG39	AR	19p13.2	NTE	Esterase	Neuropatia axonal, atrofia da medula espinhal
SPG40	AD	-	-	-	Hiperreflexia dos membros superiores, déficit de memória
SPG41	AD	11p14.1-p11.2	-	-	Fraqueza leve dos pequenos músculos da mão
SPG42	AD	3q24-q26	SLC33A1	Carreador ACoA	-
SPG43	AR	19p13.11-q12	-	-	Marcado desgaste dos músculos distais da mão (síndrome de Silver), alélico as síndromes de neurodegeneração com acúmulo de ferro no cérebro
SPG44	AR	1q42.13	GJA12/GJC2	Conexina 47	Lesões na matéria branca, hipomielinização, alélico a doença de Pelizaeus-Merzbacher
SPG45	AR	10q24.3-q25.1	-	-	Retardo mental, anormalidades oculares
SPG46	AR	9p21.2-q21.12	-	-	Retardo mental, catarata, disfunção cerebelar, corpo caloso fino
SPG47	AR	1p13.2-1p12	AP4B1, E1, M1, S1	AP4B1, E1, M1, S1	Retardo mental, convulsão, corpo caloso fino, lesões da matéria branca periventricular
SPG48	AR	7p22.2	KIAA0415	Proteína AP5	Hiperintensidade da medula espinhal
SPG49	AR	14q32.31	TECPR2	TECPR2	Refluxo gastrointestinal, episódios recorrentes e apneia, características dismórficas leves
SPG50	AR	7q22.1	AP4M1	AP4M1	-

SPG51	AR	15q21.2	<i>AP4E1</i>	AP4E1	Microcefalia, hipotonia, atraso psicomotor, dismorfismos faciais
SPG52	AR	14q12	<i>AP4S1</i>	AP4S1	Microcefalia, hipotonia, baixa estatura, dismorfismos faciais
SPG53	AR	8p22	<i>VSP37A</i>	VSP37A	Dismorfismo esquelético, hipertricrose
SPG54	AR	8p11.23	<i>DDHD2</i>	DDHD2	Contraturas nos pés, disartria, disfagia, estrabismo, hipoplasia óptica
SPG55	AR	-	<i>C12ORF65</i>	C12ORF65	Atrofia óptica
SPG56	AR	4q25	<i>CYP2U1</i>	CYP2U1	Neuropatia axonal, calcificações no gânglio basal

MR: modo de herança, XR: ligado ao X recessivo, XL: ligado ao X, AD: autossômico dominante, AR: autossômico recessivo.

Tabela 3. Proteínas mutadas envolvidas na patogênese das PEH ^[9, 10].

Tipo	Gene	TDM	Proteína	Função
SPG1	<i>L1CAM</i>	MP	NCAM	Glicoproteína axonal envolvida na migração e diferenciação neuronal
SPG2	<i>PLP1</i>	MP, del, dupl	proteína proteolipídica	Proteína da mielina do sistema nervoso central com função estrutural na manutenção da linha intraperíodo da mielina compacta
SPG3A	<i>ATL1</i>	MP	Atlantina	Interage com a membrana do retículo endoplasmático nos neurônios corticoespinhais para coordenar o formato do retículo endoplasmático e a dinâmica do microtúbulo
SPG4	<i>SPAST</i>	MP, del, dupl, ss, ins	Espastina	Promove a formação da rede de microtúbulos, essencial para o crescimento e ramificação dos axônios
SPG5	<i>CYP7B1</i>	MP	OAH1	Proteína de membrana do retículo endoplasmático que catalisa a primeira reação da via catabólica do colesterol em tecidos extrahepáticos
SPG6	<i>NIPA1</i>	MP	NIPA1	Inibidor da sinalização da BMP, importante para função distal do axônio
SPG7	<i>SPG7</i>	MP, del, ins	Paraplegina	Desconhecida, localizado na membrana interna da mitocôndria
SPG8	<i>KIAA0196</i>	MP	Strumpellina	Desconhecida, parceiro na ligação de proteínas que contém valosina, expresso no citosol e retículo endoplasmático
SPG10	<i>KIF5A</i>	MP	Quinesina de cadeia pesada	Envolvido no transporte axonal anterógrado
SPG11	<i>KIAA1840</i>	MP, del, dupl, ss, ins	Espatacsina	Proteína acessória do complexo AP5 de separação de vesículas
SPG12	<i>RTN2</i>	MP, del	Reticulona 2	Interage com a espastina (SPG4) e está envolvida na modelagem do retículo endoplasmático
SPG13	<i>HSPD1</i>	MP	Chaperona HSP60	Chaperona HSP60 mitocondrial
SPG15	<i>ZFYVE26</i>	MP	Espastizina	Proteína acessória do complexo AP5 de separação de vesículas, supostamente envolvida no tráfego endossomal
SPG17	<i>BSCL2</i>	MP	Seipina	Desconhecida, proteína n-glicosilada da membrana do retículo endoplasmático
SPG18	<i>ERLIN2</i>	del	SPFH2	Componente do retículo endoplasmático associado ao sistema de degradação de proteínas
SPG20	<i>SPTG20</i>	MP, del	Espartina	Envolvido na degradação do fator receptor de crescimento epidermal, associado com a mitocôndria
SPG21	<i>ACP33</i>	ins	Maspardina	Suspeita-se da função de transporte de proteínas e separação no transporte de vesículas na rede trans do complexo de Golgi
SPG22	<i>SLC16A2</i>	ins	MCT8	Desconhecida
SPG30	<i>KIF1A</i>	MP	Quinesina 3	Envolvido no transporte e tráfego axonal
SPG31	<i>REEP1</i>	del, ins, ss	REEP1	Desconhecida, interage com a membrana do retículo endoplasmático tubular
SPG33	<i>ZFYVE27</i>	MP	Protrudina	Interage com a espastina (SPG4), envolvida com o tráfego intracelular

SPG35	<i>FA2H</i>	MP, del	FA2H	Envolvida com a hidroxilação de lipídeos
SPG39	<i>NTE</i>	MP	NTE	Desconhecida, fosfolipase/ lisofosfolipase
SPG42	<i>SLC33A1</i>	MP	Carreador de ACoA	Desconhecido, transportador de acetil-CoA
SPG44	<i>GJA12</i>	MP	Conexina 47	Proteína de junção celular
SPG47	<i>AP4B1</i>	del	AP4B1	Envolvida na formação e separação de vesículas
SPG48	<i>KIAA0415</i>	del	KIAA0415	Proteína acessória do complexo AP5 de separação de vesículas, supostamente envolvida no reparo de DNA na recombinação homóloga e no reparo de quebras de DNA dupla fita
SPG49	<i>TECPR2</i>	MP	TECPR2	Participa da autofagia, regula positivamente o acúmulo de autofagossomos <i>in vitro</i>
SPG50	<i>AP4M1</i>	MP	AP4M1	ver AP4B1
SPG51	<i>AP4E1</i>	del	AP4E1	ver AP4B1
SPG52	<i>AP4S1</i>	MP	AP4S1	ver AP4B1
SPG53	<i>VPS37A</i>	MP	VPS37A	Necessária para o complexo de seleção e para o complexo de transporte via endossomo
SPG54	<i>DDHD2</i>	MP	DDHD2	Envolvido com a biogênese de organelas e tráfego membrana
SPG56	<i>CYP2U1</i>	MP	CYP2U1	Cataliza a hidroxilação de ácido araquidônico, ácido eicosopentanóico, ácido docosa-hexaenóico e é relacionado com ácidos graxos de cadeia longa que medeiam às vias de transdução de sinal

TDM: tipo de mutação, MP: mutação de ponto, ss: mutação no sítio de splicing, del: deleção, dupl: duplicação, ins: inserção.

A identificação de genes associados às PEH vem aumentando, e assim, complicando o diagnóstico da doença, mas em compensação, para os médicos e clínicos existem diversos testes genéticos disponíveis que podem simplificar o diagnóstico, tanto para os casos familiares como para os casos esporádicos, e ainda outros disponíveis para a pesquisa. Para o neurocientista, o grande número de proteínas identificadas, que podem causar degeneração axonal na medula espinhal, tem levado a uma nova compreensão sobre os processos que mantêm esses axônios. Portanto, desvendar os processos que são vitais para a homeostase do axônio e dos mecanismos patológicos das PEH (figura 3) pode ajudar a identificar potenciais soluções terapêuticas ^[11].

Figura 3. As vias moleculares que podem ser responsáveis pelas patologias de PEH (algumas proteínas participam de mais de um processo). Problemas primários nessas proteínas (mutações causativas no gene) podem perturbar múltiplos outros processos celulares e moleculares ^[9].

3. Manifestações clínicas

A principal característica clínica das PEH é a espasticidade progressiva dos membros inferiores, sendo a espasticidade clinicamente definida como a resistência a extensão, que depende da velocidade, levando a hiperreflexia (reflexos exaltados), rigidez e fraqueza muscular. Também pode ser definida como hipertonia, que é o aumento do tônus muscular e redução da capacidade de estiramento (aumento da rigidez), acompanhada de uma ou duas dessas características: (1) resistência a um movimento imposto externamente que aumenta com a maior velocidade de estiramento e varia com a direção do movimento da junta e/ou (2) resistência a um movimento imposto externamente acima de um limiar de velocidade ou angulo da junta ^[12, 13]. Comparando com outras causas de paraplegia espástica, tais como esclerose múltipla e lesão medular, existe uma relativa preservação da força, apesar do aumento considerável do tônus muscular das pernas, particularmente em pacientes com início precoce ^[11].

O início dos sintomas pode ser evidente em qualquer idade, variando desde o início da infância até a senescência. Na idade de início, as apresentações dos primeiros sintomas e a progressão da doença podem variar muito, mesmo dentro da mesma família. Embora a média de idade de início de alguns tipos seja mais precoce em alguns tipos (por exemplo, início na infância na SPG3A) que do em outros (por exemplo, início adulto na SGP6), existe uma significativa

sobreposição no intervalo de idades nas quais os primeiros sintomas aparecem, limitando, dessa maneira, a habilidade de prever o tipo genético de PEH baseado apenas na idade de início dos sintomas ^[5, 9, 14, 15].

Alguns estudos sugerem antecipação clínica, com o início dos sintomas começando mais cedo em subseqüentes gerações, sugerindo a possibilidade de que algumas formas de PEH sejam causadas por expansão de repetições de nucleotídeos. Por outro lado, outros argumentam que o diagnóstico precoce pode ser atribuído ao aumento de observações nas gerações mais novas ^[5, 9, 14-16].

A progressão (a velocidade e o grau com que a deficiência funcional aumenta) é muito variável, incluindo desde quadros relativamente estáticos, com não agravamento da deficiência, até a inexorável piora, e após um período de declínio insidioso, ocorre uma aparente estabilidade da deficiência (aparente platô funcional). O fato de que muitos pacientes com PEH parecem alcançar um platô funcional da qual pouco se progride (para além do que é atribuída a velocidade normal, relacionado à idade) pode refletir a interação de múltiplos fatores, como uma velocidade reduzida de neurodegeneração, processos que promovam a recuperação dos axônios danificados e compensação funcional através da neuroplasticidade ^[9].

Nas formas puras, a PEH é caracterizada pela espasticidade progressiva das extremidades inferiores com ou sem disfunção da coluna posterior (propriocepção e perda da sensação vibratória) e incontinência urinária. Em alguns pacientes foi sugerido um comprometimento leve da cognição nesta forma da doença ^[17, 18]. Muitos pacientes apresentam uma progressiva alteração da marcha, com dificuldade para caminhar, geralmente observados pelos próprios pacientes ou parentes próximos, além disso, os pacientes se queixam de quedas quando sobem escadas devido à fraqueza na dorsiflexão dos pés ^[19].

Os sintomas são costumeiramente simétricos, sendo a espasticidade mais proeminente que a fraqueza muscular, mas assim que a doença progride, a fraqueza se torna mais proeminente, especialmente nos músculos flexores do quadril e da tíbia anterior. A marcha se torna significativamente mais lenta com considerável aumento da variação da passada. Um atraso no início da ambulação é frequentemente observado em PEH com início na infância. Outros achados clínicos incluem diminuição do alcance dos movimentos com aumento da flexão dos joelhos e

desvios do ângulo máximo do tornozelo levando a uma posição eqüinovara dos pés ^[19]. Sugestões de critérios de diagnóstico estão incluídas na tabela 4.

Tabela 4. Critérios diagnósticos para as paraplegias espásticas hereditárias ^[8].

Características clínicas	
Obrigatório	Histórico familiar Alteração progressiva da marcha Espasticidade progressiva dos membros inferiores Hiperreflexia dos membros inferiores Resposta planar extensora
Comum	Paresia dos membros inferiores Distúrbios de esfíncter Distúrbios leves da coluna dorsal <i>Pes cavus</i> Hiperreflexia dos membros superiores Dismetria terminal leve Perda do reflexo do tendão calcâneo
Incomum	Paresia dos membros superiores Amiotrofia distal
Diagnóstico de alerta	Paresia maior que a espasticidade Ataxia proeminente Amiotrofia proeminente Envolvimento dos membros superiores proeminente Neuropatia periférica Assimetria Pigmentação retinal Sinais extrapiramidais

Ao exame, os principais achados clínicos nos pacientes das PEH puras incluem espasticidade nas extremidades inferiores, particularmente das flexões do joelho, quadríceps e tornozelos, com as partes superiores poupadas. Os reflexos profundos dos tendões nas extremidades inferiores estão aumentados e os reflexos do tornozelo ausentes ^[20-22]. Também pode ser observado um aumento dos reflexos profundos dos tendões nas extremidades superiores ^[8].

Além disso, observa-se hiperreflexia, resposta plantar extensora e fraqueza das pernas com distribuição piramidal. Este padrão de hipertoncicidade é responsável pela clássica marcha em que a pessoa afetada demonstra circundução e caminhar nas pontas dos pés. A fraqueza muscular, quando presente, observa-se nos iliopsoas, tíbia anterior e, em menor extensão, no músculo

isquiotibial. Uma das características da PEH puras é uma discrepância entre uma grave espasticidade e apenas uma fraqueza muscular leve ou ausente. Isto pode ser visto em pacientes que são cadeirantes devido à espasticidade, mas que apresentam força normal no teste muscular [8].

Outras características encontradas nas PEH puras são: anormalidades sensoriais leves nos membros inferiores, ausência de reflexo nos tornozelos, *pes cavus*, sintomas urinários, ataxia leve nos membros superiores e atrofia muscular distal leve [6, 23-25].

O envolvimento sensorial ocorre em 10 a 65% dos casos de PEH pura, sendo visto mais comumente, mas não exclusivamente, em pacientes cuja doença tem longa duração. Geralmente consiste na diminuição da sensação vibratória, e menos frequentemente, na diminuição da sensação da junção articular nas extremidades dos membros inferiores. Na maioria dos pacientes, os estudos da condução nos nervos são normais [6], sugerindo que as anormalidades encontradas no exame clínico são devidas mais a uma axonopatia central do que a um envolvimento do nervo periférico. A ausência de reflexos dos tornozelos nos pacientes de PEH provavelmente reflete o mesmo processo. Já *pes cavus* não é tão frequente quanto foi originalmente sugerido, pois Harding em seus estudos, o encontrou em apenas um terço dos casos e a sua presença pode refletir a gravidade ou a duração da doença [26-28].

Os distúrbios do esfíncter urinário ocorrem em mais de 50% dos pacientes, que se manifesta em uma combinação de urgência e incontinência, e é mais comum em pacientes que apresentam a doença durante um longo período. Por outro lado, o envolvimento do esfíncter anal é raro nas PEH apesar de existirem relatos de indivíduos em uma família com urgência fecal e incontinência [26-28].

Atrofia muscular leve, embora incomum, pode ser observado nos músculos distais dos membros inferiores, frequentemente nos músculos pequenos do pé e tibial anterior, sendo mais comum em pacientes que desenvolveram a doença a mais de 10 anos [6, 23]. Se a atrofia muscular é mais proeminente e presente nos estágios iniciais da doença, o diagnóstico de PEH deveria ser questionado [6].

O envolvimento dos membros superiores é raro, mas quando ocorre geralmente consiste em hiperreflexia leve, que pode estar presente desde os primeiros sintomas. Um traço de

dismetria terminal também pode ser visto nos membros superiores, mas outros traços cerebelares não são vistos. Existem alguns relatos de atrofia muscular distal leve, mas um envolvimento mais marcante de membros superiores com espasticidade, fraqueza ou amiotrofia não são vistos frequentemente nas PEH ^[6]. Achados negativos importantes no exame clínico são função normal do nervo craniano e sem envolvimento evidente do trato corticobulbar. O envolvimento do sistema nervoso autônomo em PEH não foi estudado sistematicamente ^[25].

O prognóstico e a gravidade das PEH puras variam entre famílias e dentro da mesma família, apesar da expectativa de vida ser normal. Diversos autores apoiam as observações de Harding de que as PEH de início precoce (<35 anos) têm uma progressão mais lenta, nas quais a maioria dos pacientes permanece ambulante durante todo o período de suas vidas e que apenas uma pequena percentagem é confinada em cadeira de rodas quando mais idosos. Em contraste, nas PEH de início tardio (>35 anos) a progressão da doença pode ser rápida e a maioria dos pacientes perde a capacidade de andar entre 60 a 70 anos de idade ^[6, 24, 29, 30]. Em algumas famílias observa-se também ausência das sensações vibracionais e de posição das juntas, *pes cavus*, bexiga hiperativa, ataxia leve das extremidades superiores e atrofia muscular distal ^[5].

Enquanto nas PEH puras a paraplegia espástica é a característica mais proeminente, nas PEH complicadas esta é apenas mais uma característica de um fenótipo muito mais variado. Alguns tipos de PEH são extremamente raros e podem ter sido descritos em apenas uma família. Em outros casos pode se argumentar que exista mais de uma doença hereditária contribuindo para as características clínicas. A PEH tem sido associada com muitas outras condições como atrofia óptica, retinopatia, sinais extrapiramidais, amiotrofia, demência, ataxia, retardo mental, surdez, ictiose, neuropatia periférica, e epilepsia. Essas formas são geralmente autossômicas recessivas e raras, portanto é mais provável que os achados adicionais à paraplegia espástica sejam indicativos de outros diagnósticos possíveis ^[11, 31-35].

4. Diagnóstico

O diagnóstico de PEH é baseado na história individual (fraqueza bilateral progressiva dos membros inferiores e espasticidade), e na familiar (o padrão de herança) com distúrbio sensorial e/ou urgência urinária, no exame neurológico clínico (fraqueza, tônus espástico, hiperreflexia, resposta plantar extensora, comprometimento da sensação vibratória na região distal dos

membros inferiores), no teste neuropsicológico, na investigação instrumental, tais como estudos da condução do nervo, potencial motor evocado, ressonância magnética (lesões na matéria branca, corpo caloso fino, atrofia cerebelar e da medula espinhal), no eletroencefalograma, no teste da função urinária da bexiga (bexiga hipertônica) e nos testes genéticos ^[10]. Além disso, na anamnese, o relato de baixo desempenho de habilidades atléticas na infância, ou falta de interesse em esportes podem indicar uma deficiência motora prolongada ^[11].

Das PEH que desenvolvem corpo caloso fino, estão inclusas as SPG: 1, 7, 11, 15, 18, 21, 32, 46, 47 e 48. Imagens por ressonância magnética podem mostrar distúrbios da integridade da matéria branca difundida, particularmente do trato corticoespinhal. A avaliação neuropatológica pode mostrar degeneração axonal do trato corticoespinhal, pequena perda das células do corno anterior, ou desmielinização consistente com algum grau de degeneração axonal ^[10].

Garaci *et al*, 2013, propõem a investigação de características da matéria branca do cérebro para pacientes com SPG11 e SPG4, como um diagnóstico diferencial utilizando imagem de difusão por ressonância magnética com um escâner 3-Tesla (3T). Trata-se de um método não invasivo da qual ainda é possível fazer avaliações da progressão da doença ^[36].

5. Diagnóstico diferencial

É importante excluir as causas de espasticidade tratáveis, tais como deficiência de vitamina B12 (mielose funicular), de vitamina E, doenças de metabolismo de cadeias longas de ácidos graxos, doenças de aminoácidos, leucodistrofias (adrenoleucodistrofia, doença de Krabbe, leucodistrofia metacromática), deficiência de cobre, esclerose múltipla, paraplegia espástica tropical (causada pelo vírus HTLV1), distonia responsiva ao DOPA (doença de Segawa), particularmente em crianças com alteração progressiva da marcha e espasticidade dos membros inferiores, esclerose lateral amiotrófica, esclerose lateral primária (também quando os músculos bulbares e os membros superiores ficam comprometidos e a eletroneuromiografia é normal), deficiência de arginase (baixa estatura, espasticidade progressiva, perda dos marcos de desenvolvimento), ataxia de Friedreich, doença de Machado-Joseph (SCA3), doença de Alzheimer de início precoce devido a mutações no gene *PS-1*, anormalidades estruturais no cérebro e na medula espinhal e doenças mitocondriais ^[5, 10, 37]. Condições que devem ser particularmente consideradas em casos esporádicos incluem esclerose lateral primária, AR-SPG, XL-SPG recessivas,

AD-SPG de penetrância reduzida, mutações *de novo*, falsa paternidade, doença adquirida, como estenose espinhal lombar ^[5, 10, 37].

6. Epidemiologia

A prevalência de PEH varia em diferentes estudos, provavelmente pela combinação de diferentes critérios diagnósticos, metodologia epidemiológica variada e fatores geográficos, com valores entre 1,27 a 12,1/100.000, incluindo 7,4/100.000 em uma grande região ao sul da Noruega e 5,75/100.000 no distrito de Sfax (Tunísia) ^[5, 10, 38].

No estudo realizado em Portugal e na Itália, com o critério diagnóstico sugerido por Anita Harding em todos os institutos disponíveis, estima-se uma prevalência de 2,7/100.000 em Molise (Itália), 4,3/100.000 no Vale D'Aosta (Itália), e de 2,0/100.000 (Portugal). Na Cantabria (Espanha), foi reportada uma alta incidência de 9,6/100.000 ^[39] e nesse relato foram utilizados apenas dados de hospitais, embora alguns casos secundários terem sido identificados pelo exame de todos os indivíduos em risco na família em estudo ^[5, 10, 38].

As formas AD-SPG são mais frequentes que outras formas nas populações europeias: 1,27/100.000 na Irlanda, até 5,5/100.000 na Noruega e 2,4/100.000 em Portugal. As formas puras somam 70-80% das famílias com AD-SPG, e de 40-45% destes tem mutações no gene *SPAST*. Mutações na atlastina-1 são responsáveis por aproximadamente 10% das AD-SPG, mas esta frequência aumenta quando consideramos pacientes com início precoce. Mutações no gene *REEP1* (SPG31) foram reportadas em 4,5-6.5% das PEH. Mutações no gene *KIF5A* somam 3% das AD-SPG na Europa. São estimados que mutações nos genes que codificam as proteínas espastina, atlastina ou REEP1 representam 50% das AD-SPG ^[10].

As AR-SPG são mais frequentes em populações consanguíneas, com prevalência de 0,6/100.000 na Noruega e até 5,75/100.000 na Tunísia. Mutações no *KIAA1840* (SPG11) são a causa mais comum de AR-SPG e a sua frequência aumenta 60 a 80% se considerarmos pacientes de PEH com corpo caloso fino e comprometimento mental ^[10].

Casos esporádicos de PEH são bem frequentes na prática clínica, principalmente por causa de um levantamento genealógico incompleto ou por causa da penetrância incompleta das formas AD-SPG, e ocorrem com prevalência de 1,3/100000 na Noruega. Mutações em genes conhecidos,

como na SPG4, podem explicar alguns casos e aparentemente apresentam um espectro de mutações diferente do encontrado nos casos familiares ^[10, 40-43].

7. Teste genético

As PEH representam pelo menos 56 entidades genéticas discretas, e os testes genéticos podem simplificar ou complicar o processo diagnóstico. A grande maioria das mutações pode ser detectada por ensaios de sequenciamento, porém existem exceções importantes, como os casos em que existem deleções e duplicações de larga escala, não detectáveis por sequenciamento padrão, que são frequentemente observados nas SPG1, SPG2 e SPG4 ^[8, 10, 44] e necessitam de outras técnicas para investigação.

Os testes genéticos de rotina estão disponíveis apenas para alguns genes e um esquema racional de diagnóstico é usado de acordo com os critérios clínicos e genealógicos. As triagens de mutação, nos genes envolvidos com as PEH, são geralmente feitas por sequenciamento direto de Sanger ^[45] em conjunto com amplificações de sondas dependentes de ligação multiplex (*MLPA*, do inglês, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) ^[46]. Com os recentes avanços no sequenciamento de nucleotídeos, o diagnóstico genético está sendo revolucionado em diversas doenças, incluindo as PEH. A utilização de uma estratégia de amplificação baseada em arranjos, após a geração de bibliotecas de amplicons de todos os genes de PEH, seguido de sequenciamento de segunda geração (do inglês: *Next Generation Sequencing - NGS*) tem permitido acelerar, aperfeiçoar e melhorar o custo/ benefício dos diagnósticos genéticos ^[10, 47].

Os benefícios dos testes genéticos incluem: precisão no diagnóstico e avaliação de outros membros da família e no futuro, tratamentos ou intervenções que poderão ser baseados no mecanismo genético específico da doença. Entretanto, um número considerável de indivíduos de uma família, com achados clínicos e histórico familiar consistentes com PEH, apresenta teste genético normal, o que pode significar diagnóstico incorreto ou, provavelmente, conhecimento incompleto das bases genéticas das PEH. Além disso, alguns indivíduos podem ter variantes de significado incerto, pois muitos dos genes envolvidos nas PEH foram recentemente descritos e não se sabe ao certo todos os tipos de variações normais e patogênicas. E estas variantes podem confundir tanto os pacientes quanto os médicos, embora os testes genéticos com painéis incluindo

todos os genes conhecidos, ou o sequenciamento do genoma completo, poderão minimizar esses problemas, mas eles ainda apresentam um custo alto^[8, 10].

8. Tratamento

O tratamento recomendado inclui fisioterapia diária para melhorar a capacidade cardiovascular e para a parte motora o intuito é manter e melhorar tanto a força muscular quanto a marcha. A espasticidade é controlada com fisioterapia, terapia ocupacional e com dispositivos de assistência à caminhada (bengala, andador). Além disso, utilizam-se drogas para diminuir a rigidez muscular e o clônus, como o baclofeno, benzodiazepinas ou tizanidina. Se estas drogas não forem efetivas, pode-se tentar quimiodenervação com as toxinas botulínicas A ou B ou com uma bomba intratecal de Lioresal. Urgência urinária pode ser tratada com drogas anticolinérgicas, evitando o uso de dantrolene que pode induzir fraqueza irreversível^[9, 10].

Fassier *et al.*, 2013, exploraram os mecanismos por trás dos inchaços nos axônios (geralmente aglomerados compostos por neurofilamentos e organelas, que formam protuberâncias nos axônios) dos neurônios corticais, que precedem a degeneração axonal e foram observados em camundongos mutantes para a espastina (homozigoto para a deleção dos éxons de 5 a 7 na *Sp4*). Verificaram que havia um prejuízo na dinâmica dos microtúbulos, alterando o transporte axonal, levando a formação dos inchaços, mas quando utilizaram drogas em concentrações muito baixas que tem como alvo o microtúbulo (nocodazole, vinblastine, taxol) conseguiram resgatar o fenótipo. Apesar de ainda ser necessário entender e testar melhor esse processo e o uso dessas drogas, visto que o uso de nocodazole em zebrafish mutante para espastina piorou o fenótipo (não ocorre crescimento e movimentação do microtúbulo)^[48], existem pesquisas promissoras na área que visa o tratamento de PEH, neste caso em particular, da SPG4^[49].

9. Fisiopatologia

Em humanos, as vias envolvidas com o sistema motor voluntário estão organizadas em duas camadas, sendo a primeira corresponde aos axônios dos neurônios motores superiores, que se originam do córtex motor no cérebro, passam pelo tronco encefálico, pelas pirâmides do bulbo (onde aproximadamente 90% deles cruzam) e formam o trato corticoespinhal lateral na medula espinhal. Esses axônios estabelecem sinapses, direta ou indiretamente via interneurônios, com os

neurônios motores inferiores nos cornos anteriores da medula espinhal (figura 4). Na segunda camada, os axônios dos neurônios motores inferiores fazem sinapses nas junções neuromusculares, mediando a contração muscular. Já os axônios que não cruzam formam o trato corticoespinhal ventral e a maioria desses axônios cruza posteriormente na medula espinhal. Foi observado que lesões nos tratos corticoespinhais, descritos acima, levam a espasticidade ^[50].

Figura 4. Representação do trato corticoespinhal descendente. A parte superior é um corte sagital do cérebro, mostrando a área do córtex responsável pelos movimentos voluntários do corpo, o córtex motor. O restante são cortes transversais do tronco encefálico: o mesencéfalo, a ponte, bulbo raquidiano e por fim a medula espinhal, respectivamente. Os pontos roxos representam os corpos celulares dos neurônios e a linha que cruza todos os esquemas representa o axônio ^[50].

As distâncias atravessadas pelos neurônios motores superiores e inferiores são extremamente longas, com axônios que atingem até um metro de comprimento. Este tamanho requer maquinarias complexas para que a apropriada separação e distribuição intracelular de proteínas e organelas ocorram, de forma satisfatória, entre grandes distancias e permite a rápida transmissão de sinais mediando o movimento voluntário. O citoplasma do axônio pode abranger até 99% do volume total da célula, que é equipada com uma elaborada arquitetura citoesquelética, formada principalmente por microtúbulos onde proteínas motoras mediam o transporte seletivo de componentes ^[50].

A análise neuropatológica de tecido de pacientes com PEH pura revelou degeneração axonal das porções distais dos tratos corticoespinhais e da coluna posterior (*fasciculus gracilis*), e dos tratos espinocerebelares. Juntos eles constituem os mais longos axônios motores e sensores do sistema nervoso central onde há perda de células Betz na camada V do córtex motor. A comparação de tecido *post-mortem* de pacientes com PEH versus controles também mostrou que pacientes com PEH têm um número significativamente reduzido de axônios no trato corticoespinhal, especialmente na área lombar ^[51]. Um padrão específico de degeneração é visto na PEH, na qual os corpos celulares permanecem em grande parte intactos. A degeneração está limitada principalmente aos axônios, ou seja, é uma axonopatia que começa na porção distal procedendo para o corpo celular do neurônio (degeneração retrógrada) e no geral quase não há morte do neurônio ^[11, 37].

Outros achados que acompanham a degeneração axonal são a desmielinização, que se caracteriza pela perda da bainha de mielina nos axônios, e a gliose, evidenciada pela alteração da substância branca do cérebro, o que corresponde a uma mudança reativa inespecífica das células da glia em resposta a danos do sistema nervoso central, geralmente refletindo a proliferação de astrócitos (células suporte), microglia (macrófago) e oligodendrócitos (mielinização) ^[5, 50].

A hipótese atual do porque dos longos neurônios do trato corticoespinhais estarem primariamente envolvidos na patologia das PEH, é a de que existe uma ruptura no transporte axonal de macromoléculas, organelas e de outras cargas, que afetam predominantemente as regiões distais destes neurônios. Como resultado da morfologia única desses neurônios, é provável que eles tenham uma considerável dependência do tráfego de membranas, do transporte associado à microtúbulos e da organização citoesquelética. Existe também a suspeita do envolvimento da função mitocondrial para dirigir eficientemente o transporte de sinais, moléculas, e organelas a partir de e para os terminais dos neurônios ^[11].

10. Mecanismo de transporte axonal

Os componentes celulares devem ser entregues no local e momento certos para a correta função celular, o que constitui uma tarefa particularmente desafiadora nos neurônios, pois dependem de um grande esforço de manutenção e alguns viajam longas distâncias para dar suporte aos distintos domínios funcionais, que caracterizam a arquitetura neuronal altamente

polarizada ^[52, 53]. Assim, todas as células possuem um sistema regulado de transporte de membrana, que é dinâmico e permite interações entre a membrana plasmática e outros compartimentos ligados à membrana. Este tráfego é altamente organizado e começa com a formação de uma vesícula, seguido do transporte da mesma, de sua maturação e fusão com a membrana alvo ^[11].

A maquinaria de transporte axonal depende basicamente da arquitetura dos microtúbulos, sendo alimentada por duas classes distintas de motores moleculares, chamadas de dineínas (transporte retrógrado) e quinesinas (predominantemente transporte anterógrado), enquanto que o citoesqueleto de actina parece ser responsável pelos movimentos de curta distância ^[11, 54].

A dineína citoplasmática é uma proteína motora ubíqua da família AAA (do inglês: *ATPase-associated with various cellular activities*), que compreendem diversas subunidades e são responsáveis pela ligação ao microtúbulo e pelo recrutamento da carga. A dineína é necessária para uma grande variedade de processos celulares, tais como divisão celular e manutenção do complexo de Golgi, pois os neurônios são altamente dependentes da apropriada função deste complexo molecular para o transporte axonal. De fato, a dineína se mostrou envolvida no transporte axonal de diversas cargas, como por exemplo, de mitocôndrias, sinais gerado por lesão, proteínas associadas a RNA, sinalização neurotrófica dos endossomos ^[11, 54].

Já a família das quinesinas possui diversos membros, alguns dos quais são responsáveis por entregar material nos terminais nervosos. A quinesina 1 é composta por duas quinesinas de cadeias pesadas (contém os domínios ATPase e de ligação ao microtúbulo) e uma quinesina de cadeia leve (atuante no reconhecimento das cargas). Estudo iniciais com *Drosophila* demonstraram o papel crucial da quinesina 1 na manutenção axonal, pois mutações nos genes *Khc* e *Kls* levam ao acúmulo de mitocôndrias e de vesículas sinápticas, além de inchaços nos axônios devido ao prejuízo no transporte ^[11].

A manutenção das trajetórias do citoesqueleto também depende de moléculas motoras, que são responsáveis pelo transporte de pequenas unidades de microtúbulos e neurofilamentos para onde serão utilizados, seja no crescimento ou no reparo. Somado a isso, outros componentes importantes para o processo de remodelamento são as proteínas que podem cortar os microtúbulos em unidades menores ^[11].

Nos axônios, os microtúbulos são uniformemente orientados com suas porções mais direcionadas para os terminais sinápticos e as porções menos orientadas para o corpo celular. As diferenças nas direções dos movimentos e suas propriedades cinéticas resultam em distintos tipos de transporte axonal: anterógrado rápido (do corpo celular para sinapse); retrógrado rápido (da sinapse para o corpo celular); e dois tipos de transporte anterógrado lento (figura 5) ^[52].

Acredita-se que o transporte axonal lento ocorra apenas na direção anterógrada e o transporte anterógrado rápido, alimentado pelas proteínas motoras quinesinas, é usado para transportar vesículas, membranas, organelas membranosas, tais como a mitocôndria. O transporte retrógrado rápido é alimentado pelas proteínas motoras dineínas e transporta endossomos, outras organelas e sinais neurotróficos de volta para o corpo celular. Os endossomos funcionam como uma central de separação para as vias de biossíntese e de degradação. Substâncias endocitadas se movem a partir do endossomo primário tanto para o endossomo de reciclagem tubular, via citoesqueleto de actina, ou via os corpos multivesiculares carregadores endossomais para os endossomos tardios e daí para os lisossomos pelo citoesqueleto de microtúbulos. Proteínas lisossomais recém-sintetizadas também passam pelo endossomo intermediário em rota a partir do trans-Golgi para o lisossomo. Estudos com neurônios do hipocampo de ratos permitiram identificar claramente as duas classes aparentemente distintas de endossomos nos axônios: endossomos ovais/ circulares estacionários e endossomos tubulovesiculares altamente móveis, que se movem pelos microtúbulos em ambas as direções ^[37].

Figura 5. Esquema simplificado dos principais sistemas de transporte, das proteínas motoras e da organização do microtúbulo no axônio. Os microtúbulos polarizados com suas extremidades mais voltadas para o terminal nervoso e a extremidade menos voltada para o corpo celular, servindo de trilho para as proteínas motoras moverem suas cargas. As quinesinas são responsáveis pelo transporte axonal anterógrado (do corpo celular para o terminal), enquanto que as dineínas são responsáveis

pelo transporte axonal retrógrado (do terminal para o corpo celular). Baseado na velocidade do movimento e do material que é levado, o transporte axonal anterógrado pode ser dividido entre rápido e lento. O transporte anterógrado rápido move vesículas e outras organelas celulares. O transporte anterógrado lento é responsável pelo movimento do citoesqueleto e de proteína solúveis. Finalmente, o transporte axonal retrógrado é usado para a entrega de várias organelas, sinais neurotróficos e alguns vírus para o corpo celular^[52].

A identificação de diferentes genes associados à PEH evidencia que problemas na dinâmica do tráfego estão ligados a neurodegeneração vista na doença, e que falhas em diferentes locais na célula podem levar a problemas no transporte de macromoléculas e organelas, além de alterações na função das mitocôndrias ou anormalidades no desenvolvimento do axônio. A figura 6 mostra vários sítios intracelulares onde foram encontradas proteínas associadas com PEH (indicadas por posição ou função)^[11, 55].

A quinesina KIF5A (SPG10) de cadeia pesada é parte integral da proteína motora envolvida no transporte axonal anterógrado rápido dependente de microtúbulos. Mutações na *KIF5A* em humanos resultam em um efeito dominante negativo da proteína levando a perda de função, isto é, à redução da afinidade com o microtúbulo ou da velocidade de deslizamento, e estudos demonstram que mutações nessa quinesina levam a problemas no tráfego mediado por microtúbulos e a degeneração neuronal^[11, 55].

A espastina (SPG4) parece estar envolvida com o remodelamento do microtúbulo no citoesqueleto e mutações nessa proteína levam a perda de função afetando, dessa maneira, o transporte de cargas e prejudicando o crescimento e a ramificação axonal. A espastina se liga aos microtúbulos e pelo seu domínio MIT, que também está presente na espartina (SPG20), sugerindo que alterações na interação dessas proteínas estão relacionadas de alguma forma ao desenvolvimento de PEH. A atlastina (SPG3A) pode ter uma função no transporte vesicular. A paraplegina (SPG7), uma proteína mitocondrial, ou a PLP1 (SPG2), um componente da mielina, quando ausentes também apresentam problemas no transporte axonal^[11, 37].

Estudos com SPG7, HSPD1 e REEP1 sugerem que a patologia pode ser dar por problemas na função mitocondrial, devido a perturbações no sistema de controle de qualidade dessas proteínas. Isso pode acarretar em alterações mitocondriais no geral, mais particularmente na fosforilação oxidativa e na síntese de ATP, e como o transporte axonal é um processo dependente de ATP, ele também pode ser afetado. Foi observado que problemas na função mitocondrial estão envolvidos

em diversas patologias de diferentes doenças neurodegenerativas e o sistema nervoso central parece ser desproporcionalmente sensível a isso ^[11].

Figura 6. Representação esquemática do neurônio indicando possíveis sítios patogênicos de proteínas mutadas associadas às PEH ^[11].

A degeneração axonal nas PEH ocorre principalmente nos tratos mais longos, pois eles são particularmente susceptíveis ao rompimento por causa de seus longos axônios e de sua arquitetura polarizada. Os neurônios são muito dependentes de um complexo sistema de transporte projetado para garantir, de forma correta, a entrega de componentes celulares, além disso, o tráfego celular pelos microtúbulos é um processo vital no qual a célula transfere uma grande gama de constituintes de uma região para outra. Isto poderia explicar porque mutações em genes que são ubiquamente expressos, tais como a espastina e espartina, levam a degeneração de tipos bem específicos de células. A degeneração preferencial dos axônios longos pode também ser explicada pelo seu alto requerimento de energia e pode surgir como resultado de um abastecimento inadequado para o transporte axonal ^[37]

Defeitos no tráfego axonal também foram vistos em outras doenças neurodegenerativas, como na esclerose lateral amiotrófica do tipo 2, na qual mutações na alsina produzem características em comum com PEH. Acredita-se que a alsina está envolvida em atividades de pequenas GTPases próximas a membrana e modulam a montagem dos microtúbulos, assim como a organização da membrana e o tráfego em células neuronais. Os genes envolvidos na corea-

acantocitose, uma doença autossômica recessiva caracterizada por movimentos hipercinéticos e pela morfologia anormal dos eritrócitos (causado por mutações em *CHAC*), e na Doença de Niemann-Pick tipo C1, uma doença neurovisceral fatal causada por mutações em *NPC1*, também poderiam estar envolvidos nesse mecanismo ^[37].

11. SPG4 – Espastina

Aproximadamente 50% dos casos de PEH autossômico dominante e de 10 a 15% dos casos esporádicos estão associados a mutações no gene *SPAST* (SPG4), portanto a forma mais comum das AD-SPG e a mais estudada. Esse gene é expresso ubiquamente e codifica a proteína espastina, que está envolvida na atividade de quebra de microtúbulos e no transporte axonal. Mais de 300 mutações no gene *SPAST* já foram descritas em pacientes que apresentam, em sua grande maioria, a forma pura da doença. Estima-se que maioria das mutações descritas produz uma espastina truncada, por mutações *nonsense*, por alteração do quadro de leitura (42%, dentre estas de 15 a 20% são deleções exônicas) ou por alterações no sítio de *splicing* (29%). Já as mutações *missenses* são menos comuns (29%). Poucos polimorfismos foram descritos, refletindo a natureza conservada desta proteína entre as espécies ^[56-70].

A idade de início pode ocorrer desde a infância até os 60 anos com grande variabilidade intrafamiliar, além disso, a ocorrência de penetrância incompleta e antecipação clínica também já foram descritas ^[30]. Nannetti *et al*, 2012, após a avaliação de 65 pacientes italianos com PEH, observou que 56% apresentavam mutação no gene *SPAST* e a idade de início foi mais precoce nas gerações subsequentes, sugerindo um fenômeno de antecipação. Isso também foi visto por Lan *et al*, 2012, em um estudo com quatro famílias taiwanesas, porém, em ambos os estudos, esse fenômeno pode ser atribuído a avaliação clínica mais detalhada das gerações mais novas ^[59, 71-77].

As análises genéticas dos tipos de mutações encontradas no gene *SPAST* de pacientes com PEH sugerem o mecanismo de perda de função, isto é, de haploinsuficiência para a doença ^[78], portanto a degeneração axonal vista seria resultante de quantidades insuficientes de espastina. O modelo de haploinsuficiência é reforçado pelo fato de que mais de 200 mutações patogênicas no gene *SPAST* serem *nonsense* ou de mudança de quadro de leitura, muitas das quais levariam, teoricamente, ao decaimento do RNA mensageiro. Além disso, não foi detectada espastina truncada em estudos com pacientes humanos até o presente momento ^[59, 71-77].

Entretanto, a ideia de que não há espastina suficiente para desempenhar as funções necessárias não concilia com o fato de que não existem anormalidades detectáveis no desenvolvimento dos pacientes, pois a degeneração observada ocorre quase que exclusivamente no trato corticoespinhal e o início dos sintomas acontece na idade adulta. Também, seria esperado que os pacientes portadores de diferentes mutações produzissem diferentes quantidades de espastina mutada e que indivíduos portadores, da mesma mutação, não mostrassem diferenças significativas na idade de início, progressão clínica ou gravidade dos sintomas ^[59, 71-77].

Porém, a idade de início e a gravidade dos sintomas variam enormemente mesmo entre pacientes da mesma família carregando as mesmas mutações e, presumidamente, com as mesmas quantidades de espastina ativa. Além disso, na maioria das doenças neurodegenerativas, a patologia é causada pela expressão de proteínas neurotóxicas. Uma explicação alternativa é o mecanismo de ganho de função, para pelo menos alguns tipos de mutações, entretanto, é razoável pensar que as diferenças observadas entre os pacientes estão em sua capacidade de compensar perdas potenciais de atividade da espastina e/ou na sua capacidade de tolerar ou eliminar proteínas tóxicas ^[59, 71-77].

Outra característica observada, em estudos com famílias de PEH com mutações no gene *SPAST*, é uma penetrância incompleta ^[79] e uma diferença entre gêneros dentro da uma mesma família, na qual os indivíduos apresentam a mesma mutação. No geral, os homens apresentam um fenótipo mais grave, com início mais precoce e progressão mais rápida quando comparados com as mulheres, além da penetrância ser maior em homens ^[30, 80-83]. Uma das explicações sobre o porquê da diferença entre os gêneros na apresentação clínica de PEH poderia ser atribuída às diferenças hormonais que naturalmente existem, porém existem poucas evidências que suportam essa hipótese para a SPG4. Os determinantes para a diferença de gênero ainda estão longe de serem estabelecidos e sua combinação com modelos patofisiológicos ainda são escassos ^[80].

Sabe-se da grande variabilidade clínica presente em indivíduos aparentados com a mesma mutação e existem alguns estudos que tentam explicar parte desta variabilidade ^[56, 84-86]. McDermott *et al*, (2006), estudaram diversos pacientes com SPG4 que apresentavam a forma complexa da doença e tentaram encontrar uma associação entre polimorfismos no gene *SPAST* e o fenótipo complexo. Observaram que a alteração S44L segregava independentemente com outra mutação na *SPAST* e está associada a uma significativa redução na idade de início e

frequentemente a um fenótipo mais grave. A hipótese para explicar como tal alteração poderia modificar o fenótipo é que essa mutação não seria uma alteração capaz de causar uma redução crítica de espastina isoladamente, mas sim quando em conjunto com outra mutação que prejudique a função do neurônio ou em homozigose ^[58, 87, 88].

Outro polimorfismo modificador de fenótipo é o P45Q, estudado em pacientes de SPG4 norte americanos, também associado à redução na idade de início ^[88]. Existem ainda evidências que polimorfismos no DNA mitocondrial poderiam modificar o fenótipo em casos em que são observadas características de PEH complexa em tipos de SPG que normalmente apresentam a forma pura ^[89]. Porém, os mecanismos através dos quais esses polimorfismos contribuem para modulação de fenótipo ainda são desconhecidos ^[88].

Outra explicação para variabilidade vista, em alguns casos, pode ser associada a mutações em sítios de *splicing*, que geralmente levam a um *splicing* aberrante, pode ainda ocorrer penetrância parcial, isto é, um alelo mutante que produz tanto o transcrito mutado como o selvagem, sugerindo que a existência de pequenas diferenças de expressão da espastina selvagem poderia ter uma consequência funcional significativa ^[75, 90-92].

A espastina é uma proteína membro da família AAA, que é caracterizada pelo domínio em comum com a função de ATPase, o cassete AAA. A espastina está presente em diferentes isoformas dependendo do sítio de início de tradução e do *splicing* de éxons, em particular do éxon 4 (figura 7). Tem o tamanho predito de 616 aminoácidos, está localizada nos polos do fuso, na região de separação das células na citocinese, nas porções distais dos axônios e em pontos de ramificação axonal ^[93, 94]. Trabalhos experimentais sugerem que o segundo ATG (códon de início da transcrição), que leva a produção da isoforma mais curta, é o principal códon de início, embora outros estudos em ratos encontrarem que a isoforma mais longa estava expressa em maiores concentrações nos neurônios da medula espinhal do que em outros neurônios ^[11, 53, 57, 95-97].

As proteínas AAA estão envolvidas em uma ampla variedade de funções, incluindo atividade de metaloproteases, envolvimento na biogênese de organelas e vesículas, regulação do ciclo celular, montagem do ribossomo na mitocôndria ou como componente do proteossomo 26S. O domínio AAA da espastina é homólogo ao da catanina, uma proteína que corta microtúbulos e tem um papel na reorganização do microtúbulo no início da mitose ^[11, 53, 57, 95-97].

Figura 7. Domínios estruturais da espastina e as possíveis isoformas. **A.** A região hidrofóbica (HR) possivelmente forma uma alça intramembrana com formato de grampo. O domínio MIT (de interação com microtúbulo e de tráfego) forma três hélices que interage com a hélice do complexo de separação do endossomo para proteínas ESCRT-III carregando corpos multivesiculares com proteína 1B (CHMP1B) e IST1. O domínio de ligação do microtúbulo (MBD) é necessário para que a espastina se ligue ao microtúbulo e é requerido para a atividade de corte de microtúbulo. O domínio ATPase AAA contém a atividade enzimática da proteína que é essencial na quebra de microtúbulos. As regiões em que se conhece interação com outras proteínas estão indicada pelas setas. **B.** Os domínios estruturais das isoformas da espastina M1 e M87 (os números após a letra M indicam as posições do códon ATG), indicando a numeração dos aminoácidos. A posição do *splicing* alternativo do éxon 4 está indicada pela linha pontilhada, M1 é o nome dado as isoformas que utilizam o primeiro códon ATG e M87 para as que usam o segundo códon ATG [50, 95, 98].

Similar a catanina, a espastina corta e desmonta microtúbulos, regula outras funções de forma dependente de ATP, e ainda possui um domínio MIT (do inglês: *microtubule interacting and trafficking*) na região N-terminal, que pode estar envolvido nas interações com o microtúbulo e com a membrana. Desta maneira, mutações no gene *SPAST* podem ter efeitos deletérios na dinâmica do microtúbulo envolvido na estabilidade do citoesqueleto, no transporte axonal e no tráfego intracelular, o que pode levar a degeneração axonal observada nas PEH [56].

12. Espastina e o microtúbulo

Estudos iniciais em culturas de células COS-7 (um tipo celular derivado do tecido de rim de macaco [99]) e HeLa (linhagem celular imortalizada do câncer cervical de Henrietta Lacks [100]) demonstraram que a espastina mutante localiza junto com os microtúbulos e a superexpressão da espastina selvagem leva a uma desmontagem do microtúbulo. Em neurônios motores, a espastina

se encontra enriquecida em regiões celulares onde microtúbulos dinâmicos são vistos, incluindo a porção distal do axônio. Estudos comparativos em neurônios primários com espastina e catanina sugerem que o corte de microtúbulos mediado pela espastina está particularmente envolvido com a ramificação axonal. A superexpressão da espastina em neurônios do hipocampo de ratos causou um aumento na formação da ramificação nos axônios associado a um aumento de pequenos microtúbulos cortados. Já a diminuição de espastina produz neurônios com axônios mais curtos e com menos ramificações. A espastina pode, ainda, ter uma atividade adicional de agrupar microtúbulos, dado que pode agregar microtúbulos polimerizados *in vitro*, e formas mutantes podem induzir a estabilização do microtúbulo quando superexpressas em linhagens celulares [11, 37, 94, 101].

Para investigar o efeito da atividade da espastina e de mutações *in vivo*, vários estudos foram feitos em diversos modelos animais para PEH que mostraram o efeito da espastina no crescimento axonal e no tráfego. O nocaute da espastina selvagem, em *Drosophila* e em *zebrafish*, levou a um desenvolvimento axonal e função sináptica anormais. No camundongo com deleção no gene *SPAST*, que leva a um códon de parada prematuro (mimetizando o mutante patógeno humano), foram descritos degeneração axonal e o acúmulo de mitocôndria em inchaços anormais próximos ao cone de crescimento axonal. Estes achados podem ser correlacionados com humanos por causa da distribuição anormal de mitocôndrias, indício de problemas com o transporte encontrado em neurônio motores na medula espinhal de tecido *post-mortem* de indivíduos com PEH associados a mutações na espastina [11, 102-104].

Uma ligação do envolvimento da espastina com a via endocítica veio dos achados de que a espastina se liga a proteína modificadora de cromatina 1B (CHMP1B), associada com o complexo de separação endossomal, provavelmente mediado pelo domínio MIT. Este domínio é encontrado em diversas proteínas com função no endossomo, incluindo VPS4/SKD1 (uma ATPase AAA envolvida no tráfego endossomal) e nexina 15. O gene *Spartin* (SPG20) também expressa uma proteína que contém o domínio MIT. A colocalização parcial da espastina com um marcador de endossomo e retículo endoplasmático também foi descrito, sugerindo que a espastina possa funcionar localmente regulando microtúbulos responsáveis pelo movimento de organelas membranosas nos axônios [11, 53, 95, 105].

A porção C-terminal da espastina (do resíduo 270 em diante) contém os domínios que são necessários para quebrar microtúbulo, nessa região da proteína também há o domínio de ligação ao microtúbulos, situado entre os resíduos 270 e 328, e o domínio ATPase AAA, abrangendo os resíduos 342-599. Esse último domínio é encontrado em uma grande família de proteínas que tipicamente usa energia da hidrólise de ATP para catalisar alterações conformacionais em outras proteínas, e como em todos os domínios AAA, a espastina contém um domínio de ligação ao nucleotídeo α e β e um pequeno de quatro hélices (HBD), que juntos formam o núcleo enzimático da proteína. Ainda contém duas hélices adicionais, não encontrado em outras proteínas com domínio AAA, que interage com o domínio que se liga a nucleotídeos ^[50, 105].

A espastina ligada forma um anel hexamérico com um poro central proeminente. Foi sugerido que a espastina polimerizada se liga ao microtúbulo e o desestabiliza puxando a porção C-terminal da tubulina através de seu poro central. No estado não ligado, a espastina existe como um monômero ou um dímero fraco. (figura 8) ^[50, 105].

Figura 8. Representação da espastina. **A. B.** Reconstrução da espastina de *C. elegans* por *Ab initio* SAXS ^[90]. Vista equatorial (**A.**) e axial (**B.**). Tamanho máximo dos diâmetros em angstrom. **C.** Mecanismo proposto de corte de microtúbulo pela espastina. O núcleo AAA da espastina em azul com as alças 1, 2 e 3 em destaque. O domínio MIT é representado pelos ovais em amarelo. Os heterodímeros de tubulina que formam o microtúbulo estão representados em verde e a sua região C-terminal está representada em vermelho ^[105].

A região N-terminal da espastina contém sequências que mediam a interação com diversas proteínas adaptadoras que, por sua vez, recrutam a espastina para os locais onde ela irá exercer a sua função. A maioria desses adaptadores são proteínas integrais de membrana ou proteínas

associadas à membrana, sugerindo que a atividade de quebrar microtúbulos da espastina é específica de algumas membranas ^[50]. Além disso, a espastina interage com a atlastina-1 e com membros da família das proteínas que modelam o retículo endoplasmático, indicando que algumas das mais comuns proteínas envolvidas com PEH podem ter papéis interligados na formação da rede do retículo endoplasmático ^[106, 107].

A espastina é necessária para a completa abscisão no estágio final da citocinese, atua em parte desfazendo a estrutura tubular da membrana plasmática, densamente comprimida, com um conjunto de microtúbulos antiparalelos e de proteínas conhecida como corpo de Flemming, que conectam duas células filhas nos estágios finais da citocinese. Em células em que não há espastina, o evento em que há o rompimento do microtúbulo, que normalmente acompanha a abscisão, não ocorre, o que sugere a dependência da espastina nesse processo. A citocinese é um exemplo de como a regulação dos microtúbulos pela espastina pode estar ligada a modelagem de membrana, e pode ter relevância no sistema nervoso, uma vez que a perda da espastina diminui a ramificação axonal em cultura de neurônios primários e a ramificação axonal também envolve a coordenada regulação dos microtúbulos e a modelagem da membrana ^[50].

Para entender como as mutações na *SPAST* afetam os neurônios humanos foram geradas células-tronco pluripotentes induzidas a partir de fibroblastos, de dois pacientes que carregam a mutação *nonsense* c.1684C>T e dois controles. Todos foram diferenciados em neurônios e em glia para comparações de diversos parâmetros. Foi observado que nas células dos pacientes de SPG4 diferenciadas todas as isoformas de espastina estavam reduzidas, além disso, também houve redução da complexidade dos neuritos (quaisquer projeções do corpo celular de um neurônio, podem ser subdivididos em dendritos e axônios) acompanhada de um desequilíbrio no transporte axonal, no transporte retrógrado ^[108, 109].

No nível de ultraestrutura, foi possível ver inchaços nos neuritos e microtúbulos rompidos, e alguns desses inchaços continham tubulina desacetilada e detironisada. Para tentar recuperar o fenótipo das células dos pacientes de SPG4, superexpressaram a proteína catanina, que compensou parcialmente a dinâmica dos microtúbulos. Também superexpressaram as isoformas M1 ou M87 da espastina, neste caso, houve a recuperação dos tamanhos dos neuritos, melhora da ramificação, aumento do número de neuritos primários e redução dos inchaços das células neuronais dos pacientes de SPG4 ^[108, 109].

Os pesquisadores sugerem que as formas patogênicas da espastina mutada são iniciadas pelo primeiro códon ATG e a sua isoforma longa foi encontrada em grandes concentrações em neurônios da medula espinhal de ratos adultos, mas não encontrada em outros neurônios. A expressão de um pequeno peptídeo mutado, comprometendo a região N-terminal (aminoácidos de 1-273), em neurônios de ratos, expressado a partir do primeiro códon ATG, foi deletério para o crescimento axonal. A expressão desse peptídeo em axônio da lula gigante inibiu o transporte axonal rápido, enquanto que a expressão de um peptídeo curto similar traduzido a partir do segundo códon ATG não apresentou esse efeito deletério ^[11, 41, 76, 110].

Entender sobre esses mecanismos é importante, não somente para auxiliar os pacientes de SPG4 como também para ajudar a entender mecanismos envolvidos em outras doenças degenerativas mais devastadoras, como as doenças do neurônio motor, doença de Alzheimer (DA) e doença de Huntington. Um exemplo disso é a hipótese da perda de microtúbulos durante a doença de Alzheimer, uma doença do sistema nervoso em que a proteína tau se torna anormalmente fosforilada, e por isso, se desliga do microtúbulo. Assim que o microtúbulo perde tau, ele diminui em número e em densidade, e essa perda impacta negativamente na capacidade do neurônio de manter o transporte axonal e conexões sinápticas. Uma hipótese do porque isso acontece está relacionada a função da tau que normalmente protegeria o microtúbulo de ser destruído por varias outras proteínas no axônio ^[11, 111].

Além disso, na DA, a proteína beta amiloide (A β) acumula-se no cérebro durante a progressão da doença, o que também provoca a hiperfosforilação de tau, mas a própria A β promove a perda de microtúbulos, independentemente de tau. Outra hipótese é que as proteínas que cortam microtúbulos como a catanina e a espastina, contribuiriam, pelo menos em parte, para a degradação do microtúbulo. Aparentemente a via da catanina é mais relevante nos axônios e a via da espastina nos dendritos ^[111].

Zempel *et al* (2013) expuseram neurônios primários maduros a oligômeros de A β e observaram a quebra de microtúbulos nos dendritos invadidos por tau. A má distribuição de tau resultou em um aumento de TTLL6 (do inglês: *Tubulin-Tyrosine-Ligase-Like-6*) nos dendritos e isso gerou um aumento significativo na poliglutamilação de microtúbulos. Como a espastina tem forte preferência por microtúbulos poliglutamilados, estes ficam mais susceptíveis a cortes pela espastina, assim como para outras proteínas que cortam microtúbulo ^[111].

Outra relação sugerida entre SPG4 e doença de Alzheimer está na alta concentração de membros da família *Alu* em íntrons e em sequências que flanqueiam a *SPAST*. Isso poderia predispor a ocorrência de rearranjos intragênicos e a presença de deleções genômicas na parte final do éxon da *SPAST*, que poderiam afetar a expressão de *SLC30A6* (um transportador de zinco), o loco *downstream* mais próximo, um gene já conhecidamente relacionado com a doença de Alzheimer e que poderia explicar alguns casos de demência em pacientes com SPG4 ^[112]. Diante de todos desses achados, a espastina pode ser um importante componente para a compreensão da doença de Alzheimer.

13. SPG4 no Brasil

Franca *et al.*, (2013), avaliaram a frequência e o espectro de mutações de pacientes de PEH em um grupo de 55 pacientes brasileiros pertencentes a 34 famílias não relacionadas. Os pacientes foram recrutados a partir de três centros do sul e sudeste do Brasil, 23 famílias da Universidade de Campinas, sete famílias da Universidade Federal do Paraná, e quatro famílias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul ^[113].

Foram encontradas mutações no gene *SPAST* em 35% dos indivíduos desse grupo (24 pacientes de 12 famílias não relacionadas). Todos os indivíduos com mutações identificadas apresentam uma PEH de forma pura, com início dos sintomas no começo da vida adulta. Oitos das mutações encontradas já haviam sido descritas e outras quatro novas mutações foram identificadas (tabela 5) ^[113].

Tabela 5. Mutações identificadas no gene *SPAST* em 12 famílias brasileiras com paraplegia espástica hereditária autossômica dominante ^[113].

Família	Idade de início (anos)	# Pacientes (homem/mulher)	Mutação	Localização no gene	Mudança na proteína	Tipo de mutação
PR1	18	1(1/0)	c.162C>T	Ex 1	Ex 1 skipping	Splice site
PR2	29	3(1/2)	c.839_840delAG	Ex 5	p.Q280Rfs289	Frameshift deletion
CP1	25	2(2/0)	c.1255G>T	Ex 10	p.G419X	Nonsense
PA1	23	1(0/1)	c.1267G>T	Ex 10	p.V423L	Missense
CP2	7	1(0/1)	c.1378C>T	Ex 11	p.R460C	Missense
CP3	34	1(0/1)	c.1413+5G>A	In 11	Ex11skipping+frameshift	Splice site
PR3	1	2(0/2)	c.1495C>T	Ex 13	p.R499C	Missense
CP4	26	2(1/1)	c.1535_1535delA	Ex 13	p.E512Gfs529	Frameshift deletion

CP5	30	4(3/1)	c.1651G>C	Ex 15	p.A551P	Missense
CP6	32	2(1/1)	c.1667_1668delCA	Ex 15	p.A556Gfs575	Frameshift deletion
PA2	25	1(1/0)	c.1741C>T	Ex 17	p.R581X	Nonsense
PR4	30	4(3/1)	c.1849T>G	Ex 17	p.*616Eext*46	Non-stop change

Starling *et al.* (2002) observaram que na família Irlandesa (com ligação entre a doença e marcadores próximos ao gene *SPAST*) estudada por Mc Monagle *et al.* (2001) o número de mulheres carregando o haplótipo de risco e que não apresentavam os sinais clínicos de PEH era maior do que o de homens carregando o mesmo haplótipo, ou seja, as mulheres em questão seriam assintomáticas. Nosso grupo (Starling *et al.* 2002) - identificou uma família brasileira na qual esta situação se repetia em relação a um loco próximo ao gene *SPAST*. Dentre treze mulheres carregando o haplótipo de risco, apenas uma possuía sintomas de PEH pura; enquanto todos os 24 homens, distribuídos em três gerações, carregando este haplótipo e com mais de 35 anos de idade eram clinicamente afetados (figura 9). Apesar do valor de *lod score* ^[114] para um dos marcadores dessa região ser bem alto (8,29 para $\theta=0$) não foi identificada nenhuma mutação na região codificadora do gene *SPAST* naquele momento ^[82, 115].

Figura 9. Análise de haplótipo de uma família com paraplegia espástica pura de herança autossômica dominante. As setas indicam regiões onde ocorreu recombinação ^[82].

Posteriormente esta família foi novamente analisada por Mitne-Neto *et al.* (2007), e nesse estudo foram investigados 52 indivíduos, de três gerações diferentes (figura 10), que

apresentavam a forma pura de PEH com diferenças significativas na penetrância entre homens e mulheres (figura 11). A mutação causadora da doença nessa família foi identificada como uma duplicação parcial da *SPAST* (exon10_12dup) em tandem (c.1246-2896_1493+523dup), utilizando a técnica de MLPA. Esta duplicação também foi observada no RNA mensageiro e gera um códon de parada prematuro [81].

Das 52 pessoas analisadas, 30 (destas 14 mulheres) eram portadores da duplicação, sendo que 12 (destas 9 mulheres) não apresentaram queixas [81].

Figura 10. Pedigree da família com os 52 indivíduos estudados por Mitne *et al.*, 2007. Os símbolos abaixo dos indivíduos correspondem a condição molecular e neurológica. N: não foi detectado mutação, 0: assintomático na avaliação neurológica, 1: assintomático com anormalidades neurológicas, 2: anormalidades neurológicas moderadas, 3: anormalidades neurológicas graves, capaz de andar apenas com auxílio de bengala ou andador [81].

Figura 11. Curvas de Kaplan-Meier. A idade de início para mulheres, em verde (n=14) e em azul para homens (n=16). Resultado é significativamente diferente entre homens e mulheres portadores da mutação ($p=0.017$, Log Rank Mantel-Cox). Esses valores são aproximados, pois não podemos definir a idade em que os assintomáticos manifestarão a doença. Cada traço presente nas curvas representa um indivíduo não manifestante (com exceção da curva das mulheres onde o segundo traço representa duas mulheres assintomáticas com a mesma idade). Cada degrau da curva representa um indivíduo manifestante. ^[81].

A ocorrência de pacientes com a mesma mutação e com fenótipo discordante, identificados a partir de estudos de correlação genótipo: fenótipo abre um leque de questões complexas e muito importantes. Se conseguirmos entender o que “protege” alguns pacientes dos efeitos patogênicos de uma mutação, poderemos abrir novos caminhos para futuros tratamentos dessas patologias, além da compreensão de mecanismos que podem ser comuns a diversas doenças neurodegenerativas.

Assim a presente pesquisa pretendeu estudar se existem marcadores genéticos que apontem para fatores que expliquem o porquê, dentro de uma mesma família com indivíduos portadores da mesma mutação, existam pessoas que apresentam sintomas graves para o espectro das PEH puras e outras são assintomáticas. Para tentar responder essa pergunta optou-se por utilizar as técnicas de microarranjos de expressão e de genotipagem a partir de RNA e DNA extraídos de sangue periférico, comparando indivíduos sintomáticos e assintomáticos.

II. Objetivos

Análise genético-molecular de pacientes portadores da mesma mutação, porém com quadro clínico discordante (sintomáticos e assintomáticos).

1. Objetivos específicos

Avaliar as diferenças de abundâncias de transcritos (RNA mensageiro) entre as amostras de pacientes assintomáticos e sintomáticos.

Avaliar marcadores genéticos, polimorfismos de base única, entre as amostras de pacientes assintomáticos e sintomáticos.

III. Casuística e Métodos

1. Casuística

O Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-tronco (CEGH-CEL), do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP), local onde se realizou esta pesquisa, já atendeu mais de vinte e seis mil indivíduos, constituindo um dos maiores banco de DNA humano de doenças neuromusculares do mundo. Isso permitiu identificar famílias nas quais há a ocorrência de indivíduos com quadros discordantes. Estudos de correlação genótipo: fenótipo têm mostrado que indivíduos da mesma família, carregando a mesma mutação patogênica, podem ter quadro clínico muito distinto. A explicação para esta questão pode estar na procura por genes modificadores, no padrão de expressão, na análise proteômica (seja por ligantes a proteínas ou no dobramento das mesmas), ou em mecanismos epigenéticos.

A família, do presente estudo, foi avaliada no CEGH-CEL (USP), sob consentimento informado, pelo Prof. Dr. Fernando Kok e sua equipe (tabela 7), e todos apresentam o diagnóstico de PEH pura. Foram avaliados 35 novos indivíduos para a mutação presente na família (figura 12), como publicado em Mitne *et al.*, (2007). Desses, 14 apresentam a mutação e foram incluídos no estudo totalizando 44 indivíduos (figura 13), dos quais 30 já fizeram parte da pesquisa desenvolvida por Mitne *et al.*, (2007).

Todos os indivíduos incluídos nesse estudo apresentam a mutação c.1246-2896_1493+523dup, dado que o objetivo é entender o que poderia explicar, pelo menos em parte,

a penetrância incompleta da mutação nesta família. Além disso, todos os indivíduos foram triados para os polimorfismos S44L e P45Q no gene *SPAST* por sequenciamento direto de Sanger [88, 116, 117] e nenhum paciente possui essas alterações.

Estes pacientes foram classificados segundo o fenótipo e o genótipo, como descrito na tabela 6.

Tabela 6. Classificação clínico-genética.

Estágio	Fenótipo	Genótipo
0	sem queixa clínica	sem mutação na <i>SPAST</i>
1	sem queixas motoras, com exame neurológico normal	com mutação na <i>SPAST</i>
2	sem queixas motoras, com exame neurológico anormal (espasticidade, exaltação de reflexos, sinais de Babinski)	com mutação na <i>SPAST</i>
3	Sintomático, com grau leve de comprometimento (marcha independente, sem necessidade de apoio)	com mutação na <i>SPAST</i>
4	Sintomático, com grau moderado de comprometimento (necessita de apoio para se locomover - bengala ou andador)	com mutação na <i>SPAST</i>

Figura 12. Panorama geral do pedigree da família em estudo. Os quadrados em vermelho destacam os novos indivíduos avaliados. O que não está destacado nos quadrados vermelhos representa os outros 52 indivíduos descritos anteriormente no trabalho de Mitne *et al.*, 2007.

Figura 13. Pedigree com todos os indivíduos incluídos no estudo. Abaixo de cada indivíduo tem a data de nascimento (dia/mês/ ano) e o número de identificação da base de dados do CEGH-CEL.

Tabela 7. Dados clínicos dos indivíduos da família avaliados (a notação dos indivíduos se refere à figura 13).

Classificação genético-clínico	ID no Pedigree	Registro CEGH-CEL	Sexo	Idade de início (anos)	Idade da avaliação (anos)	Duração da doença (anos)	Gravidade da doença	Reflexos dos membros inferiores	Reflexo plantar	Sensibilidade vibratória diminuída nos membros inferiores	<i>pes cavus</i>	Espasticidade	Distúrbio esfinteriano
1	IV: 15	25585	F		49		sem	normal	flexão	sim	não	sem	não
1	III: 15	12481	F		58		sem	normal	flexão	não	não	sem	sim
1	III: 22	12494	F		55		sem	normal	flexão	não	não	sem	não
1	IV: 11	22280	F		38		sem	normal	flexão	não	não	sem	não
1	IV: 4	22283	F		38		sem	normal	flexão	não	não	sem	sim
1	IV: 5	22284	F		32		sem	normal	flexão	não	não	sem	sim
1	IV: 18	25596	M		48		sem	normal	flexão	não	não	sem	não
1	IV: 8	25671	M		48		sem	exaltados	flexão	não	não	sem	não
1	IV: 14	12482	M		31		sem	normal	flexão	não	não	sem	não
1	IV: 3	9485	M		42		sem	normal	flexão	não	não	sem	não
1	III: 4	9613	M		55		sem	normal	flexão	não	não	sem	não
2	V: 2	25591	F		24		sem queixa motora	exaltados	flexão	não	não	sem	não
2	V: 3	25604	F		23		sem queixa motora	normal	flexão	não	não	sem	não

2	IV: 17	25599	F		33		sem queixa motora	exaltados	flexão	não	não	sem	não
2	IV: 10	25670	F		43		sem queixa motora	exaltados	flexão	não	não	sem	sim
2	III: 24	12496	F		52		sem queixa motora	normal	extensão	não	não	sem	sim
2	III: 20	12495	F		62		sem queixa motora	exaltados	extensão	não	não	sem	sim
2	III: 25	9710	F		45		sem queixa motora	exaltados	extensão	não	não	leve	não
2	III: 8	9669	F		65		sem queixa motora	exaltados	extensão	não	não	leve	não
2	V: 4	25576	M		30		sem queixa motora	exaltados	flexão	não	não	sem	não
2	III: 28	25593	M		44		sem queixa motora	exaltados	flexão	não	não	sem	não
2	IV: 9	25659	M		46		sem queixa motora	exaltados	flexão	não	não	sem	sim
3	III: 26	25589	F	35	66	31	leve	exaltados	extensão	sim	não	moderada	sim
3	III: 18	12489	F	38	43	5	leve	exaltados	extensão	não	não	leve	sim
3	III: 19	10512	F	46	66	20	leve	exaltados	extensão	não	não	leve	sim
3	IV: 1	21993	F	48	49	1	leve	exaltados	extensão	não	não	leve	não
3	IV: 7	22285	F	23	25	2	leve	exaltados	ausente	não	não	leve	sim
3	III: 14	11480	F	17	59	42	leve	exaltados	extensão	não	não	leve	não
3	III: 29	25600	M	26	60	34	leve	exaltados	extensão	não	não	leve	sim
3	IV: 2	9484	M	29	38	9	leve	exaltados	extensão	sim	não	leve	não
3	III: 23	9456	M	41	46	5	leve	exaltados	extensão	não	não	leve	sim
3	IV: 13	21992	M	27	32	5	leve	exaltados	extensão	não	não	leve	não
3	III: 5	11490	M	50	67	17	leve	exaltados	extensão	sim	não	leve	sim
3	V: 1	22286	M	1	10	9	leve	exaltados	extensão	não	não	leve	sim
3	III: 17	9320	M	12	46	34	leve	exaltados	extensão	sim	sim	leve	sim
3	III: 21	10533	M	54	58	4	leve	exaltados	extensão	sim	sim	leve	sim
3	IV: 12	11349	M	1	33	32	leve	exaltados	extensão	sim	sim	moderada	não
4	III: 31	25598	M	22	72	50	moderado	exaltados	extensão	não	não	moderada	sim
4	IV: 20	25578	M	50	60	10	moderado	exaltados	extensão	não	não	moderada	sim
4	III: 7	11488	M	26	63	37	moderado	exaltados	extensão	sim	não	moderada	não
4	III: 10	11485	M	18	73	55	moderado	exaltados	extensão	sim	não	moderada	sim
4	III: 12	11484	M	25	67	42	moderado	exaltados	extensão	ND	não	moderada	sim
4	III: 11	11483	M	49	68	19	moderado	exaltados	extensão	ND	não	moderada	sim
4	III: 3	9255	M	38	63	25	moderado	exaltados	extensão	sim	sim	moderada	sim

Legenda: M=masculino; F=feminino; ND: não disponível

A penetrância da doença na família é de 0,5 (com > 30 anos), e considerando a penetrância por sexo, em mulheres o valor é de 0,3 e em homens é de 0,67. A média de idade de início da doença na família é de 30,55 anos (desvio padrão de 16,06 anos e intervalo e confiança de $30,55 \pm 6,71$ anos). Considerando apenas as mulheres a média da idade de início é de 34,5 anos (desvio

padrão de 12,37 anos e intervalo de confiança de $34,5 \pm 9,9$ anos) e considerando apenas os homens a média é de 29,06 anos (desvio padrão de 17,37 anos e intervalo e confiança de $29,06 \pm 8,51$ anos).

Foram considerados assintomáticos os indivíduos sem queixas motoras e sem espasticidade e foram considerados sintomáticos os indivíduos com queixas motoras e com espasticidade (tabela 8).

Tabela 8. Classificação final dos indivíduos incluídos no estudo (anotação dos indivíduos se refere à figura 14). Os indivíduos com a classificação genético-clínico 1 e 2 são considerados assintomáticos e os com 3 e 4 são considerados sintomáticos.

Registro	Identificação	Sexo	Data de nascimento	Classificação
12481	III: 15	F	30.09.1947	Assintomático
12494	III: 22	F	30.07.1949	Assintomático
22280	IV: 11	F	31.08.1967	Assintomático
22283	IV: 4	F	04.10.1968	Assintomático
22284	IV: 5	F	28.07.1974	Assintomático
25585	IV: 15	F	29.02.1964	Assintomático
12496	III: 24	F	27.12.1953	Assintomático
12495	III: 20	F	10.10.1943	Assintomático
9710	III: 25	F	02.02.1961	Assintomático
9669	III: 8	F	27.06.1941	Assintomático
25591	V: 2	F	23.02.1989	Assintomático
25604	V: 3	F	10.10.1989	Assintomático
25599	IV: 17	F	14.02.1980	Assintomático
25670	IV: 10	F	07.05.1969	Assintomático
12489	III: 18	F	09.12.1962	Sintomático
10512	III: 19	F	21.06.1939	Sintomático
21993	IV: 1	F	07.04.1957	Sintomático
22285	IV: 7	F	14.08.1981	Sintomático
11480	III: 14	F	10.01.1947	Sintomático
25589	III: 26	F	23.09.1946	Sintomático
12482	IV: 14	M	11.06.1974	Assintomático
9485	IV: 3	M	02.12.1963	Assintomático
9613	III: 4	M	10.08.1949	Assintomático
25596	IV: 18	M	24.05.1964	Assintomático
25576	V: 4	M	12.10.1982	Assintomático
25593	III: 28	M	15.07.1968	Assintomático
25659	IV: 9	M	02.12.1965	Assintomático
25671	IV: 8	M	10.06.1963	Assintomático
22286	V: 1	M	21.09.1995	Sintomático
9320	III: 17	M	07.02.1960	Sintomático
11349	IV: 12	M	18.08.1972	Sintomático

9484	IV: 2	M	25.02.1968	Sintomático
9456	III: 23	M	31.08.1959	Sintomático
21992	IV: 13	M	15.05.1963	Sintomático
11490	III: 5	M	19.09.1939	Sintomático
11488	III: 7	M	12.04.1943	Sintomático
11485	III: 10	M	01.12.1932	Sintomático
11484	III: 12	M	15.10.1939	Sintomático
11483	III: 11	M	01.06.1938	Sintomático
9255	III: 3	M	29.03.1943	Sintomático
25600	III: 29	M	02.07.1952	Sintomático
25598	III: 31	M	14.05.1940	Sintomático
25578	IV: 20	M	06.01.1953	Sintomático
10533	III: 21	M	09.03.1948	Sintomático

F: feminino, M: masculino

2. Coleta de material biológico

Foi coletado sangue periférico para extração de DNA de acordo com a técnica padrão ^[118] dos 44 pacientes e também foi coletado sangue periférico para extração de RNA de 38 pacientes, utilizando o sistema o *PAXgene Blood RNA Tube*, da BD Company (nº de catálogo 762165) e *PAXgene Blood RNA Kit IVD*, da Qiagen (nº de catálogo 762174), conforme as instruções dos fabricantes.

As amostras de DNA foram utilizadas para a detecção da mutação no gene *SPAST* nos integrantes da família (c.12462896_1493+523dup), para triagem do polimorfismo S44L e P45Q no gene *SPAST* e para genotipagem. Já as amostras de RNA foram utilizadas para os ensaios de microarranjo de expressão gênica.

3. Microarranjos

Os microarranjos consistem em um arranjo pré-definido de moléculas de DNA (fragmentos de DNA genômico, cDNA ou oligonucleotídeos) quimicamente ligadas (via ligação covalente) à uma superfície sólida, usualmente lâminas revestidas com compostos que conferem carga positiva. Os microarranjos também podem ser preparados em membranas de nylon positivamente carregadas. São utilizados na detecção e quantificação de ácidos nucleicos (mRNA na forma de cDNA ou DNA genômico) provenientes de amostras biológicas, as quais são postas para hibridar com o DNA fixado no arranjo (hibridação por complementaridade de bases). A detecção é possível, pois as

amostras são marcadas com fluorocromos cianina 3 (Cy3) ou cianina 5 (Cy5) quando utiliza-se microarranjos em vidro ou com o isótopo ^{33}P quando os arranjos são preparados em membranas de nylon^[119, 120].

Para ambos os casos se faz necessário à geração de uma imagem da hibridação, que é obtida por meio de leitores (*scanners*) a laser (para os fluorocromos) ou leitores de fósforo (para o isótopo ^{33}P). Para a preparação dos microarranjos, utilizam-se robôs altamente precisos que aplicam diferentes amostras de DNA em diminutos pontos (*spots*) no centro de uma lâmina com a superfície quimicamente preparada (densidade aproximada de 10.000 pontos/cm²). Nota-se que cada ponto representará um segmento gênico em particular. Quanto mais pontos no microarranjos, mais abrangente ele será na análise. Também são preparados oligo-microarranjos pela tecnologia de síntese *in-situ* (mais apropriadamente referidos como DNA-chips). Neste caso, os oligonucleotídeos (também chamados de sondas) são sintetizados na própria lâmina numa densidade de 30-50.000 pontos/cm²^[119, 120].

Inicialmente, o uso mais frequente dos microarranjos era na determinação da expressão gênica (perfil do transcriptoma). O alto desempenho desta técnica permite determinar a expressão diferencial de milhares de genes em um único experimento.

Os microarranjos também podem conter sondas para detectar marcadores conhecidos como polimorfismo de nucleotídeo único (SNP – *single-nucleotide polymorphism*). Os SNP ocorrem ao acaso a cada 100 a 300 nucleotídeos no decurso do genoma humano, nos genes ou em regiões intergênicas, e em determinados locos, certas sequências de SNP são compartilhadas por certos segmentos da população. Além disso, certos SNP segregam conjuntamente com genes associados a certas condições mórbidas. Se houver ligação entre a presença ou a ausência de um dado SNP com uma doença genética, esse SNP pode ser usado como um marcador genético para testes^[121].

A presença de SNP como sondas em microarranjos de DNA permite que se rastreiem simultaneamente milhares de genes que podem estar envolvidos em doenças monogênicas, ou com herança multifatorial, possibilitando analisar o genoma de uma pessoa quanto a dezenas ou centenas de alelos, inclusive as que podem predispor a doenças de etiologia complexa, como asma e diabetes^[121].

Os ensaios de microarranjo de expressão foram realizados para 38 pacientes (tabela 9), a partir do RNA extraído de sangue periférico. Como outros estudos obtiveram sucesso utilizando o perfil de expressão a partir de sangue periférico para o estudo de doenças neurológicas ^[122-126], esta estratégia parece adequada. Utilizou-se a plataforma da *Affymetrix* (<http://www.affymetrix.com>) com chips *GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array* seguindo as especificações do fabricante. A pre-análise das imagens foram feitas com o *programa Affymetrix® Expression Console™ Software* para avaliação da qualidade e similaridade técnica entre os experimentos. As análises foram feitas com o programa disponível gratuitamente e de código aberto R (www.r-project.org) a partir dos pacotes do Bioconductor (www.bioconductor.org), seguindo os seguintes passos:

1. Verificada a qualidade dos microarranjos através da análise de gráficos box-plot, correlação e de componentes principais;
2. Os dados foram normalizados com o método RMA (*Robust Multi-array Average*) ^[127],
3. Aplicado o método ComBat (<http://jlab.byu.edu/ComBat/Abstract.html>) para a remoção de efeitos de *batch* (ou variáveis indesejadas) ^[128];
4. Aplicado filtro de dados IQR (*Inter-Quartile-Range*) para remover genes com expressão pouco variável;
5. O método *Rank Products* (RP) ^[129] valor-p (nível descritivo) < 0.05 corrigidos por FDR (*False Discovery Rate*) ^[130] foi usado para a seleção dos genes diferencialmente expressos (DEG, do inglês: *Differentially Expressed Genes*).
6. A análise funcional (*in silico*) foi feita com a ferramenta IPA (*Ingenuity Pathway Analysis* - <http://www.ingenuity.com/>). Foram utilizados os parâmetros padrão "Molecules per Network=35, Networks per Analysis=25", todos os bancos de dados disponíveis e somente consideradas as ligações diretas entre os genes nas redes hipotéticas.

Grupo amostral:

19 assintomáticos (8 homens e 11 mulheres)

19 sintomáticos (14 homens e 5 mulheres)

Total: 38 amostras

Grupos considerados para as análises:

Homens assintomáticos x homens sintomáticos

Mulheres assintomáticas x mulheres sintomáticas

Assintomáticos x sintomáticos

Tabela 9. Tabela com pacientes do qual foram realizados os ensaios de microarranjo de expressão.

Registro	Sexo	Data de nascimento	Classificação (disability)
12481	F	30.09.1947	Assintomático
12494	F	30.07.1949	Assintomático
12495	F	10.10.1943	Assintomático
12496	F	27.12.1953	Assintomático
22280	F	31.08.1967	Assintomático
22283	F	04.10.1968	Assintomático
25585	F	29.02.1964	Assintomático
25591	F	23.02.1989	Assintomático
25599	F	14.02.1980	Assintomático
25604	F	10.10.1989	Assintomático
25670	F	07.05.1969	Assintomático
10512	F	21.06.1939	Sintomático
11480	F	10.01.1947	Sintomático
12489	F	09.12.1962	Sintomático
21993	F	07.04.1957	Sintomático
25589	F	23.09.1946	Sintomático
9485	M	02.12.1963	Assintomático
9613	M	10.08.1949	Assintomático
12482	M	11.06.1974	Assintomático
25576	M	12.10.1982	Assintomático
25593	M	15.07.1968	Assintomático
25596	M	24.05.1964	Assintomático
25659	M	02.12.1965	Assintomático
25671	M	10.06.1963	Assintomático
9255	M	29.03.1943	Sintomático
9320	M	07.02.1960	Sintomático
9456	M	31.08.1959	Sintomático
9484	M	25.02.1968	Sintomático

11349	M	18.08.1972	Sintomático
11483	M	01.06.1938	Sintomático
11485	M	01.12.1932	Sintomático
11490	M	19.09.1939	Sintomático
21992	M	15.05.1963	Sintomático
22286	M	21.09.1995	Sintomático
25578	M	06.01.1953	Sintomático
25598	M	14.05.1940	Sintomático
25600	M	02.07.1952	Sintomático
10533	M	09.03.1948	Sintomático

F: feminino, M: masculino

Além dos microarranjos de expressão, foram realizados ensaios de microarranjos de SNP para os 44 pacientes, utilizando a plataforma da *Affymetrix* com os chips *Genome-Wide Human SNP Array 6.0* (que incluem sondas para 906,600 SNP, e 946,000 *copy number variations* - CNV) seguindo as especificações do fabricante. A análise de qualidade do contraste (*contrast QC metric*), que mede o quão bem é possível classificar entre os três genótipos possíveis, e a quantidade de SNP genotipados por paciente (*QC Call Rate metric*) foi avaliada pelo programa *Affymetrix® Genotyping Console™ (GTC) Software* ^[131].

As variações no número de cópias (*copy number variations* – CNV), uma forma de variação estrutural submicroscópica, são alterações do DNA no genoma que levam as células a terem um número anormal de cópias de um ou mais segmentos de DNA. As CNV correspondem a um número relativamente grande de regiões do genoma que foram deletados ou duplicados em certos cromossomos. Estas variações representam cerca de 12% do genoma humano e cada variação pode apresentar tamanhos que vão desde de 1000 bases até diversos megabases ^[124]. Estas variações não foram consideradas nas análises, apesar de terem sido quantificadas.

Neste estudo, além do ensaio para avaliar a diferença na abundância dos transcritos, foi feito o ensaio para genotipar os marcadores genéticos e sua análise, dado que a variabilidade clínica encontrada entre os indivíduos do estudo poderia se dar não apenas, ou somente, pela diferença entre a quantidade de transcritos celulares ^[125].

Os SNP foram genotipados utilizando o banco de dados *GenomeWideSNP_6.na32.annot.db* (<http://www.affymetrix.com/>), versão do genoma do UCSC 19 (<https://genome.ucsc.edu/>) e do NCBI GRCh37.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Foi verificado se existiam erros mendelianos, ou

seja, se havia a presença de um alelo em um indivíduo que não poderia ter sido recebido a partir de qualquer um de seus pais biológicos por herança mendeliana, com o programa *PedCheck* (versão 1.0 de 24 de novembro de 1998) ^[132]. Os SNP em que existiam erros mendelianos foram removidos com o programa *Alohomora* (versão 0.33) ^[133]. O sexo foi verificado com o programa *Affymetrix® Genotyping Console™ (GTC) Software* (versão 4.2.0.26) e as relações parentais no pedigree foram verificadas com o programa *GRR* (abreviação do inglês: *Graphical Representation of Relationships*, versão 1.2.1.41 de 5 de agosto de 2003) ^[134]. Para a detecção de genótipos improváveis (duplo recombinante) foi utilizado o programa *Merlin* (versão 1.1.2) ^[135] e os encontrados foram removidos.

Foi feita uma seleção de SNP baseado no projeto HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) e foram selecionados dois grupos: o primeiro com 60 indivíduos não correlacionados da população residente de Utah com ascendência do norte e do oeste da Europa (abreviação CEU), com um total de 64895 SNP, e o segundo grupo com 150 indivíduos não correlacionados da população CEU e asiáticos (60 CEU, 45 japoneses de Tóquio: JPT e 45 chineses Han de Beijing: CHB), selecionando um total de 79590 SNP.

O programa PLINK (versão 1.07 de 10 de outubro de 2009) ^[136] foi utilizado para a retirada daqueles SNP em desequilíbrio de ligação (em inglês: *linkage disequilibrium pruning* ou *LD pruning*), levando em consideração os grupos selecionados do HapMap, citados acima, e a família desse estudo. O parâmetro empregado foi o LDpruning - indep 50 5 1.5 ($r^2 = 0,33$) para determinar a remoção de quais grupos de SNP estavam em desequilíbrio de ligação e para os grupos, já citados, também foram feitas a detecção de erros mendelianos e de genótipos improváveis. Tanto o conjunto de dados com e sem seleção de SNP foram avaliados com o programa *Merlin* a análise de ligação foi realizada sem assumir qualquer tipo de herança genética (em inglês: *non-parametric linkage analysis*).

O objetivo da análise de ligação é deduzir a posição (loco) ao longo de um ou vários cromossomos, de um gene/ região regulatória atuando ou contribuindo para uma determinada característica. Isto é feito investigando a relação entre a característica (sintomático ou assintomático) e os marcadores genéticos (SNP) bem caracterizados e de locos conhecido. A hipótese nula (H_0) é que não há ligação entre uma determinada posição no cromossomo e a característica, a hipótese alternativa (H_1) é que há ligação entre uma posição no cromossomo e a

característica. Para testar H_0 contra H_1 tradicionalmente se usa o logaritmo da razão de chances (conhecido como *lod score*)^[137].

Programas como o *Merlin*, entre outros, utilizam o algoritmo de Lander-Green-Kruglyak para a análise de ligação com diversos marcadores genéticos, e a complexidade computacional deste algoritmo aumenta linearmente com o aumento do número de marcadores, mas exponencialmente com o tamanho da família em bits. O tamanho da família em bits é definido como duas vezes o número de indivíduos com parentes presentes no pedigree menos o número de fundadores (indivíduos sem parentes no pedigree). Enquanto o tamanho em bit do pedigree for pequeno o algoritmo consegue analisar uma grande quantidade de marcadores, limitada ao poder de processamento do computador. O tempo para computar uma análise de ligação também pode depender do número de indivíduos não genotipados, que pode ser grande em pedigrees extensos. Uma solução para esse problema computacional foi dividir grandes famílias em vários pedigrees menores, em subunidades computáveis. Neste caso foi utilizado o programa *PedCut* (versão 1.19) para gerar sub-pedigrees a partir do pedigree visto na figura 13, o tamanho em bit escolhido para formar os sub-pedigrees foi de 24 bits, o valor máximo computado pelo programa *Merlin*^[138] e verificados com o *PedStats* do *Merlin*.

IV. Resultados

1. Análise de qualidade dos microarranjos

A pré-análise foi realizada com *Affymetrix® Expression Console™* com as 38 amostras (tabela 9), para controle de qualidade e de compatibilidade entre das amostras (figuras 14 e 15). Os valores medidos foram obtidos a partir da imagem gerada pelo experimento de microarranjo de expressão. Existem aproximadamente de 30 a 50 pixels por sonda que são resumidos pelo percentil 75, após a remoção dos pixels do perímetro exterior, e este valor é chamando de *probe cell's intensity*, valor utilizado aqui para as análises.

Figura 14. Intensidade das sondas controle para a hibridização. São quatro sondas em quatro diferentes concentrações, do menos concentrado para o mais: BioB (verde), BioC (rosa), BioD (azul) e creX (vermelhor). BioB, BioC e BioD são genes da via da síntese da biotina de *E. coli* e creX é um gene de recombinase do bacteriófago P1. Não é esperada hibridização cruzada com amostras não virais e não bacterianas. O padrão de intensidade desses quatro controles tem de demonstrar o aumento de suas concentrações, como pode ser visto acima. Cada ponto no gráfico de linha representa uma amostra.

Figura 15. Histograma de intensidade das sondas. Cada logaritmo da intensidade de cada sonda do ensaio de microarranjo (linhas coloridas na vertical) são sobrepostos em um único gráfico para melhor comparação e para a identificação de arranjos com distribuições diferentes. Neste caso todos os microarranjos apresentam uma distribuição semelhante entre si e que se aproxima de uma distribuição normal.

A análise da qualidade dos microarranjos dos homens da amostra revelou que 2 das 22 amostras (AM12482 e SM21992), ambas produzidas na mesma data (01/07) estarem consistentemente diferentes das demais, conforme pode ser visto nas figuras 16 e 17:

Figura 16. Box-plot dos microarranjos dos homens. AM codifica para *asymptomatic male* e SM *symptomatic male*, ambos seguidos do número de registro do CEGH-CEL.

Figura 17. Correlação de Spearman dos microarranjos dos homens. AM codifica para *asymptomatic male* e SM *symptomatic male*, ambos seguidos do número de registro do CEGH-CEL.

A figura 18 mostra a análise dos componentes principais. Como pode ser visto as amostras não se separaram bem entre os grupos de assintomáticos e sintomáticos (considerando somente

os homens). Isto dificulta o trabalho dos métodos de seleção de genes com expressão diferenciada entre estes grupos.

O primeiro gráfico da figura 18 representa as amostras antes da normalização e o segundo após a normalização.

Figura 18: Análise dos componentes principais da amostra de homens. Os pontos em azul representam o grupo de assintomáticos e em verde o grupo de sintomáticos; a. amostras antes da normalização, b. amostras após a normalização. AM codifica para *asymptomatic male* seguido do número de registro do CEGH-CEL.

As figuras 19 a. e 19 b. mostram fraca correlação entre duas amostras (61 e 58%, respectivamente), que deveriam estar bem correlacionadas, dado que pertencem ao mesmo grupo. A figura 19 c. mostra alta correlação de duas amostras do mesmo grupo (91%), como é esperado.

Figura 19. Análise de correlação na amostra de homens pertencentes ao mesmo grupo (sintomático ou assintomático); a. comparação entre dois homens sintomáticos; b., c. comparação entre dois homens assintomáticos. AM codifica para *asymptomatic male* e SM *symptomatic male*, ambos seguidos do número de registro do CEGH-CEL.

Devido às observações das etapas anteriores, as amostras AM12482 e SM21992 foram removidas. O procedimento de normalização e análise de gráficos foi repetido (Figura 20). As amostras ficaram mais homogêneas intra e heterogêneas entre grupos.

Figura 20. Análises de qualidade após a retirada de dois indivíduos da amostra. a. Correlação de Spearman, b. análise dos componentes principais. AM codifica para *asymptomatic male* e SM *symptomatic male*, ambos seguidos do número de registro do CEGH-CEL.

Aplicou-se um filtro de dados IQR < 0.3 que resultou em 6.888 genes com maior variação de expressão. Estes genes serviram de entrada para o método de seleção de DEG. A seleção de DEG com o método RP levou à identificação de 842 genes com expressão diferenciada, 537 aumentados nos homens sintomáticos em relação aos assintomáticos e 305 com expressão diminuída, todos com valor-p < 0.05 corrigidos por FDR.

A análise de qualidade dos microarranjos considerando apenas as mulheres revelou que 3 das 16 amostras (AF12496, SF10512 e SF12489), todas realizadas na mesma data (01/07), são consistentemente diferentes das demais conforme pode ser visto na figura 21.

Figura 21. Box-plot dos microarranjos das mulheres. AF codifica para *asymptomatic female* e SF *symptomatic female*, ambos seguidos do número de registro do CEGH-CEL.

As amostras AF12496, SF10512 e SF12489 foram então removidas e as análises foram refeitas. No entanto, nesta re-análise não foi possível remover o *batch* das diferentes datas nas amostras restantes por causa da pequena quantidade que restou no grupo de mulheres sintomáticas. O gráfico de componentes principais abaixo ilustra este resultado (figura 22). As amostras não ficaram bem separadas entre os grupos de assintomáticas e sintomáticas, o que prejudica o trabalho dos métodos de seleção de genes diferencialmente expressos entre estes grupos.

Figura 22. Análise dos componentes principais da amostra de mulheres. Os pontos em azul representam o grupo de assintomáticos e em verde o grupo de sintomáticos. AF codifica para *asymptomatic female* seguido do número de registro do CEGH-CEL.

Em seguida foi aplicado o filtro de dados $IQR < 0.3$ que identificou 13.756 genes com maior variação de expressão. Estes genes serviram de entrada para o método de seleção de DEG.

A seleção de DEG com o método RP levou à identificação de 27 genes com expressão diferenciada, 13 aumentados nas mulheres sintomáticas em relação às assintomáticas e 14 com expressão diminuída, todos com valor- $p < 0.05$ corrigidos por FDR. Essa pequena quantidade de DEG identificada, pode ser devido à pequena quantidade de amostras no grupo de sintomáticas ou devido à menor penetrância da doença nas mulheres.

A primeira hipótese testada nesta análise foi comparar todas as 19 amostras de assintomáticos contra as 19 amostras de sintomáticos. No entanto, novamente como foi observado nas análises anteriores, as amostras produzidas em 01/07 ficaram diferentes das demais (figura 23). A figura 24 mostra que não há separação entre as amostras dos dois grupos mesmo após a normalização.

Figura 23. Box-plot de todos os microarranjos. AF codifica para *asymptomatic female* e SF *symptomatic female*, AM codifica para *asymptomatic male* e SM *symptomatic male*, todos seguidos do número de registro do CEGH-CEL.

Figura 24. Análise dos componentes principais da amostra. Os pontos em azul representam o grupo de assintomáticos e em verde o grupo de sintomáticos. AF codifica para *asymptomatic female* seguido do número de registro do CEGH-CEL.

As amostras de 01/07 foram então removidas e a análise refeita. A figura 25 ilustra a nova distribuição das amostras. Ele é resultado do processo de normalização, remoção do *batch* das datas de produção e filtro de dados $IQR < 0.3$. Diferente do anterior, neste gráfico as amostras dos grupos de assintomáticos e sintomáticos ficaram mais bem separadas, que é o mais indicado para a etapa seguinte de seleção de DEG.

Figura 25. Análise dos componentes principais da amostra após a normalização. Os pontos em azul representam o grupo de assintomáticos e em verde o grupo de sintomáticos. AF codifica para *asymptomatic female* seguido do número de registro do CEGH-CEL.

Como esta análise inclui homens e mulheres no mesmo grupo, também se aplicou a técnica Combat para a remoção da diferença entre os sexos. A figura 26 é resultado do processo de normalização, remoção do *batch* das datas de produção e do sexo e filtro de dados IQR < 0.3.

Figura 26. Análise dos componentes principais da amostra após segunda normalização. Os pontos em azul representam o grupo de assintomáticos e em verde o grupo de sintomáticos. AF codifica para *asymptomatic female* seguido do número de registro do CEGH-CEL.

O método RP de seleção de DEG analisou 7.898 genes resultantes do filtro IQR e identificou 588 genes com expressão alterada, 297 com expressão aumentada nos sintomáticos com relação aos assintomáticos e 291 com expressão diminuída, todos com valor-p < 0.05 corrigidos por FDR. Estes valores são resultantes do método RMA de normalização e do método Combat de remoção de *batch* (primeiro das datas de produção e em seguida dos sexos).

Quando são comparados os DEG em comum entre os grupos são obtidos os valores descritos na figura 27. Todos os DEG encontrados em todas as comparações podem ser vistas no anexo 1,2 e 3.

Figura 27. Diagramas de Venn indicado à quantidade de DEGs em comuns e exclusivos para cada grupo de comparação.

2. Análise funcional (*in silico*) dos genes diferencialmente expressos

As análises realizadas com o IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*) são baseadas no *Ingenuity Knowledge Base*, um conjunto estruturado de observações de vários contextos experimentais com aproximadamente cinco milhões de achados curados manualmente da literatura ou integrado com outros bancos de dados. A rede contém mais de 40 000 nódulos que representam genes de mamíferos e seus produtos, componentes químicos, moléculas de microRNA e de funções biológicas. Os nódulos são conectados por aproximadamente 1 480 000 bordas representando relações de causa e efeito observadas experimentalmente que relacionam expressão, transcrição, ativação, modificações moleculares e transporte assim como eventos de ligação entre moléculas. As bordas das redes são também associadas com a direção do efeito causal, isto é, se é ativação ou inibição ^[139].

O teste de hipótese utilizado foi o teste exato de Fisher, e a hipótese nula testada foi: se a proporção de genes mapeados para uma função ou via na amostra (aquelas que são significantes) é similar à proporção que mapeia para a população toda (conjunto de referencia). *Ingenuity Pathways Analysis* calcula uma pontuação para cada rede de acordo com o ajuste dessa rede para o conjunto definido pelo usuário. A pontuação é derivada do valor-p e indica a probabilidade de os genes em uma rede estarem juntos devido ao acaso. Uma pontuação de valor 2 indica que há uma chance em 100 de que os genes estarem juntos em uma rede devido ao acaso. Assim, pontuações de 2 ou mais têm pelo menos uma confiança de 99% de não serem gerados apenas por acaso ^[140].

As tabelas 10, 11 e 12 resumem as análises IPA, que incluem apenas interações diretas, e consideraram apenas moléculas ou relações que foram experimentalmente confirmadas, sem especificar o tipo de tecido ou o tipo celular.

Tabela 10. Resumo da análise funcional *in silico* utilizando o programa *Ingenuity* (análise IPA – *Ingenuity Pathway Analysis*) dos genes diferencialmente expressos quando comparados os homens assintomáticos e sintomáticos.

Funções de rede associada	pontuação
Resposta inflamatória, doença imunológica, sinalização celular	29
Movimento celular, tráfego de célula imune, morfologia tecidual	29
Interação e sinalização célula-a-célula, desenvolvimento tecidual, função e desenvolvimento do sistema hematológico	28
Doenças do desenvolvimento, doença hereditária, doença metabólica	28
Câncer, doença hematológica, organização e montagem celular	27

Doenças	valor-p	# de moléculas
Resposta inflamatória	4.31E-14 -1.73E-02	124
Doença infecciosa	2.92E-10 -1.73E-02	88
Doença imunológica	5.75E-09 -1.73E-02	102
Doença de desenvolvimento	2.01E-08 -1.73E-02	21
Doença hereditária	2.01E-08 -1.27E-02	26
Funções moleculares e celulares	valor-p	# de moléculas
Movimento celular	2.26E-07 -1.57E-02	100
Bioquímica de pequenas moléculas	2.40E-06 -1.73E-02	71
Síntese proteica	2.79E-06 -1.27E-02	67
Interação e sinalização célula-a-célula	2.86E-06 -1.73E-02	66
Manutenção e função celular	2.50E-05 -1.73E-02	49
Função e desenvolvimento do sistema fisiológico	valor-p	# de moléculas
Função e desenvolvimento do sistema hematológico	1.14E-06 -1.73E-02	75
Tráfego de células imunes	1.14E-06 -1.57E-02	28
Morfologia tecidual	2.12E-06 -1.51E-02	79
Resposta imune humoral	2.79E-06 -9.94E-03	27
Sobrevivência do organismo	3.32E-05 -8.60E-04	122
Vias canônicas	valor-p	razão
Via de sinalização do OX40	1.07E-05	9/88 (0.102)
Sinalização de rejeição de aloenxerto	1.53E-05	9/91 (0.088)
Células T auxiliaadoras na sinalização iCOS-iCOSL	2.7E-05	12/107 (0.112)
Linfócito T citotóxico mediador da apoptose de células alvo	4.62E-05	8/81 (0.099)
Interferência entre células dendríticas e células natural killers	7.26E-05	11/86 (0.128)
Mudança no nível de expressão (up-regulated)	valor esperado	
HLA-DQB1	↑2.923	
HLA-DRB1	↑2.144	
SERPING1	↑2.027	
SMPD3	↑1.797	
ALOX15	↑1.731	
LRP1	↑1.720	
GM2A	↑1.693	
LGALS12	↑1.681	
CES1	↑1.671	
MS4A2	↑1.660	
Mudança no nível de expressão (down-regulated)	valor esperado	
ZNF429	↓-2.894	
IGJ	↓-2.544	
PIGF	↓-2.446	
mir-15	↓-2.403	
KLRC4-KLRK1/KLRK1	↓-2.325	
UTS2	↓-2.301	
COPS2	↓-2.277	
GPR160	↓-2.240	
RGS18	↓-2.216	

CFLAR		↓-2.158
Regulador upstream	valor-p de sobreposição	estado de ativação predito
MKL2	3.89E-06	-
MKL1	5.77E-06	-
STAT1	1.04E-05	ativado
GATA1	2.75E-05	ativado
IRF9	2.88E-05	-
Toxicogenômica	valor-p	razão
Necrose/morte celular de fígado	3.46E-04	20/254 (0.079)
Necrose/morte celular renal	6.38E-03	25/426 (0.059)
Ativação LXR/RXR	6.98E-03	10/114 (0.088)
Lesão por perfusão/isquemia renal persistente (camundongo)	8.21E-03	4/27 (0.148)
Quadro de falha renal aguda (rato)	1.1E-02	6/59 (0.102)

Tabela 11. Resumo da análise funcional *in silico* utilizando o programa *Ingenuity* (análise IPA – *Ingenuity Pathway Analysis*) dos genes diferencialmente expressos quando comparadas as mulheres assintomáticos e sintomáticos.

Funções de rede associada		pontuação
Doenças do sistema endócrino, doença gastrointestinal, doença imunológica		24
Expressão gênica, ciclo celular, organização e montagem celular		3
Doenças	valor-p	# de moléculas
Doenças do tecido conjuntivo	2.72E-06 - 1.17E-02	7
Doença imunológica	2.72E-06 - 7.83E-03	7
Doença inflamatória	2.72E-06 - 1.29E-02	7
Doenças musculares e esqueléticas	2.72E-06 - 4.49E-02	7
Doenças do sistema endócrino	1.88E-04 - 1.88E-04	4
Funções moleculares e celulares	valor-p	# de moléculas
Morfologia celular	2.62E-03 - 3.23E-02	3
Comprometimento celular	2.62E-03 - 2.62E-03	1
Interação e sinalização célula-a-célula	6.53E-03 - 6.53E-03	1
Função e manutenção celular	1.30E-02 - 4.99E-02	3
Desenvolvimento celular	1.43E-02 - 3.10E-02	2
Função e desenvolvimento do sistema fisiológico	valor-p	# de moléculas
Função e desenvolvimento do sistema cardiovascular	3.92E-03 - 3.92E-03	1
Desenvolvimento e estrutura do tecido linfóide	3.92E-03 - 3.92E-03	1
Desenvolvimento do organismo	3.92E-03 - 1.56E-02	2
Desenvolvimento de órgãos	6.53E-03 - 1.56E-02	1
Função e desenvolvimento do sistema muscular e esquelético	6.53E-03 - 4.99E-02	2
Vias canônicas	valor-p	razão
Via de apresentação de antígeno	7.1E-06	3/36 (0.083)
Sinalização de rejeição de aloenxerto	8.21E-04	2/91 (0.022)
Linfócito T citotóxico mediador da apoptose de células alvo	1.09E-03	2/81 (0.025)
Via de sinalização do OX40	1.27E-03	2/81 (0.023)
Biossíntese de D-mio-inositol 1,4,5,6-tetraquisfosfato	5.71E-03	2/116 (0.017)

Mudança no nível de expressão (up-regulated)		valor esperado
HLA-DPA1		↑4.487
CENPK		↑2.299
KLRC2		↑2.063
TAP2		↑1.854
HLA-DRB1		↑1.789
Mudança no nível de expressão (down-regulated)		valor esperado
DDR1		↓-2.468
TMTC1		↓-2.122
C2		↓-1.964
HBZ		↓-1.906
LY6G6C		↓-1.865
ALPL		↓-1.855
TPTE2		↓-1.643
Regulador upstream	valor-p de sobreposição	estado de ativação predito
ARID1B	1.15E-03	-
SMC3	1.15E-03	-
RAD21	1.15E-03	-
ARID2	3.46E-03	-
Hmga1	4.58E-03	-
Toxicogenômica	valor-p	razão
Painel de biomarcador reversível de glomerulonefrite	2.72E-02	1/25 (0.040)
Proteínas de resposta positiva a fase aguda	3.48E-02	1/27 (0.037)
Colestasia hepática	1.59E-01	1/137 (0.007)
Sinalização NF-κB	1.8E-01	1/186 (0.005)

Tabela 12. Resumo da análise funcional *in silico* utilizando o programa *Ingenuity* (análise IPA – *Ingenuity Pathway Analysis*) dos genes diferencialmente expressos quando comparados assintomáticos e sintomáticos (tanto as mulheres e como os homens).

Funções de rede associada	pontuação	
Doenças do desenvolvimento, doença hereditária, doença hematológica	40	
Movimento celular, desenvolvimento tecidual, interação e sinalização célula-a-célula	36	
Sobrevivência e morte celular, função e desenvolvimento do sistema hematológico, função e desenvolvimento de cabelo e pele	22	
Movimento celular, tráfego de célula imune, sobrevivência e morte celular	19	
Doenças do sistema endócrino, doença gastrointestinal, doença imunológica	18	
Doenças	valor-p	# de moléculas
Câncer	1.09E-06 - 4.46E-02	98
Doença urológica e renal	1.09E-06 - 4.37E-02	29
Doença infecciosa	2.52E-05 - 3.38E-02	33
Doença de desenvolvimento	4.50E-05 - 3.38E-02	21
Doença hematológica	4.50E-05 - 4.42E-02	33
Funções moleculares e celulares	valor-p	# de moléculas
Bioquímica de pequenas moléculas	5.11E-05 - 3.38E-02	35
Organização e montagem celular	1.10E-04 - 4.42E-02	22

Interação e sinalização célula-a-célula	2.20E-04 - 4.42E-02	32
Manutenção e função celular	3.75E-04 - 4.40E-02	32
Metabolismo de aminoácidos	4.83E-04 - 3.16E-02	6
Função e desenvolvimento do sistema fisiológico	valor-p	# de moléculas
Função e desenvolvimento do sistema hematológico	1.28E-04 - 4.41E-02	42
Morfologia tecidual	1.28E-04 - 4.41E-02	32
Desenvolvimento tecidual	1.34E-04 - 4.46E-02	41
Função e desenvolvimento do sistema reprodutivo	2.20E-04 - 2.26E-02	10
Função e desenvolvimento dos sistemas muscular e esquelético	5.10E-04 - 3.88E-02	16
Vias canônicas	valor-p	razão
Sinalização de rejeição de aloenxerto	8.05E-04	5/91 (0.055)
Sinalização da doença do hospedeiro contra o enxerto	8.05E-04	5/44 (0.114)
Sinalização celular alterada de célula T e B na artrite reumatoide	9.11E-04	7/85 (0.082)
Linfócito T citotóxico mediador da apoptose de células alvo	1.55E-03	5/81 (0.062)
Comunicação entre células do sistema imune adaptativo e inato	2.28E-03	6/98 (0.061)
Mudança no nível de expressão (up-regulated)	valor esperado	
HLA-DPA1	↑2.133	
KDM5D	↑2.110	
HLA-DRB1	↑1.939	
TSPY1	↑1.693	
MMP8	↑1.647	
DDX3Y	↑1.597	
CEACAM8	↑1.597	
LCN2	↑1.581	
USP9Y	↑1.513	
DAXX	↑1.506	
Mudança no nível de expressão (down-regulated)	valor esperado	
CFLAR	↓-1.826	
ZNF429	↓-1.753	
mir-15	↓-1.711	
DDR1	↓-1.709	
SKP1	↓-1.658	
TLR10	↓-1.620	
RAB18	↓-1.611	
RGS18	↓-1.581	
GCA	↓-1.572	
PIGF	↓-1.567	
Regulador upstream	valor-p de sobreposição	estado de ativação predito
MKL2	1.58E-05	-
MKL1	7.60E-05	-
KLF1	1.01E-04	-
GATA1	1.31E-04	ativado
ZBTB16	5.95E-04	-
Toxicogenômica	valor-p	razão
Proteínas de resposta positiva a fase aguda	2.24E-02	3/27 (0.111)

Necrose renal/morte celular	2.45E-02	16/426 (0.038)
Anti apoptose	2.71E-02	3/30 (0.100)
Quadro de falha renal aguda (rato)	3.16E-02	4/59 (0.068)
Ativação LXR/RXR	4.31E-02	6/114 (0.053)

Foram geradas 22 redes quando consideradas as análises IPA na comparação de homens assintomáticos e sintomáticos. Uns exemplos das redes pode ser visto nas figuras 28 e 29, o restante pode ser visto no anexo 1, assim como o detalhamento das funções biológicas e as vias canônicas geradas pelas análises.

Figura 28. Rede hipotética de interações dos genes diferencialmente expressos quando comparados os homens assintomáticos e sintomáticos, geradas pelo programa *Ingenuity*.

Na análise comparando o grupo de mulheres sintomáticas e assintomáticas foi gerada uma rede (figura 30). Na tabela 13 pode ser visto o detalhamento da rede e das análises pode ser visto no anexo 2.

Na análise comparando o grupo de mulheres sintomáticas e assintomáticas foi gerada uma rede (figura 30). Na tabela 13 pode ser visto o detalhamento da rede e das análises pode ser visto no anexo 2.

Figura 30. Rede hipotética de interações dos genes diferencialmente expressos quando comparadas as mulheres assintomáticas e sintomáticas, geradas pelo programa *Ingenuity*.

Tabela 13. Moléculas que possuem interação em rede e se apresentam diferencialmente expressas quando comparadas os grupos de mulheres assintomáticas e sintomáticas.

Moléculas na rede	pontuação	principais funções
ALPL, B2M, C2, CDKN2A, CENPK, CIITA, DDR1, HBZ, HLA-B, HLA-C, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQA2, HLA-DQB1, HLA-DQB3, HLA-DRB1, HLA-DRB3, HLA-DRB5, HLA-E, HLA-F, KIR2DL1/KIR2DL3, KLRC2, KLRD1, MHC, MHC II-β, Mhc2 Alpha, phosphatase, PTPRN, RB1, SP1, TAP2, Tap, TP53, TPTE2	24	Doença do sistema endócrino, doença gastrointestinal, doença imunológica

© 2000-2013 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Figura 31. Funções biológicas das moléculas diferencialmente expressas quando comparado o grupo de mulheres assintomáticas e sintomáticas. A linha amarela representa limiar do valor-p para a função.

Tabela 14. Descrição das categorias das funções biológicas associadas a um valor-p significativo e as moléculas envolvidas em cada função, quando comparadas os grupos de mulheres assintomáticas e sintomáticas.

Categoria	valor-p	molécula
Doença do tecido conjuntivo	2.72E-06-1.17E-02	HLA-DRB1,LY6G6C,TAP2,ALPL,DDR1,HLA-DPA1, C2
Doença imunológica	2.72E-06-7.83E-03	LY6G6C, HLA-DRB1, ALPL, TAP2, DDR1, HLA-DPA1, C2
Doença inflamatória	2.72E-06-1.29E-02	LY6G6C, HLA-DRB1, ALPL, TAP2, DDR1, C2, HLA-DPA1
Doenças muscular e esquelética	2.72E-06-4.49E-02	HLA-DRB1, LY6G6C, TAP2, ALPL, DDR1, HLA-DPA1, C2
Doenças do sistema endócrino	1.88E-04-1.88E-04	LY6G6C, TAP2, DDR1, HLA-DPA1
Doença gastrointestinal	1.88E-04-7.83E-03	LY6G6C, ALPL, TAP2, DDR1, HLA-DPA1
Doença metabólica	1.88E-04-1.17E-02	LY6G6C, TAP2, ALPL, DDR1, HLA-DPA1
Doença do desenvolvimento	1.31E-03-4.49E-02	HLA-DRB1, TAP2, ALPL, C2
Doença hereditária	1.31E-03-4.49E-02	TMTC1, HLA-DRB1, TAP2, ALPL, DDR1, C2
Morfologia celular	2.62E-03-3.23E-02	HBZ, ALPL, DDR1
Comprometimento celular	2.62E-03-2.62E-03	HBZ
Função e desenvolvimento do sistema cardiovascular	3.92E-03-3.92E-03	DDR1
Desenvolvimento e estrutura do tecido linfóide	3.92E-03-3.92E-03	DDR1
Doença neurológica	3.92E-03-1.29E-02	TMTC1, HLA-DRB1, TAP2, DDR1
Desenvolvimento do organismo	3.92E-03-1.56E-02	ALPL, DDR1

Doença psicológica	3.92E-03-1.11E-02	TMTC1, HLA-DRB1, DDR1
Doenças e condições dermatológicas	5.46E-03-5.46E-03	HLA-DRB1, HLA-DPA1
Câncer	6.53E-03-6.53E-03	ALPL
Interação e sinalização célula-a-célula	6.53E-03-6.53E-03	DDR1
Doença oftálmica	6.53E-03-6.53E-03	C2
Desenvolvimento de órgão	6.53E-03-1.56E-02	ALPL
Função e desenvolvimento dos sistemas muscular e esquelético	6.53E-03-4.99E-02	ALPL, DDR1
Desenvolvimento de tecido	6.53E-03-2.08E-02	ALPL, DDR1
Manutenção e função celular	1.3E-02-4.99E-02	HBZ, ALPL, DDR1
Função e desenvolvimento do sistema hematológico	1.3E-02-3.1E-02	HBZ
Desenvolvimento celular	1.43E-02-3.1E-02	HBZ, DDR1
Proliferação e crescimento celular	1.43E-02-1.43E-02	DDR1
Função e desenvolvimento do tecido conectivo	1.56E-02-4.99E-02	ALPL
Desenvolvimento embrionário	1.56E-02-1.56E-02	ALPL
Morfologia de órgão	1.56E-02-1.56E-02	ALPL
Morfologia de tecido	1.56E-02-4.8E-02	HBZ, ALPL, DDR1
Síntese de proteínas	1.69E-02-3.48E-02	HBZ, ALPL
Sobrevivência e morte celular	1.82E-02-1.82E-02	HBZ
Organização e montagem celular	2.08E-02-2.08E-02	DDR1
Doença hematológica	2.08E-02-2.59E-02	HBZ
Transporte molecular	2.08E-02-4.61E-02	HBZ, TAP2
Função e desenvolvimento do sistema nervoso	2.08E-02-2.08E-02	DDR1
Lesão do organismo e anormalidades	2.08E-02-3.86E-02	HBZ, DDR1
Hematopoese	3.1E-02-3.1E-02	HBZ
Doença cardiovascular	3.86E-02-3.86E-02	DDR1
Doença respiratória	4.61E-02-4.61E-02	ALPL
Bioquímica de pequenas moléculas	4.61E-02-4.61E-02	HBZ

Figura 32. Vias canônicas do *Ingenuity* das moléculas diferencialmente expressas quando comparadas os grupos de mulheres assintomáticas e sintomáticas, a linha amarela representa limiar do valor-p para a via e a linha amarela com o quadrado representa a razão da quantidade de moléculas com valor-p significativo sobre as moléculas existentes na via.

Tabela 15. Descrição das vias canônicas associadas a um valor-p significativo, as moléculas envolvidas em cada via e a razão da quantidade de moléculas com valor-p significativo sobre as moléculas existentes na via, quando comparadas os grupos de mulheres assintomáticas e sintomáticas.

Vias canônicas	-log(valor-p)	razão	moléculas
Via de apresentação de antígeno	5.15E00	8.33E-02	HLA-DRB1, TAP2, HLA-DPA1
Sinalização de rejeição ao aloenxerto	3.09E00	2.2E-02	HLA-DRB1, HLA-DPA1
Apoptose de células alvo mediado pelo linfócito T citotóxico	2.96E00	2.47E-02	HLA-DRB1, HLA-DPA1
Via de sinalização do OX40	2.9E00	2.27E-02	HLA-DRB1, HLA-DPA1
Biossíntese de D-mio-inositol 1,4,5,6-tetraquisfosfato	2.24E00	1.72E-02	TPTE2, ALPL
Biossíntese de D-mio-inositol 3,4,5,6-tetraquisfosfato	2.24E00	1.72E-02	TPTE2, ALPL
Degradação do fosfato 3 inositol	2.13E00	1.54E-02	TPTE2, ALPL
Metabolismo de D-mio-inositol 5 fosfato	2.12E00	1.53E-02	TPTE2, ALPL
Biossíntese do fosfato 3 inositol	2.1E00	1.42E-02	TPTE2, ALPL
Sinalização do Cdc42	2.09E00	1.24E-02	HLA-DRB1, HLA-DPA1
Maturação celular dendrítica	1.91E00	1.09E-02	HLA-DRB1, DDR1
Supervia dos componentes do fosfato inositol	1.9E00	1.08E-02	TPTE2, ALPL
Desenvolvimento de células B	1.59E00	3.57E-02	HLA-DRB1
Sistema complemento	1.47E00	3.45E-02	C2
Sinalização da doença autoimune da tireoide	1.41E00	1.72E-02	HLA-DRB1
Sinalização de imunodeficiência primária	1.4E00	1.79E-02	TAP2
Sinalização da doença do hospedeiro contra o enxerto	1.37E00	2.27E-02	HLA-DRB1
Linfócitos T na sinalização Nur77	1.26E00	1.67E-02	HLA-DRB1
Apoptose do linfócito T induzido por cálcio	1.21E00	1.52E-02	HLA-DRB1
Sinalização IL-4	1.14E00	1.52E-02	HLA-DRB1
Diferenciação de célula T auxiliadora	1.13E00	1.47E-02	HLA-DRB1
Comunicação entre s sistemas imune inato e adaptativo	1.12E00	1.02E-02	HLA-DRB1
Linfócitos T citotóxicos na sinalização CTLA4	1.09E00	1.28E-02	HLA-DRB1
Sinalização alterada de células T e B na artrite reumatoide	1.06E00	1.18E-02	HLA-DRB1
Inter-relação entre células dendríticas e natural killers	1.02E00	1.16E-02	HLA-DRB1
Células T auxiliadoras na sinalização iCOS-iCOSL	9.95E-01	9.35E-03	HLA-DRB1
Sinalização da célula natural killer	9.9E-01	1.09E-02	KLRC2
Células T auxiliadoras na sinalização CD28	9.43E-01	8.55E-03	HLA-DRB1
Sinalização da diabetes mellitus tipo 1	9.3E-01	8.62E-03	HLA-DRB1
Linfócitos T na sinalização PKCθ	9.3E-01	7.63E-03	HLA-DRB1
Sinalização PTEN	8.97E-01	8.13E-03	DDR1
Papel da NFAT na regulação da resposta imune	7.91E-01	5.75E-03	HLA-DRB1
Sinalização NF-κB	7.68E-01	6.17E-03	DDR1
Sinalização da resposta da fase aguda	7.3E-01	5.88E-03	C2
Via da ubiquinização de proteínas	6.45E-01	4.72E-03	TAP2
Papel dos osteoblastos, osteoclastos e condrócitos na artrite reumatoide	6.43E-01	4.5E-03	ALPL

Na comparação de assintomáticos e sintomáticos (tanto homens como mulheres), foram geradas 17 redes para as análises de IPA, como exemplificado na figura 33, o restante pode ser visto no anexo 3. Assim como o detalhamento das funções biológicas e as vias canônicas.

Figura 33. Rede hipotética de interações dos genes diferencialmente expressos quando comparados os assintomáticos e sintomáticos, geradas pelo programa *Ingenuity*.

3. Análises dos dados de microarranjos de genotipagem

As métricas de qualidade dos 44 ensaios de microarranjos geradas pelo programa *Affymetrix® Genotyping Console™ (GTC) Software* estão resumidas na tabela 16.

Tabela 16. Valores dos parâmetros de qualidade gerados pelo programa da *Genotyping Console* da *Affymetrix*.

#	# do registro CEGH-CEL	gênero computado	call rate	Contrast QC
1	9255	masculino	99,01	2,36
2	9320	masculino	97,50	0,93
3	9456	masculino	99,53	2,24
4	9484	masculino	98,61	1,42
5	9485	masculino	99,16	2,28
6	9613	masculino	99,11	2,3
7	9669	feminino	98,96	1,35
8	9710	feminino	98,28	0,85
9	10512	feminino	98,03	1,18

10	10533	masculino	97,73	1,37
11	11349	masculino	96,78	0,94
12	11480	feminino	99,07	2,13
13	11483	masculino	98,20	1,36
14	11484	masculino	98,50	0,93
15	11485	masculino	99,17	2,37
16	11488	masculino	99,10	1,97
17	11490	masculino	99,46	2,07
18	12481	feminino	98,18	1,32
19	12482	masculino	97,87	1,08
20	12489	feminino	97,09	0,82
21	12494	feminino	99,10	2,25
22	12495	feminino	99,08	1,76
23	12496	feminino	98,58	1,19
24	21992	masculino	97,63	0,99
25	21993	feminino	98,15	1,1
26	22280	feminino	97,23	0,9
27	22283	feminino	98,05	1,66
28	22284	feminino	98,54	1,91
29	22285	feminino	97,62	1,48
30	22286	masculino	99,26	2,43
31	25576	masculino	98,48	1,95
32	25578	masculino	97,67	1,38
33	25585	feminino	99,38	2,32
34	25589	feminino	99,45	2,27
35	25591	feminino	99,48	2,45
36	25593	masculino	98,05	1,23
37	25596	masculino	99,12	2,59
38	25598	masculino	98,72	2,44
39	25599	feminino	99,36	1,95
40	25600	masculino	98,68	2,32
41	25604	feminino	99,21	2,52
42	25659	masculino	99,04	1,66
43	25670	feminino	99,48	2,17
44	25671	masculino	98,83	2,21
Média			98,58	1,74
Desvio padrão			0,73	0,57
Intervalo de Confiança			98,58±0,22	1,74±0,17

Com o programa *PedCut* foram gerados cinco subpedigrees (figura 34) a partir da genealogia da figura 13. Alguns indivíduos estão duplicados entre os subpedigrees. Foram considerados na análise em apenas um deles e nos outros subpedigrees são colocados com genótipos desconhecidos e não considerados para os cálculos de *lod score*.

Figura 34. Os cinco pedigrees gerados pelo programa *PedCut* para análise de ligação no programa *Merlin* (valor máximo de bits =24).

Os resultados das análises de ligação estão resumidos na tabela 17, com os valores máximos e mínimos encontrados por cromossomo, considerando os cinco subpedigrees.

Tabela 17. Os valores máximos e mínimos encontrados nas análises de ligação dentre todos os pedigrees e conjunto de SNP (valor do Z, valor-p assumindo uma aproximação a distribuição normal, delta de Kong e Cox, Lod Score de Kong e Cox e o valor-p de Kong e Cox ^[141]). O valor de *lod score* significativo considerado é ≥ 3 para os cromossomos autossomos e de ≥ 2 para o cromossomo X.

Cromossomo		valor do Z	valor-p	delta	Lod Score	valor-p
1	mínimo	-1,34	0,9	-0,745	-0,30	0,9
	máximo	1,34	0,09	0,745	0,30	0,12
2	mínimo	-1,25	0,6	-0,203	-0,00	0,6
	máximo	3,56	0,0	3,456	0,45	0,05
3	mínimo	-0,30	0,8	-0,036	-0,02	0,8
	máximo	34,98	0,0	0,776	1,24	0,004
4	mínimo	-0,80	0,9	-0,112	-0,00	0,5
	máximo	40,70	0,0	2,341	0,99	0,0002

5	mínimo	-0,55	0,7	-0,022	-0,02	0,6
	máximo	1,70	0,0002	2,456	2,01	0,002
6	mínimo	-1,01	0,4	-0,845	-0,00	0,8
	máximo	13,80	0,0	5,900	2,70	0,03
7	mínimo	-0,09	0,6	-0,044	-0,00	0,3
	máximo	7,06	0,0	2,336	0,13	0,007
8	mínimo	-0,99	0,5	-0,980	-0,00	0,05
	máximo	24,00	0,0	0,555	2,06	0,001
9	mínimo	-0,43	0,7	-0,076	-0,03	0,5
	máximo	8,07	0,005	9,987	1,23	0,002
10	mínimo	-1,05	0,8	-0,034	-0,50	0,6
	máximo	15,67	0,0	2,689	0,90	0,07
11	mínimo	-0,46	0,7	0,055	-0,01	0,6
	máximo	18,32	0,0	2,179	1,61	0,003
12	mínimo	0,83	0,8	-0,207	0,07	0,7
	máximo	4,83	0,0	1,202	0,83	0,03
13	mínimo	-1,22	0,9	-0,291	-0,13	0,8
	máximo	3,44	0,0003	0,818	0,58	0,05
14	mínimo	-0,82	0,9	-0,078	-0,00	0,6
	máximo	7,981	0,0004	1,876	1,67	0,0008
15	mínimo	-0,32	0,9	-0,009	-0,06	0,9
	máximo	60,78	0,0	2,130	2,98	0,004
16	mínimo	-0,30	0,6	-0,037	-0,00	0,6
	máximo	27,00	0,0	3,389	1,97	0,0013
17	mínimo	-1,31	0,9	-0,210	-0,11	0,8
	máximo	4,75	0,0	0,766	0,67	0,04
18	mínimo	-0,14	0,6	-0,018	-0,00	0,5
	máximo	55,20	0,0	7,039	2,59	0,0003
19	mínimo	-0,23	0,4	-0,891	-0,03	0,6
	máximo	4,129	0,0	5,667	1,67	0,05
20	mínimo	-0,33	0,6	-0,038	-0,01	0,6
	máximo	26,13	0,0	3,006	1,90	0,002
21	mínimo	-0,74	0,5	-0,129	-0,00	0,3
	máximo	3,098	0,0003	0,886	1,40	0,002
22	mínimo	-1,66	0,7	-0,076	-0,00	0,6
	máximo	7,703	0,0	9,098	2,10	0,0009
X	mínimo	-0,87	0,8	-0,968	-0,01	0,8
	máximo	18,62	0,0	5,887	1,78	0,004

V. Discussão

Entender os mecanismos moleculares das doenças genéticas, desde a sua causa até o que determina o porquê um indivíduo apresenta um sinal em específico ou não, ou o fato de possuir

uma mutação patogênica e não apresentar a doença tem sido o objetivo de muitas pesquisas. As paraplegias espásticas hereditárias não fogem desse panorama geral, pois apresentam grande variabilidade clínica e genética.

A paraplegia espástica hereditária do tipo 4 é uma das formas de PEH mais estudada e um dos fenômenos que sempre chamou a atenção é a penetrância incompleta, além da diferença da apresentação clínica entre homens e mulheres ^[56, 142-144]. A existência de uma família brasileira com um grande número de pessoas estudadas e acompanhadas por um longo período de tempo (durante 13 anos até o presente momento) abre a oportunidade de tentar entender um pouco sobre esses dois fenômenos. O presente estudo fez uma análise exploratória utilizando marcadores genéticos (abundância de transcritos e genotipagem de SNP) e tenta explicar em parte a causa dessas observações.

As análises de ligação não apresentaram valor significativo para os SNP investigados nessa família e isso pode ter ocorrido por uma série de fatores. Estudos com indivíduos aparentados geralmente requerem um menor número de indivíduos estudados, quando comparado com indivíduos não aparentados, pois se espera uma menor variabilidade genética entre os indivíduos aparentados do que o encontrado na população. Entretanto, essas análises são computacionalmente complexas ^[138] e uma das estratégias é a de dividir grandes genealogias em famílias computáveis, mas isso diminui o poder de detecção de variáveis genéticas que poderiam estar ligadas ao fenótipo considerado.

Existem programas, como *Loki* ^[145] e o *Simwalk2* ^[146], que conseguem resolver computacionalmente qualquer estrutura de pedigree, mas são restritos no uso da quantidade de marcadores genéticos (por exemplo, o *Simwalk2* restringe o uso de no máximo 31 marcadores genéticos e neste estudo foram genotipados aproximadamente 900.000). Em estudo comparativo entre a estratégia de computar famílias menores com maior número de marcadores genéticos contra famílias maiores com menor número de marcadores, verificou-se que é mais robusto computar famílias menores com um número maior de marcadores genéticos ^[147, 148]. O ideal seria o desenvolvimento de um programa que pudesse resolver estruturas familiares complexas com um número ilimitado de marcadores.

Outra dificuldade encontrada foi a escolha do modelo para as análises, assim, optei pela análise de ligação utilizando um modelo não paramétrico, uma vez que não é conhecida o tipo de herança mendeliana envolvida (autossômico dominante, autossômico recessivo ou ligado ao X) e nem a frequência do alelo ou dos alelos que contribuem para a penetrância da doença. Essa opção também diminuiu o poder de análise, dado que é sabido que uma análise paramétrica é mais poderosa do que uma não paramétrica quando o modelo é conhecido e verdadeiro ^[137]. Acredito que o fato de não ter havido um marcador genético ligado à característica estudada se deve mais aos problemas relacionados com a análise de dados do que o fato de não haver um marcador genético que possa ser associado à característica estudada.

Também foi realizada a análise de microarranjos de expressão e a análise funcional *in silico* com o programa *Ingenuity Pathways Analysis* dos genes diferencialmente expressos. Dentre as três comparações feitas (homens sintomáticos versus homens assintomáticos; mulheres sintomáticas versus mulheres assintomáticas e o total de sintomáticos versus assintomáticos) a função com maior valor de significância obtido em comum, entre as comparações dos homens e das mulheres, está relacionada com o sistema imunológico. Esta função também aparece na comparação entre o total de indivíduos sintomáticos versus assintomáticos.

Os genes envolvidos nessas vias do sistema imune, que estão associados nos três grupos de comparação, são: *C2* (Gene ID: 717, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), que apresenta sua expressão diminuída nos assintomáticos em comparação com os sintomáticos, *HLA-DRB1* (Gene ID: 3123, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), que tem a expressão aumentada nos sintomáticos em relação aos assintomáticos e *LY6G6C* (Gene ID: 80740, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), que possui expressão diminuída nos assintomáticos em relação aos sintomáticos.

O componente C2 é uma glicoproteína sérica que funciona como parte da via clássica de ativação do sistema complemento (SC), o qual é o principal mediador humoral do processo inflamatório junto aos anticorpos, sendo constituído por um conjunto de proteínas, tanto solúveis no plasma como expressas na membrana celular, e ativado por duas vias, a clássica e a alternativa culminando na formação do complexo de ataque à membrana ^[149].

Sabe-se que neurônios, astrócitos e microglia são capazes de sintetizar, se não todas, quase todas as proteínas do sistema complemento, incluindo o componente C2. A ativação da cascata do complemento, e a deposição de fragmentos do complemento ativados ocorrem em situações não

infecciosas, tais como na doença de Alzheimer, na esclerose múltipla, na doença de Pick e em outras condições neurodegenerativas, porém a fonte de proteínas do complemento é pouco conhecida ^[150].

A ativação completa da cascata do complemento requer a superação de uma série de fatores inibitórios endógenos. Os oligodendrócitos são vulneráveis ao ataque complementar, o qual é particularmente observado na esclerose múltipla. Essa vulnerabilidade pode ser relacionada com uma deficiência na sua capacidade para expressar proteínas reguladoras do complemento. Ataque esporádico do complemento, na forma de oligodendroglia ativada pelo complemento, também é observada em certo número de condições neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer, de Pick, a doença de Huntington e doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, paralisia supranuclear progressiva e a síndrome de Shy-Drager. A fonte de proteínas do complemento, que se tornam ativadas ainda é desconhecida ^[150].

O papel do sistema complemento no desenvolvimento dos sintomas das PEH é desconhecido, mas pode incluir tanto aspectos protetores como aspectos negativos, como ocorre na doença de Alzheimer. A ativação de diferentes componentes do sistema complemento pode inibir a apoptose ou induzir a produção de fatores neuroprotetores. Por outro lado, a ativação e síntese crônica do sistema complemento podem induzir a neurodegeneração e demência, dado que foi observado que a superexpressão de proteínas do sistema complemento em áreas afetadas do cérebro de pacientes com Alzheimer induzem a neurodegeneração associada à demência ^[151-153]. O que observamos nos pacientes assintomático, tanto homens como mulheres, é que o componente C2 está com a expressão diminuída, podendo assim conferir um aspecto protetor ao desenvolvimento dos sinais clínicos da SPG4.

HLA-DRB1 é membro do complexo principal de histocompatibilidade de classe II, sendo uma região altamente polimórfica e responsável em apresentar peptídeos derivados de proteínas extracelulares para as células T CD4+. O gene *HLA-DRB1* foi associado a um possível efeito protetor na esclerose múltipla e ^[154] a processos degenerativos na doença de Alzheimer e na doença de Parkinson. Sua ação poderia ativar na microglia, a produção de citocinas pró-inflamatórias, propiciando a infiltração de células T e a degeneração ^[155, 156]. Assim como na doença de Alzheimer e na de Parkinson, o aumento visto nos pacientes sintomáticos da expressão de gênica de *HLA-DRB1* poderia desencadear, ao menos em parte, o processo degenerativo nos pacientes de SPG4.

Por último, o gene *LY6G6C* pertence a um agrupamento gênico de antígenos de leucócito localizado no complexo principal de histocompatibilidade da classe III. Codifica uma proteína que se encontra ancorada na superfície celular por uma glicosilfosfatidilinositol e está diretamente relacionada com a transdução de sinal. O papel biológico desses antígenos ainda não é conhecido, exceto pelo CD59, que é um inibidor da cascata do sistema complemento (inibindo a formação do complexo de ataque à membrana) e de uPAR, que tem um importante papel na proteólise de proteínas da matriz extracelular ^[157]. No caso da SPG4, este gene poderia atuar na resposta similar ao do componente C2, dado que está com a expressão diminuída nos pacientes assintomáticos em relação aos sintomáticos, atuando na diminuição de uma resposta imune exacerbada.

As hipóteses mais recentes sobre o efeito das terapias celulares sugerem que a modulação do sistema imune pode levar a alterações na apresentação clínica das doenças genéticas, em especial das doenças neurodegenerativas. No início das tentativas do uso de protocolos terapêuticos utilizando células-tronco, o grande objetivo era a regeneração do tecido degenerado, entretanto, a regeneração esperada após transplante de células-tronco não se mostrou muito eficiente, especialmente para tecidos como nervoso, muscular esquelético e liso. Entretanto, pesquisas do nosso laboratório com transplante de célula-tronco em modelos animais afetados por doenças mostraram-se clinicamente benéficas ^[158-160]. Hoje se acredita que isso possa ocorrer em decorrência de um efeito imuno-modulatório das células-tronco, em particular as mesenquimais (CTM) e os pericitos ^[161].

Após uma lesão, a ativação do sistema imune está entre as primeiras respostas detectáveis no local danificado e se haverá a regeneração do tecido ou a formação de uma cicatriz, isto é determinado por uma série de fatores que incluem a idade, a espécie, e a disponibilidade da célula-tronco ou de células progenitoras. O sistema imune é uma parte essencial no início do desenvolvimento do organismo nos mamíferos, assim como na substituição contínua de tipos celulares diferenciados para a manutenção da homeostase ^[162].

Minutos após uma lesão no tecido, neutrófilos e outras células inflamatórias secretam moléculas reativas que podem danificar ainda mais o tecido alvo. Além disso, inflamação crônica promove o remodelamento do tecido e traz uma incapacidade funcional do tecido em uma série de doenças. Diversos estudos sugerem que a modulação terapêutica do sistema imune no sistema

nervoso pode ser uma nova abordagem que pode promover a regeneração por si só ou pode promover um ambiente permissivo para sua regeneração ^[162].

Ultimamente diversos ensaios terapêuticos para doenças neurodegenerativas, tais como esclerose lateral amiotrófica ^[163], esclerose múltipla, danos na medula espinhal, autismo, entre outras ^[164] estão comparando o efeito de células-tronco ou seus fatores secretados com o objetivo de modular o sistema imune ^[165] na tentativa de promover uma melhora clínica nos pacientes.

No presente estudo, as análises de microarranjo de expressão sugerem que o sistema imunológico com o envolvimento em comum dos genes *C2*, *HLA-DRB1* e *LY6G6C* poderiam determinar se um indivíduo apresenta ou não os sintomas da doença. Como o desenvolvimento do indivíduo e a manutenção homeostática dos tecidos é altamente influenciada pelo sistema imune, alterações finas nesse sistema poderiam determinar parte da variabilidade clínica vista em pacientes com PEH.

A diferença de penetrância entre os sexos poderia ser devido a uma ação diferenciada do sistema imune dependendo do gênero. Os hormônios esteroides sexuais incluem andrógenos, estrógeno e progesterona, e seus receptores estão presentes em numerosos tecidos, incluindo o coração, ossos, músculos esqueléticos, sistema vascular, o fígado, o sistema imunológico, cérebro. Embora os níveis de andrógenos circulantes sejam maiores em homens do que em mulheres, e os níveis circulantes de estrogênio/ progesterona são mais elevados em mulheres na pré-menopausa do que em homens, os dois sexos produzem estrogênio, progesterona e andrógeno ^[166].

Entretanto, outros estudos, entre eles a análise funcional das diferenças aqui observadas deverão ser realizadas para confirmar o seu envolvimento no aparecimento ou não dos sintomas de PEH da família em estudo.

VI. Conclusão

Os resultados do presente estudo permitiram concluir:

1. Uma análise mais robusta de um grande número de marcadores genéticos (SNP) em famílias com pedigree complexo requer o desenvolvimento de novas estratégias computacionais.

2. A atuação dos genes *C2*, *HLA-DRB1* e *LY6G6C*, via resposta inata e adaptativa do sistema imune, pode ser um dos moduladores do fenótipo dos pacientes da família brasileira com SPG4.

Resumo

As doenças neuromusculares incluem um grupo muito heterogêneo de patologias que atingem 1 em cada 1.000 indivíduos nascidos vivos. Dentre as doenças neuromusculares destacam-se as paraplegias espásticas hereditárias que acometem, aproximadamente, cerca de 1 em cada 10.000.

As paraplegias espásticas hereditárias (PEH) são caracterizadas pela espasticidade e fraqueza muscular dos membros inferiores. São muito heterogêneas tanto em clínica como geneticamente. Diversas formas já foram descritas e a mais comum delas, acometendo por volta de 40% dos casos autossômicos dominantes, causada por mutações no gene *SPAST* (PEH do tipo 4 ou SPG4).

Estudos de correlação genótipo: fenótipo têm mostrado que indivíduos da mesma família carregando a mesma mutação patogênica, podem ter quadro clínico muito distinto. A explicação para esta questão pode estar na procura por genes modificadores, no padrão de expressão, na análise proteômica (seja por ligantes a proteínas ou no dobramento das mesmas), ou em mecanismos epigenéticos. Além disso, em algumas formas observa-se uma diferença na porcentagem de pessoas afetadas de acordo com o sexo. Essa desproporção foi observada numa grande família de com PEH na qual existe um predomínio de afetados do sexo masculino.

O objetivo do presente trabalho foi a análise de pacientes discordantes, ou seja, que possuam a mesma mutação, porém com quadro clínico discordante de uma grande família brasileira com SGP4. Para isso foi feito um estudo da abundância de transcritos (mRNA) e de genótipo (polimorfismos de base única) em relação a um fenótipo (sintomático ou assintomático).

Os resultados sugerem que o principal sistema envolvido, que poderia explicar as diferenças entre os pacientes discordantes, é o sistema imune, com a principal atuação dos genes *C2*, *HLA-DRB1* e *LY6G6C*. Esses genes podem ter papel protetor ou tóxico no desenvolvimento do quadro clínico dos pacientes analisados.

Abstract

The hereditary spastic paraplegia (HSP) is characterized by muscle weakness and lower limb spasticity. They are very heterogeneous both clinically and genetically. Several forms have been described and the most common one, affecting around 40% of autosomal dominant cases, is caused by mutations in the *SPAST* gene (HSP type 4 or SPG4).

Genotype: phenotype correlation studies have shown that affected individuals from the same family, who carry the same pathogenic mutation, can have very distinct phenotypes. The underlying explanation behind this clinical heterogeneity may be found in the search for modifier genes, in expression patterns observed proteomic analyses (either by protein binding or folding), or epigenetic mechanisms. As is observed in other motor neurodegenerative diseases, there is a disproportion between the number of affected males and females, with males being the predominantly affected.

The objective of this study was to analyze discordant patients, i.e., those that possess the same mutation, but show discordant phenotypes, from a large Brazilian family with SPG4. For this study, the abundance of transcripts (mRNA) and genotype (single nucleotide polymorphisms) relative to a phenotype (symptomatic or asymptomatic) were analyzed.

The results suggest that the main system involved, which could explain the differences between discordant patients, is the immune system, with the main activity of *C2*, *LY6G6C* and *HLA-DRB1* genes. These genes may have a protective or toxic role in the development of the analyzed patients' clinical features.

Bibliografia

1. Compston, A., *Anita Harding - (17 September 1952-11 September 1995) - Obituary*. Journal of Neurology, 1996. **243**(4): p. 303-304.
2. Engmann, B., A. Wagner, and H. Steinberg, *Adolf von Strumpell: a key yet neglected protagonist of neurology*. J Neurol, 2012. **259**(10): p. 2211-20.
3. Reid, E., *Many pathways lead to hereditary spastic paraplegia*. Lancet Neurol, 2003. **2**(4): p. 210.
4. Harding, A.E., *Classification of the hereditary ataxias and paraplegias*. Lancet, 1983. **1**(8334): p. 1151-5.
5. McDermott, C., et al., *Hereditary spastic paraparesis: a review of new developments*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2000. **69**(2): p. 150-60.
6. Harding, A.E., *Hereditary "pure" spastic paraplegia: a clinical and genetic study of 22 families*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1981. **44**(10): p. 871-83.
7. Henson, B.J., et al., *Transcriptional and post-transcriptional regulation of SPAST, the gene most frequently mutated in hereditary spastic paraplegia*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e36505.
8. Néstor Gálvez-Jiménez, P.T., *Uncommon Causes of Movement Disorders* 2011, Cambridge University Press. p. 346.
9. Fink, J.K., *Hereditary spastic paraplegia: clinico-pathologic features and emerging molecular mechanisms*. Acta Neuropathol, 2013. **126**(3): p. 307-28.
10. Finsterer, J., et al., *Hereditary spastic paraplegias with autosomal dominant, recessive, X-linked, or maternal trait of inheritance*. J Neurol Sci, 2012. **318**(1-2): p. 1-18.
11. Salinas, S., et al., *Hereditary spastic paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms*. Lancet Neurol, 2008. **7**(12): p. 1127-38.
12. Ivanhoe, C.B. and T.A. Reistetter, *Spasticity: the misunderstood part of the upper motor neuron syndrome*. Am J Phys Med Rehabil, 2004. **83**(10 Suppl): p. S3-9.
13. Dietz, V. and T. Sinkjaer, *Spastic movement disorder: impaired reflex function and altered muscle mechanics*. Lancet Neurol, 2007. **6**(8): p. 725-33.
14. Fink, J.K. and P. Hedera, *Hereditary spastic paraplegia: genetic heterogeneity and genotype-phenotype correlation*. Semin Neurol, 1999. **19**(3): p. 301-9.
15. Tallaksen, C.M., A. Durr, and A. Brice, *Recent advances in hereditary spastic paraplegia*. Curr Opin Neurol, 2001. **14**(4): p. 457-63.
16. Reddy, P.L., W.K. Seltzer, and R.P. Grewal, *Possible anticipation in hereditary spastic paraplegia type 4 (SPG4)*. Can J Neurol Sci, 2007. **34**(2): p. 208-10.
17. Uttner, I., et al., *Cognitive performance in pure and complicated hereditary spastic paraparesis: a neuropsychological and neuroimaging study*. Neurosci Lett, 2007. **419**(2): p. 158-61.
18. Tallaksen, C.M., et al., *Subtle cognitive impairment but no dementia in patients with spastin mutations*. Arch Neurol, 2003. **60**(8): p. 1113-8.
19. Klebe, S., et al., *Gait analysis of sporadic and hereditary spastic paraplegia*. J Neurol, 2004. **251**(5): p. 571-8.
20. Strong, M.J. and P.H. Gordon, *Primary lateral sclerosis, hereditary spastic paraplegia and amyotrophic lateral sclerosis: discrete entities or spectrum?* Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord, 2005. **6**(1): p. 8-16.
21. Fink, J.K., *Advances in hereditary spastic paraplegia*. Curr Opin Neurol, 1997. **10**(4): p. 313-8.

22. Fink, J.K., *Advances in the hereditary spastic paraplegias*. Exp Neurol, 2003. **184 Suppl 1**: p. S106-10.
23. Durr, A., et al., *The phenotype of "pure" autosomal dominant spastic paraplegia*. Neurology, 1994. **44**(7): p. 1274-7.
24. Polo, J.M., et al., *Hereditary "pure" spastic paraplegia: a study of nine families*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1993. **56**(2): p. 175-81.
25. Cartlidge, N.E. and G. Bone, *Sphincter involvement in hereditary spastic paraplegia*. Neurology, 1973. **23**(11): p. 1160-3.
26. Schwarz, G.A. and C.N. Liu, *Hereditary (familial) spastic paraplegia; further clinical and pathologic observations*. AMA Arch Neurol Psychiatry, 1956. **75**(2): p. 144-62.
27. Scheltens, P., R.P. Bruyn, and G.J. Hazenberg, *A Dutch family with autosomal dominant pure spastic paraparesis (Strumpell's disease)*. Acta Neurol Scand, 1990. **82**(3): p. 169-73.
28. Kumar, K.R., et al., *Peripheral neuropathy in hereditary spastic paraplegia due to spastin (SPG4) mutation--a neurophysiological study using excitability techniques*. Clin Neurophysiol, 2012. **123**(7): p. 1454-9.
29. Schady, W. and A. Sheard, *A quantitative study of sensory function in hereditary spastic paraplegia*. Brain, 1990. **113 (Pt 3)**: p. 709-20.
30. Nanetti, L., et al., *Novel and recurrent spastin mutations in a large series of SPG4 Italian families*. Neurosci Lett, 2012. **528**(1): p. 42-5.
31. Harding, A.E. and P.K. Thomas, *Peroneal muscular atrophy with pyramidal features*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1984. **47**(2): p. 168-72.
32. Ueyama, H., et al., *Hereditary motor and sensory neuropathy type V with spinal cord atrophy on magnetic resonance imaging*. Eur Neurol, 1993. **33**(5): p. 399-400.
33. Silver, J.R., *Familial spastic paraplegia with amyotrophy of the hands*. Ann Hum Genet, 1966. **30**(1): p. 69-75.
34. Cross, H.E. and V.A. McKusick, *The Troyer syndrome. A recessive form of spastic paraplegia with distal muscle wasting*. Arch Neurol, 1967. **16**(5): p. 473-85.
35. Bouchard, J.P., et al., *Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay*. Can J Neurol Sci, 1978. **5**(1): p. 61-9.
36. Garaci, F., et al., *Diffusion tensor imaging in SPG11- and SPG4-linked hereditary spastic paraplegia*. Int J Neurosci, 2013.
37. Crosby, A.H. and C. Proukakis, *Is the transportation highway the right road for hereditary spastic paraplegia?* Am J Hum Genet, 2002. **71**(5): p. 1009-16.
38. Racis, L., et al., *The high prevalence of hereditary spastic paraplegia in Sardinia, insular Italy*. J Neurol, 2014. **261**(1): p. 52-9.
39. Polo, J.M., et al., *Hereditary ataxias and paraplegias in Cantabria, Spain. An epidemiological and clinical study*. Brain, 1991. **114 (Pt 2)**: p. 855-66.
40. Crippa, F., et al., *Eight novel mutations in SPG4 in a large sample of patients with hereditary spastic paraplegia*. Arch Neurol, 2006. **63**(5): p. 750-5.
41. Depienne, C., et al., *Spastin mutations are frequent in sporadic spastic paraparesis and their spectrum is different from that observed in familial cases*. J Med Genet, 2006. **43**(3): p. 259-65.
42. Brugman, F., et al., *Spastin mutations in sporadic adult-onset upper motor neuron syndromes*. Ann Neurol, 2005. **58**(6): p. 865-9.
43. Alvarez, V., et al., *Mutational spectrum of the SPG4 (SPAST) and SPG3A (ATL1) genes in Spanish patients with hereditary spastic paraplegia*. BMC Neurol, 2010. **10**: p. 89.
44. Battini, R., et al., *Clinical and genetic findings in a series of Italian children with pure hereditary spastic paraplegia*. Eur J Neurol, 2011. **18**(1): p. 150-7.

45. Smith, L.M., et al., *Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis*. Nature, 1986. **321**(6071): p. 674-9.
46. Schouten, J.P., et al., *Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(12): p. e57.
47. Kumar, K.R., et al., *Targeted next generation sequencing in SPAST-negative hereditary spastic paraplegia*. J Neurol, 2013. **260**(10): p. 2516-22.
48. Butler, R., et al., *Genetic and chemical modulation of spastin-dependent axon outgrowth in zebrafish embryos indicates a role for impaired microtubule dynamics in hereditary spastic paraplegia*. Dis Model Mech, 2010. **3**(11-12): p. 743-51.
49. Fassier, C., et al., *Microtubule-targeting drugs rescue axonal swellings in cortical neurons from spastin knockout mice*. Dis Model Mech, 2013. **6**(1): p. 72-83.
50. Blackstone, C., C.J. O'Kane, and E. Reid, *Hereditary spastic paraplegias: membrane traffic and the motor pathway*. Nat Rev Neurosci, 2011. **12**(1): p. 31-42.
51. Deluca, G.C., G.C. Ebers, and M.M. Esiri, *The extent of axonal loss in the long tracts in hereditary spastic paraplegia*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2004. **30**(6): p. 576-84.
52. Almenar-Queralt, A. and L.S. Goldstein, *Linkers, packages and pathways: new concepts in axonal transport*. Curr Opin Neurobiol, 2001. **11**(5): p. 550-7.
53. Evans, K.J., et al., *Linking axonal degeneration to microtubule remodeling by Spastin-mediated microtubule severing*. J Cell Biol, 2005. **168**(4): p. 599-606.
54. Koppen, M. and T. Langer, *Protein degradation within mitochondria: versatile activities of AAA proteases and other peptidases*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2007. **42**(3): p. 221-42.
55. Rahman, A., et al., *Defective kinesin heavy chain behavior in mouse kinesin light chain mutants*. J Cell Biol, 1999. **146**(6): p. 1277-88.
56. Lan, M.Y., et al., *Clinical and genetic analysis of four Taiwanese families with autosomal dominant hereditary spastic paraplegia*. J Formos Med Assoc, 2012. **111**(7): p. 380-5.
57. Tarrade, A., et al., *A mutation of spastin is responsible for swellings and impairment of transport in a region of axon characterized by changes in microtubule composition*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(24): p. 3544-58.
58. McDermott, C.J., et al., *Clinical features of hereditary spastic paraplegia due to spastin mutation*. Neurology, 2006. **67**(1): p. 45-51.
59. Charvin, D., et al., *Mutations of SPG4 are responsible for a loss of function of spastin, an abundant neuronal protein localized in the nucleus*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(1): p. 71-8.
60. Hazan, J., et al., *Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia*. Nat Genet, 1999. **23**(3): p. 296-303.
61. Sulek, A., et al., *Screening for the hereditary spastic paraplaegias SPG4 and SPG3A with the multiplex ligation-dependent probe amplification technique in a large population of affected individuals*. Neurol Sci, 2013. **34**(2): p. 239-42.
62. Schule, R. and L. Schols, *Genetics of hereditary spastic paraplegias*. Semin Neurol, 2011. **31**(5): p. 484-93.
63. Feng, Y., et al., *Novel deletion of SPAST in a Chinese family with hereditary spastic paraplegia*. Singapore Med J, 2013. **54**(5): p. 251-4.
64. Higgins, J.J., et al., *An atypical intronic deletion widens the spectrum of mutations in hereditary spastic paraplegia*. Neurology, 2001. **56**(11): p. 1482-5.

65. Beetz, C., et al., *Linkage to a known gene but no mutation identified: comprehensive reanalysis of SPG4 HSP pedigrees reveals large deletions as the sole cause*. Hum Mutat, 2007. **28**(7): p. 739-40.
66. Park, S.Y., et al., *Mutation analysis of SPG4 and SPG3A genes and its implication in molecular diagnosis of Korean patients with hereditary spastic paraplegia*. Arch Neurol, 2005. **62**(7): p. 1118-21.
67. Lindsey, J.C., et al., *Mutation analysis of the spastin gene (SPG4) in patients with hereditary spastic paraparesis*. J Med Genet, 2000. **37**(10): p. 759-65.
68. Magariello, A., et al., *Novel spastin (SPG4) mutations in Italian patients with hereditary spastic paraplegia*. Neuromuscul Disord, 2006. **16**(6): p. 387-90.
69. Falco, M., et al., *Two novel mutations in the spastin gene (SPG4) found by DHPLC mutation analysis*. Neuromuscul Disord, 2004. **14**(11): p. 750-3.
70. Fei, Q.Z., et al., *Two novel mutations in the Spastin gene of Chinese patients with hereditary spastic paraplegia*. Eur J Neurol, 2011. **18**(9): p. 1194-6.
71. Solowska, J.M., J.Y. Garbern, and P.W. Baas, *Evaluation of loss of function as an explanation for SPG4-based hereditary spastic paraplegia*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(14): p. 2767-79.
72. Eckert, T., et al., *Subunit Interactions and cooperativity in the microtubule-severing AAA ATPase spastin*. J Biol Chem, 2012. **287**(31): p. 26278-90.
73. Solowska, J.M., et al., *Pathogenic Mutation of Spastin Has Gain-of-Function Effects on Microtubule Dynamics*. J Neurosci, 2014. **34**(5): p. 1856-67.
74. Molon, A., et al., *Novel spastin mutations and their expression analysis in two Italian families*. Eur J Hum Genet, 2003. **11**(9): p. 710-3.
75. Riano, E., et al., *Pleiotropic effects of spastin on neurite growth depending on expression levels*. J Neurochem, 2009. **108**(5): p. 1277-88.
76. Solowska, J.M., et al., *Quantitative and functional analyses of spastin in the nervous system: implications for hereditary spastic paraplegia*. J Neurosci, 2008. **28**(9): p. 2147-57.
77. Proukakis, C., et al., *Screening of patients with hereditary spastic paraplegia reveals seven novel mutations in the SPG4 (Spastin) gene*. Hum Mutat, 2003. **21**(2): p. 170.
78. Schickel, J., et al., *Unexpected pathogenic mechanism of a novel mutation in the coding sequence of SPG4 (spastin)*. Neurology, 2006. **66**(3): p. 421-3.
79. Fonknechten, N., et al., *Spectrum of SPG4 mutations in autosomal dominant spastic paraplegia*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(4): p. 637-44.
80. Orlacchio, A., et al., *Clinical and genetic study of a large SPG4 Italian family*. Mov Disord, 2005. **20**(8): p. 1055-9.
81. Mitne-Neto, M., et al., *A multi-exonic SPG4 duplication underlies sex-dependent penetrance of hereditary spastic paraplegia in a large Brazilian pedigree*. Eur J Hum Genet, 2007. **15**(12): p. 1276-9.
82. Starling, A., et al., *Autosomal dominant (AD) pure spastic paraplegia (HSP) linked to locus SPG4 affects almost exclusively males in a large pedigree*. J Med Genet, 2002. **39**(12): p. e77.
83. Varga, R.E., et al., *Do not trust the pedigree: reduced and sex-dependent penetrance at a novel mutation hotspot in ATL1 blurs autosomal dominant inheritance of spastic paraplegia*. Hum Mutat, 2013. **34**(6): p. 860-3.
84. Iwanaga, H., et al., *Large deletion involving the 5'-UTR in the spastin gene caused mild phenotype of autosomal dominant hereditary spastic paraplegia*. Am J Med Genet A, 2005. **133A**(1): p. 13-7.

85. Byrne, P.C., et al., *Linkage of AD HSP and cognitive impairment to chromosome 2p: haplotype and phenotype analysis indicates variable expression and low or delayed penetrance*. Eur J Hum Genet, 1998. **6**(3): p. 275-82.
86. Loureiro, J.L., et al., *Autosomal dominant spastic paraplegias: a review of 89 families resulting from a portuguese survey*. JAMA Neurol, 2013. **70**(4): p. 481-7.
87. Pantakani, D.V., et al., *Compound heterozygosity in the SPG4 gene causes hereditary spastic paraplegia*. Clin Genet, 2008. **73**(3): p. 268-72.
88. Svenson, I.K., et al., *Intragenic modifiers of hereditary spastic paraplegia due to spastin gene mutations*. Neurogenetics, 2004. **5**(3): p. 157-64.
89. Sanchez-Ferrero, E., et al., *Mitochondrial DNA polymorphisms/haplogroups in hereditary spastic paraplegia*. J Neurol, 2012. **259**(2): p. 246-50.
90. Svergun, D.I., M.V. Petoukhov, and M.H. Koch, *Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering*. Biophys J, 2001. **80**(6): p. 2946-53.
91. Santorelli, F.M., et al., *Intrafamilial variability in hereditary spastic paraplegia associated with an SPG4 gene mutation*. Neurology, 2000. **55**(5): p. 702-5.
92. Klimpe, S., et al., *Evaluating the effect of spastin splice mutations by quantitative allele-specific expression assay*. Eur J Neurol, 2011. **18**(1): p. 99-105.
93. Badano, J.L., T.M. Teslovich, and N. Katsanis, *The centrosome in human genetic disease*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(3): p. 194-205.
94. Svenson, I.K., et al., *Subcellular localization of spastin: implications for the pathogenesis of hereditary spastic paraplegia*. Neurogenetics, 2005. **6**(3): p. 135-41.
95. Salinas, S., et al., *Spastin and microtubules: Functions in health and disease*. J Neurosci Res, 2007. **85**(12): p. 2778-82.
96. Koppen, M., et al., *Variable and tissue-specific subunit composition of mitochondrial m-AAA protease complexes linked to hereditary spastic paraplegia*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(2): p. 758-67.
97. Claudiani, P., et al., *Spastin subcellular localization is regulated through usage of different translation start sites and active export from the nucleus*. Exp Cell Res, 2005. **309**(2): p. 358-69.
98. Reid, E., et al., *The hereditary spastic paraplegia protein spastin interacts with the ESCRT-III complex-associated endosomal protein CHMP1B*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(1): p. 19-38.
99. Gluzman, Y., *SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants*. Cell, 1981. **23**(1): p. 175-82.
100. Masters, J.R., *HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(4): p. 315-9.
101. Sanderson, C.M., et al., *Spastin and atlastin, two proteins mutated in autosomal-dominant hereditary spastic paraplegia, are binding partners*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(2): p. 307-18.
102. Gould, R.M. and S.T. Brady, *Neuropathology: many paths lead to hereditary spastic paraplegia*. Curr Biol, 2004. **14**(20): p. R903-4.
103. Trotta, N., et al., *The hereditary spastic paraplegia gene, spastin, regulates microtubule stability to modulate synaptic structure and function*. Curr Biol, 2004. **14**(13): p. 1135-47.
104. Wood, J.D., et al., *The microtubule-severing protein Spastin is essential for axon outgrowth in the zebrafish embryo*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(18): p. 2763-71.
105. Roll-Mecak, A. and R.D. Vale, *Structural basis of microtubule severing by the hereditary spastic paraplegia protein spastin*. Nature, 2008. **451**(7176): p. 363-7.

106. Park, S.H., et al., *Hereditary spastic paraplegia proteins REEP1, spastin, and atlastin-1 coordinate microtubule interactions with the tubular ER network*. J Clin Invest, 2010. **120**(4): p. 1097-110.
107. Chang, J., S. Lee, and C. Blackstone, *Protrudin binds atlastins and endoplasmic reticulum-shaping proteins and regulates network formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(37): p. 14954-9.
108. Havlicek, S., et al., *Gene dosage-dependent rescue of HSP neurite defects in SPG4 patients' neurons*. Hum Mol Genet, 2014.
109. Denton, K.R., et al., *Loss of spastin function results in disease-specific axonal defects in human pluripotent stem cell-based models of hereditary spastic paraplegia*. Stem Cells, 2014. **32**(2): p. 414-23.
110. Salinas, S., et al., *Human spastin has multiple microtubule-related functions*. J Neurochem, 2005. **95**(5): p. 1411-20.
111. Jean, D.C. and P.W. Baas, *It cuts two ways: microtubule loss during Alzheimer disease*. EMBO J, 2013. **32**(22): p. 2900-2.
112. Boone, P.M., et al., *Alu-specific microhomology-mediated deletion of the final exon of SPAST in three unrelated subjects with hereditary spastic paraplegia*. Genet Med, 2011. **13**(6): p. 582-92.
113. Franca, M., Jr., et al., *SPG4-related hereditary spastic paraplegia: frequency and mutation spectrum in Brazil*. Clin Genet, 2013.
114. Griffiths, A.J.F., *An introduction to genetic analysis*. 7th ed. ed. 2000, New York: W.H. Freeman.
115. Mc Monagle, P., et al., *Clinical and pathologic findings in hereditary spastic paraparesis with spastin mutation*. Neurology, 2001. **56**(1): p. 139.
116. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
117. Pettersson, E., J. Lundeberg, and A. Ahmadian, *Generations of sequencing technologies*. Genomics, 2009. **93**(2): p. 105-11.
118. Miller, S.A., D.D. Dykes, and H.F. Polesky, *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(3): p. 1215.
119. Haslett, J.N. and L.M. Kunkel, *Microarray analysis of normal and dystrophic skeletal muscle*. Int J Dev Neurosci, 2002. **20**(3-5): p. 359-65.
120. White, A.M., et al., *Automated Microarray Image Analysis Toolbox for MATLAB*. Bioinformatics, 2005. **21**(17): p. 3578-9.
121. Klug, W.S.a., et al., *Essentials of genetics*. Eighth edition. ed.
122. Gladkevich, A., H.F. Kauffman, and J. Korf, *Lymphocytes as a neural probe: potential for studying psychiatric disorders*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2004. **28**(3): p. 559-76.
123. Glatt, S.J., et al., *Comparative gene expression analysis of blood and brain provides concurrent validation of SELENBP1 up-regulation in schizophrenia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(43): p. 15533-8.
124. Matigian, N.A., et al., *Fibroblast and lymphoblast gene expression profiles in schizophrenia: are non-neural cells informative?* PLoS One, 2008. **3**(6): p. e2412.
125. Tsuang, M.T., et al., *Assessing the validity of blood-based gene expression profiles for the classification of schizophrenia and bipolar disorder: a preliminary report*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2005. **133B**(1): p. 1-5.
126. Van Hoecke, A., et al., *EPHA4 is a disease modifier of amyotrophic lateral sclerosis in animal models and in humans*. Nat Med, 2012. **18**(9): p. 1418-22.

127. Irizarry, R.A., et al., *Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(4): p. e15.
128. Johnson, W.E., C. Li, and A. Rabinovic, *Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods*. Biostatistics, 2007. **8**(1): p. 118-27.
129. Breitling, R., et al., *Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments*. FEBS Lett, 2004. **573**(1-3): p. 83-92.
130. Benjamini, Y. and Y. Hochberg, *Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing*. Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological, 1995. **57**(1): p. 289-300.
131. Rabbee, N. and T.P. Speed, *A genotype calling algorithm for affymetrix SNP arrays*. Bioinformatics, 2006. **22**(1): p. 7-12.
132. O'Connell, J.R. and D.E. Weeks, *PedCheck: a program for identification of genotype incompatibilities in linkage analysis*. Am J Hum Genet, 1998. **63**(1): p. 259-66.
133. Ruschendorf, F. and P. Nurnberg, *ALOHOMORA: a tool for linkage analysis using 10K SNP array data*. Bioinformatics, 2005. **21**(9): p. 2123-5.
134. Abecasis, G.R., et al., *GRR: graphical representation of relationship errors*. Bioinformatics, 2001. **17**(8): p. 742-3.
135. Abecasis, G.R., et al., *Merlin--rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees*. Nat Genet, 2002. **30**(1): p. 97-101.
136. Purcell, S., et al., *PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses*. Am J Hum Genet, 2007. **81**(3): p. 559-75.
137. Kurbasic, A. and O. Hossjer, *On computation of p-values in parametric linkage analysis*. Hum Hered, 2004. **57**(4): p. 207-19.
138. Liu, F., et al., *An approach for cutting large and complex pedigrees for linkage analysis*. Eur J Hum Genet, 2008. **16**(7): p. 854-60.
139. Kramer, A., et al., *Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis*. Bioinformatics, 2014. **30**(4): p. 523-30.
140. Long, F., et al., *Genome-wide prediction and analysis of function-specific transcription factor binding sites*. In Silico Biol, 2004. **4**(4): p. 395-410.
141. Kong, A. and N.J. Cox, *Allele-sharing models: LOD scores and accurate linkage tests*. Am J Hum Genet, 1997. **61**(5): p. 1179-88.
142. de Bot, S.T., et al., *Hereditary spastic paraplegia due to SPAST mutations in 151 Dutch patients: new clinical aspects and 27 novel mutations*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2010. **81**(10): p. 1073-8.
143. Magariello, A., et al., *Mutation analysis of the SPG4 gene in Italian patients with pure and complicated forms of spastic paraplegia*. J Neurol Sci, 2010. **288**(1-2): p. 96-100.
144. Aridon, P., et al., *Autosomal dominant hereditary spastic paraplegia: report of a large Italian family with R581X spastin mutation*. Neurol Sci, 2007. **28**(4): p. 171-4.
145. Heath, S.C., *Markov chain Monte Carlo segregation and linkage analysis for oligogenic models*. Am J Hum Genet, 1997. **61**(3): p. 748-60.
146. Sobel, E. and K. Lange, *Descent graphs in pedigree analysis: applications to haplotyping, location scores, and marker-sharing statistics*. Am J Hum Genet, 1996. **58**(6): p. 1323-37.
147. Service, S., et al., *Results of a SNP genome screen in a large Costa Rican pedigree segregating for severe bipolar disorder*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2006. **141B**(4): p. 367-73.

148. Sieh, W., et al., *Comparison of marker types and map assumptions using Markov chain Monte Carlo-based linkage analysis of COGA data*. BMC Genet, 2005. **6 Suppl 1**: p. S11.
149. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and S. Pillai, *Cellular and molecular immunology*. 6th ed. ed. 2010, Philadelphia, Pa.: Saunders.
150. Hosokawa, M., et al., *Expression of complement messenger RNAs and proteins by human oligodendroglial cells*. Glia, 2003. **42**(4): p. 417-23.
151. Eikelenboom, P., et al., *Complement activation in amyloid plaques in Alzheimer's dementia*. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, 1989. **56**(4): p. 259-62.
152. Rogers, J., et al., *Complement activation by beta-amyloid in Alzheimer disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(21): p. 10016-20.
153. Yasojima, K., et al., *Up-regulated production and activation of the complement system in Alzheimer's disease brain*. Am J Pathol, 1999. **154**(3): p. 927-36.
154. International Multiple Sclerosis Genetics, C., et al., *Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis*. Nature, 2011. **476**(7359): p. 214-9.
155. Rosenthal, S.L. and M.I. Kamboh, *Late-Onset Alzheimer's Disease Genes and the Potentially Implicated Pathways*. Curr Genet Med Rep, 2014. **2**: p. 85-101.
156. Harms, A.S., et al., *MHCII is required for alpha-synuclein-induced activation of microglia, CD4 T cell proliferation, and dopaminergic neurodegeneration*. J Neurosci, 2013. **33**(23): p. 9592-600.
157. Mallya, M., R.D. Campbell, and B. Aguado, *Transcriptional analysis of a novel cluster of LY-6 family members in the human and mouse major histocompatibility complex: five genes with many splice forms*. Genomics, 2002. **80**(1): p. 113-23.
158. Vieira, N.M., et al., *Human adipose-derived mesenchymal stromal cells injected systemically into GRMD dogs without immunosuppression are able to reach the host muscle and express human dystrophin*. Cell Transplant, 2012. **21**(7): p. 1407-17.
159. Secco, M., et al., *Systemic delivery of human mesenchymal stromal cells combined with IGF-1 enhances muscle functional recovery in LAMA2 dy/2j dystrophic mice*. Stem Cell Rev, 2013. **9**(1): p. 93-109.
160. Zucconi, E., et al., *Mesenchymal stem cells derived from canine umbilical cord vein-a novel source for cell therapy studies*. Stem Cells Dev, 2010. **19**(3): p. 395-402.
161. Valadares, M.C., et al., *Human Adipose Tissue Derived Pericytes Increase Life Span in Utrn Dmd /J Mice*. Stem Cell Rev, 2014.
162. Aurora, A.B. and E.N. Olson, *Immune Modulation of Stem Cells and Regeneration*. Cell Stem Cell, 2014. **15**(1): p. 14-25.
163. Morgan, R.H. and A.K. Srivastava, *Clinical relevance of stem cell therapies in amyotrophic lateral sclerosis*. Neurol India, 2014. **62**(3): p. 239-48.
164. Ng, T.K., et al., *Progress of mesenchymal stem cell therapy for neural and retinal diseases*. World J Stem Cells, 2014. **6**(2): p. 111-9.
165. Kassis, I., A. Vaknin-Dembinsky, and D. Karussis, *Bone marrow mesenchymal stem cells: agents of immunomodulation and neuroprotection*. Curr Stem Cell Res Ther, 2011. **6**(1): p. 63-8.
166. Blair, M.L., *Sex-based differences in physiology: what should we teach in the medical curriculum?* Adv Physiol Educ, 2007. **31**(1): p. 23-5.

Anexo 1
Functions

Category	p-value	Molecules
Inflammatory Response	4.31E-14-1.73E-02	DPYSL2,ELANE,HLA-DRB1,SIGLEC10,HLA-DQB1,MKI67,LRPAP1,ITGB3,CXCL10,PRF1,LTF,HMGB1,mir-15,PPBP,NAPA,CYSLTR2,ATM,IL2RB,STAT5A,CMKLR1,mir-29,TUBB2A,IL12RB2,NFKB2,IRF5,IRF1,MPO,CD9,CAPN1,MAP2K3,NDST1,MT1E,GSTP1,RAP1B,ADM,MME,CA2,SERPING1,ITGA2B,CEACAM6,ICAM1,IL1RL1,PLA2G10,CCBP2,HLA-DQA1,SELENBP1,TGM2,LIPA,CD47,CST3,MMP8,TLR7,VDR,CCR1,ALOX15,TUBB1,SLC4A1,GNA12,HDC,DRD5,CYP1B1,mir-27,APP,GPI,LY96,NR4A2,WAS,HBZ,MS4A2,MYH9,CTSE,HRH4,ABCD2,SOCS3,CCR3,CD4,CX3CR1,TBX21,HSPA5,IL31RA,GATA2,LIMK1,CES1,E2F2,CEACAM1,FERMT3,EIF2AK1,C3,IL5RA,GM2A,LCN2,IFNGR1,KEL,GSN,mir-186,C1GALT1,TNS1,PVRL2,ABCD1,SCD,CLIC1,PRDX6,NRG1,HMOX1,DIAPH1,SH2D1A,PDCD1LG2,TIMP1,FLNA,THBS1,GP1BA,S100A8,CHUK,MFN2,HLA-DMA,IL3RA,RELB,AP3D1,CSF1R,P2RY2,IGJ,KLRC4-KLRK1/KLRK1,ASAP2,CLU
Infectious Disease	2.92E-10-1.73E-02	ABCD2,MT2A,SOCS3,SLC31A1,CD4,ELANE,HLA-DQB1,CX3CR1,IL31RA,TBX21,HSPA5,LRPAP1,ITGB3,CXCL10,PRF1,LTF,HMGB1,PPBP,SUB1,CYSLTR2,GCA,E2F2,ATM,IL2RB,ASGR2,STAT5A,CMKLR1,IL5RA,C3,TUBB2A,LCN2,IL12RB2,IFNGR1,NFKB2,MYOF,IRF5,IRF1,IRF1,DAXX,MPO,UBE2H,APOBEC3C,MAP2K3,STAT2,PML,ICAM1,CEACAM6,IL1RL1,RSAD2,IFIT1B,TGM2,NRG1,HMOX1,DIAPH1,CD47,SH2D1A,PDCD1LG2,FLNA,CST3,TIMP1,MM P8,TLR7,RNH1,CHUK,VDR,CCR1,ZNF292,HLA-DMA,TUBB1,AP2M1,OAS1,EPAS1,RELB,AP3D1,HDC,DRD5,HIP1,PLXND1,APP,APOL1,PI3,LY96,GPI,CEACAM8,HBZ,KLRC4-KLRK1/KLRK1,IGJ,CLU
Immunological Disease	5.75E-09-1.73E-02	DPYSL2,FURIN,ELANE,HLA-DRB1,MKI67,HLA-DQB1,CXCL10,PRF1,HMGB1,LTF,PPBP,CYSLTR2,NAPA,ATM,IL2RB,TUBB2A,IL12RB2,NFKB2,IRF5,IRF1,DAXX,MPO,AHI1,MT1E,MME,ADM,PRRC2A,CA2,SERPING1,ICAM1,GBP1,IL1RL1,BAG6,CCBP2,HLA-DQA1,FOLR2,SELENBP1,TGM2,CD47,HLA-DQB2,CST3,MMP8,TLR7,Sort1,VDR,RPL31,CCR1,TUBB1,OAS1,CLEC2D,HDC,PI3,GRIK4,WAS,SUMO4,MS4A2,MYH9,EMR1,HRH4,TCF7L2,CCR3,SOCS3,HSPA1A/HSPA1B,CD4,TYMP,CX3CR1,TBX21,IL31RA,HSPA5,MUC21,E2F2,CEACAM1,C3,LCN2,IFNGR1,KEL,GSN,DDB1,UBE2H,LY6G6C,HLA-DQA2,C2,TAX1BP1,PRDX6,NRG1,HMOX1,ALDH2,SH2D1A,PDCD1LG2,TIMP1,FLNA,THBS1,GP1BA,S100A8,HLA-DMA,IL3RA,RELB,CSF1R,PLXND1,CEACAM8,LAP3,CLU
Developmental Disorder	2.01E-08-1.73E-02	HK1,EIF2AK1,SERPING1,FURIN,SLC4A1,C3,TGFBI,LCN2,ELANE,IL31RA,GSN,APP,ANK1,GPI,CST3,BMPR1A,WAS,SPTB,FECH,ALAS2,C2
Hereditary Disorder	2.01E-08-1.27E-02	ITGA2B,FURIN,SERPING1,ELANE,IL31RA,ANK1,ITGB3,LTF,THBS1,CST3,PPBP,SPTB,EIF2AK1,HK1,SLC4A1,C3,TGFBI,LCN2,GSN,APP,GPI,MPO,LCN1,FECH,ALAS2,C2
Metabolic Disease	2.01E-08-3.71E-03	FURIN,HSPA1A/HSPA1B,CD4,HLA-DQB1,IL31RA,LRPAP1,ITGB3,PRF1,HMGB1,MUC21,KLF11,E2F2,IL2RB,EIF2AK1,AQP7,C3,mir-29,LCN2,IFNGR1,GSN,IRF1,AHI1,LY6G6C,ALAS2,HLA-DQA2,LGALS12,MME,SCD,PRRC2A,CA2,ITGA2B,ICAM1,GLRA3,BAG6,HLA-DQA1,TGM2,LIPA,ALDH2,PDCD1LG2,HLA-DQB2,THBS1,BMPR1A,CST3,TLR7,CHUK,VDR,HLA-DMA,ALOX15,OAS1,EPAS1,CLEC2D,JAZF1,TGFBI,RELB,HDC,DRD5,APP,NR4A2,SUMO4,IGF2BP2,FECH,LRP1,CLU,TCF7L2
Cellular Movement	2.26E-07-1.57E-02	FURIN,ELANE,DOCK4,LRPAP1,ODC1,ITGB3,CXCL10,HMGB1,LTF,mir-15,PPBP,PLXNB2,IL2RB,ATM,STAT5A,SMAD2,CMKLR1,mir-29,PIGF,UTS2,NFKB2,MPO,CD9,CAPN1,MAP2K3,NDST1,MME,RAP1B,ADM,SERPING1,PIK3CA,ICAM1,GBP1,IL1RL1,PLA2G10,CCBP2,TGM2,CD47,CST3,MMP8,Sort1,VDR,CCR1,TGFBI,GNA12,DRD5,ENG,CYP1B1,APP,TNS3,GPI,NR4A2,WAS,GPBAR1,MYH9,MAFB,LRP1,NCAM1,CCR3,SOCS3,FOXO4,TLN1,TYMP,CX3CR1,HSPA5,GATA2,LIMK1,CES1,CEACAM1,E2F2,C3,LCN2,IFNGR1,GSN,SORD,C1GALT1,TNS1,S100P,NFIX,RGS18,NRG1,HMOX1,DIAPH1,THBS1,FLNA,TIMP1,GP1BA,RNH1,S100A8,CHUK,AP2M1,ARHGEF12,RELB,PLXND1,CSF1R,GPR56,P2RY2,WARS,ASAP2,CLU
Connective Tissue Disorders	2.95E-07-1.73E-02	SOCS3,FURIN,ELANE,HLA-DRB1,HLA-DQB1,TBX21,HSPA5,CXCL10,HMGB1,LTF,mir-15,CEACAM1,ATM,IL2RB,SMAD2,IL5RA,C3,TUBB2A,LCN2,IFNGR1,IRF5,GSN,IRF1,DAXX,MPO,UBE2H,AHI1,LY6G6C,HLA-DQA2,C2,ADM,PRRC2A,NFIX,ICAM1,IL1RL1,BAG6,HLA-DQA1,SELENBP1,HMOX1,SH2D1A,HLA-DQB2,TIMP1,CST3,THBS1,MMP8,GP1BA,TLR7,S100A8,VDR,RPL31,CCR1,HLA-DMA,TUBB1,IL3RA,GPI,CEACAM8,NR4A2,GRIK4,LAP3,TCF7L2,CLU,LRP1

Inflammatory Disease	2.95E-07-1.73E-02	DPYSL2,FURIN,ELANE,HLA-DRB1,HLA-DQB1,MKI67,ITGB3,CXCL10,PRF1,HMGB1,LTF,mir-15,NAPA,CYSLTR2,ATM,IL2RB,STAT5A,SMAD2,TUBB2A,IL12RB2,NFKB2,IRF5,IRF1,DAXX,MPO,AHI1,GSTP1,MT1E,MME,ADM,PRRC2A,SERPING1,ICAM1,IL1RL1,BAG6,RSAD2,CCBP2,HLA-DQA1,FOLR2,SELENBP1,TGM2,LIPA,CD47,HLA-DQB2,CST3,MMP8,TLR7,VDR,RPL31,CCR1,TUBB1,ALOX15,OAS1,HDC,APP,PI3,GPI,NR4A2,GRIK4,WAS,MS4A2,MYH9,CTSE,TCF7L2,LRP1,SOC3,CCR3,CD4,TYMP,CX3CR1,IL31RA,HSPA5,TBX21,C EACAM1,E2F2,C3,IL5RA,LCN2,IFNGR1,KEL,GSN,DD1,UBE2H,LY6G6C,HLA-DQA2,TNS1,C2,NFIX,PRDX6,NRG1,HMOX1,DIAPH1,SH2D1A,PDCD1LG2,FLNA,TIMP1,THBS1,GP1B A,S100A8,CHUK,HLA-DMA,IL3RA,RELB,PLXND1,CEACAM8,LCN1,RALGAPA1,LAP3,CLU
Skeletal and Muscular Disorders	2.95E-07-1.73E-02	SOC3,FURIN,HSPA1A/HSPA1B,ELANE,HLA-DRB1,HLA-DQB1,TBX21,HSPA5,LIMK1,CXCL10,FAM117A,HMGB1,LTF,mir-15,SUB1,PPBP,NAPA,CEACAM1,ATM,IL2RB,SMAD2,IL5RA,C3,TUBB2A,LCN2,IFNGR1,IRF5,GSN,IRF1,OSBPL8,KPNA5,DAXX,MPO,UBE2H,AHI1,LY6G6C,CFLAR,HLA-DQA2,GSTP1,C2,ADM,PRRC2A,SERPING1,NFIX,ICAM1,IL1RL1,RSAD2,BAG6,HLA-DQA1,EIF4G1,PRDX6,SELENBP1,TGM2,NRG1,ALDH2,HMOX1,CD47,SH2D1A,HLA-DQB2,TIMP1,CST3,THBS1,MMP8,GP1BA,TLR7,S100A8,VDR,RPL31,MFN2,CCR1,HLA-DMA,TUBB1,OAS1,IL3RA,RELB,DRD5,APP,GPI,CEACAM8,NR4A2,GRIK4,LAP3,TCF7L2,LRP1,CLU
Cancer	3.63E-07-1.6E-02	DPYSL2,FURIN,COPS2,ELANE,MKI67,ODC1,ITGB3,CXCL10,PRF1,LTF,HMGB1,mir-15,PPBP,PLXNB2,CYSLTR2,ATM,IL2RB,STAT5A,SMAD2,BCOR,PIGF,mir-29,TUBB2A,PRKRIR,IL12RB2,NFKB2,IRF1,MPO,CD9,AHI1,RGPD8 (includes others),MAP2K3,ALAS2,CFLAR,NDST1,MT1E,GSTP1,RPL41,RAP1B,ETV7,ADM,MME,CA2,ITGA2B,S ERPING1,PIK3CA,CEACAM6,ICAM1,GBP1,IL1RL1,CCBP2,CAT,RPL7,SELENBP1,TGM2,CD47,CST3,MMP8,RB1CC1,TLR7,SORT1,VDR,CCR1,TUBB1,ALOX15,SLC4A1,CLEC2D,TGFB1,GNA12,ENG,HIP1,SLC29A1,mir-27,CYP1B1,CLK4,GPI,NR4A2,DHCR24,CYP4F22,SENP6,MYH9,NCOR2,CTSE,MAFB,KCNMB1,HRH4,NCAM1,MT2A,SOC3,FOXO4,SLC31A1,HSPA1A/HSPA1B,CD4,TAL1,TRAT1,TLN1,TYMP,SKP1,HSPA5,GATA2,LIMK1,USP53,CES1,SLC7A5,KLF11,CEACAM1,E2F2,EIF2AK1,ASGR2,MT1G,SLC6A8,PSMA6,PSPH,IL5RA,C3,LCN2,IFNGR1,GSN,NUCB1,ZNF185,RPS15A,STAT2,PML,TMOD1,TNS1,LGALS12,PVRL2,S100P,SCD,EPB41L3,TAX1BP1,ACTA2,IFIT1B,CAPZA2,CASD1,FHL3,NRG1,ALDH2,HMOX1,RPS27,DIAPH1,SH2D1A,CLK1,PDCD1LG2,THBS1,FLNA,TIMP1,BMPR1A,CYB5R3,RABGGTB,GSTM4,RNH1,SMOX,S100A8,CHUK,EPAS1,ARHGEF12,IL3RA,HAT1,RELB,RPL9,CSF1R,GPR56,P2RY2,WARS,TAF1D,LGALS2,KLRC4-KLRK1/KLRK1,IGJ,FAM188A,FECH,CLU
Renal and Urological Disease	3.63E-07-6.59E-03	COPS2,HSPA1A/HSPA1B,MKI67,ODC1,ITGB3,HMGB1,E2F2,IL2RB,SLC6A8,PSMA6,IL5RA,C3,TUBB2A,IL12RB2,IFNGR1,IRF5,GSN,IRF1,CD9,ALAS2,MAP2K3,TNS1,TMOD1,GSTP1,MT1E,S100P,ADM,MME,CA2,PIK3CA,ITGA2B,ICAM1,TAX1BP1,RPL7,SELENBP1,TGM2,HMOX1,CLK1,TIMP1,THBS1,GP1BA,SMOX,CHUK,VDR,CCR1,OR13G1,TUBB1,SLC4A1,CSF1R,APOL1,WAS,MYH9,CTSE,CLU
Dermatological Diseases and Conditions	5.33E-07-1.2E-02	DPYSL2,SOC3,CCR3,CD4,HLA-DRB1,TYMP,MKI67,HLA-DQB1,IL31RA,ODC1,ITGB3,CXCL10,PRF1,LTF,SUB1,PLXNB2,CYSLTR2,NAPA,IL2RB,ATM,PSMA6,C3,GM2A,TUBB2A,LCN2,IFNGR1,KEL,NFKB2,GSN,DD1,IRF1,LCE2C (includes others),GSTP1,S100P,ADM,MME,SCD,ICAM1,GBP1,RSAD2,CCBP2,CAT,DAGLA,FOLR2,HMOX1,DIAPH1,CD47,THBS1,FLNA,TIMP1,MMP8,MT1L,CYB5R3,S100A8,VDR,TUBB1,ALOX15,OAS1,IL3RA,RELB,PLXND1,CYP1B1,APOL1,PI3,NR4A2,CTSE,LAP3
Cardiovascular Disease	8.09E-07-1.33E-02	SOC3,FURIN,HSPA1A/HSPA1B,CD4,ELANE,DOCK4,MKI67,CX3CR1,TBX21,LRPAP1,LIMK1,ITGB3,CXCL10,PRF1,HMGB1,mir-15,ATM,STAT5A,SLC6A8,PSMA6,C3,mir-29,LCN2,UTS2,TUBB2A,IFNGR1,GSN,PLOD1,MPO,CAPN1,CFLAR,S100P,RAP1B,ADM,SCD,CA2,SERPING1,PIK3CA,ITGA2B,ICAM1,IL1RL1,RSAD2,PLA2G10,ACTA2,TGM2,MCOLN1,HMOX1,BMPR1A,CST3,TIMP1,THBS1,FLNA,MMP8,TLR7,RB1CC1,S100A8,VDR,CCR1,ALOX15,TUBB1,SLC4A1,EPAS1,DRD5,ENG,PLXND1,CSF1R,APP,FLVCR2,LY96,LGALS2,NCOR2,KCNMB1,LRP1,CLU
Hematological System Development and Function	1.14E-06-1.73E-02	SOC3,CCR3,HSPA1A/HSPA1B,CD4,TAL1,ELANE,EXOC6,LRPAP1,GATA2,LIMK1,ITGB3,CXCL10,CES1,HMGB1,PPBP,SPTB,E2F2,IL2RB,ATM,ASGR2,EIF2AK1,FERMT3,SMAD2,STAT5A,CMKLR1,C3,LCN2,IFNGR1,MYOF,GSN,IRF1,MPO,CD9,CAPN1,ALAS2,C1GALT1,PML,NDST1,RAP1B,ADM,SERPING1,ITGA2B,ICAM1,IL1RL1,PLA2G10,CLIC1,TGM2,ALDH2,HMOX1,CD47,TIMP1,BMPR1A,THBS1,FLNA,MMP8,GP1BA,CYB5R3,VDR,CCR1,TUBB1,ALOX15,SLC4A1,EPAS1,HDC,DRD5,CSF1R,APP,GPI,WAS,HBZ,KLRC4-KLRK1/KLRK1,TBC1D8,FECH,MAFB,CLU
Immune Cell Trafficking	1.14E-06-1.57E-02	ADM,SOC3,SERPING1,ICAM1,IL1RL1,PLA2G10,ELANE,LIMK1,NRG1,CXCL10,TGM2,HMOX1,CES1,HMGB1,TIMP1,MMP8,PPBP,IL2RB,CCR1,STAT5A,CMKLR1,C3,IFNGR1,CSF1R,APP,MPO,C1GALT1,NDST1

Neurological Disease	1.41E-06-1.71E-02	FURIN,C9orf72,HLA-DRB1,HLA-DQB1,MKI67,LRPAP1,ITGB3,CXCL10,LTF,mir-15,NAPA,ATM,mir-29,TUBB2A,IL12RB2,NFKB2,IRF1,MPO,CAPN1,CFLAR,MT1E,GSTP1,MME,PRRC2A,CA2,SERPING1,ITGA2B,ICAM1,BAG6,RSAD2,CCBP2,HLA-DQA1,EIF4G1,SELENBP1,TGM2,LIPA,MCOLN1,CD47,HLA-DQB2,CST3,VDR,CCR1,ALOX15,TUBB1,OAS1,CLEC2D,TGFB1,HDC,DRD5,ENG,mir-27,APP,CLK4,LY96,GPI,NR4A2,DHCR24,TPP1,LRP1,ABCD2,FOXO4,HSPA1A/HSPA1B,CD4,CX3CR1,HSPA5,TBX21,LIMK1,RPS3A,FAM117A,SUB1,C3,GM2A,LCN2,IFNGR1,GSN,OSBPL8,KPNA5,HLA-DQA2,S100P,ABCD1,SCD,EPB41L3,ACTA2,IFIT1B,PRDX6,NRG1,HMOX1,ALDH2,PDCD1LG2,FLNA,TIMP1,BMPR1A,S100A8,MFN2,HLA-DMA,RELB,CSF1R,CLU
Tissue Morphology	2.12E-06-1.51E-02	SOCS3,FURIN,CD4,TAL1,TRAT1,CX3CR1,IL31RA,TBX21,GATA2,NID1,ITGB3,CXCL10,PRF1,RPS3A,SPTB,E2F2,IL2RB,ATM,EIF2AK1,STAT5A,SMAD2,C3,SNX13,LCN2,IFNGR1,NFKB2,MYOF,GSN,IRF1,CREB3L2,MPO,CD9,CAPN1,C1GALT1,PML,ADM,SERPING1,ITGA2B,ICAM1,IL1RL1,CLIC1,ACTA2,KREMEN1,ZMIZ1,NRG1,TGM2,ALDH2,HMOX1,CD47,DIAPH1,SH2D1A,TIMP1,BMPR1A,THBS1,FLNA,GP1BA,CHUK,VDR,MFN2,ALOX15,TUBB1,SLC4A1,CLEC2D,EPAS1,RELB,GNA12,HDC,ENG,HIP1,CSF1R,APP,PI3,NR4A2,HBZ,WAS,KLRC4-KLRK1/KLRK1,IGJ,MAFB,TCF7L2
Small Molecule Biochemistry	2.4E-06-1.73E-02	ABCD2,FOXO4,ACO2,GBP5,EXOC6,TBX21,HSPA5,LRPAP1,AGTPBP1,ODC1,ITGB3,ANK1,CXCL10,HMGB1,SPTB,SLC7A5,ATM,EIF2AK1,STAT5A,SLC6A8,C3,GM2A,LCN2,IFNGR1,GSN,OSBPL8,MPO,CD9,ALAS2,PML,SLC38A5,GSTP1,ABCD1,ADM,SCD,PIK3CA,ICAM1,SLC1A5,BAG6,PLA2G10,CRAT,PRDX6,TGM2,ALDH2,HMOX1,CD47,THBS1,TIMP1,VDR,SMPD3,MFN2,OAS1,SLC4A1,EPAS1,HDC,PID1,CYP1B1,APP,LY96,NR4A2,DHCR24,HBZ,GPBAR1,PIGK,FBP1,MYH9,FECH,MAN2B1,PNPLA6,TCF7L2,LRP1
Humoral Immune Response	2.79E-06-9.94E-03	IL1RL1,RSAD2,HLA-DQB1,SIGLEC10,IL31RA,TBX21,ITGB3,CXCL10,PRF1,SH2D1A,PDCD1LG2,THBS1,TLR7,E2F2,ATM,IL2RB,CCR1,IL5RA,RELB,IFNGR1,NFKB2,IRF1,WAS,IGJ,CTSE,HRH4,MT1E
Protein Synthesis	2.79E-06-1.27E-02	SOCS3,FURIN,HSPA1A/HSPA1B,ELANE,HLA-DQB1,SIGLEC10,IL31RA,HSPA5,TBX21,ITGB3,CXCL10,PRF1,RPS3A,E2F2,IL2RB,ATM,ASGR2,EIF2AK1,IL5RA,C3,IFNGR1,NFKB2,GSN,IRF1,UBE2H,RPL39,CAPN1,RPS15A,PML,MT1E,RPL41,MME,ADM,PIK3CA,IL1RL1,BAG6,RSAD2,EIF4G1,NRG1,TGM2,DIAPH1,PDCD1LG2,SH2D1A,FLNA,CST3,THBS1,MMP8,TLR7,VDR,CCR1,ALOX15,SLC4A1,RELB,RPL17,APP,WARS,LCN1,WAS,HBZ,IGJ,SENP6,IGF2BP2,MYH9,TPP1,CTSE,HRH4,CLU
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	2.86E-06-1.73E-02	CCR3,CD4,ELANE,DOCK4,TLN1,LRPAP1,AGTPBP1,GATA2,ITGB3,PKN2,CXCL10,PRF1,HMGB1,LTF,PPBP,SLC7A5,NAPA,CEACAM1,FERMT3,EIF2AK1,ASGR2,SLC6A8,C3,GSN,MPO,CD9,NDST1,RAP1B,SERPING1,ITGA2B,CEACAM6,ICAM1,IL1RL1,ACTA2,CCBP2,TGM2,NRG1,CD47,FLNA,TIMP1,THBS1,GP1BA,S100A8,Sort1,CCR1,HLA-DMA,ALOX15,AP2M1,SLC4A1,EPAS1,TGFB1,GNA12,HDC,ENG,CSF1R,PLXND1,APP,LY96,NR4A2,WAS,ASAP2,MYH9,HRH4,CLU,LRP1,NCAM1
Hematological Disease	2.87E-06-1.73E-02	SOCS3,CCR3,HSPA1A/HSPA1B,CD4,TAL1,ELANE,MKI67,IL31RA,HSPA5,GATA2,LIMK1,ANK1,ITGB3,CXCL10,PRF1,HMGB1,mir-15,SPTB,E2F2,ATM,IL2RB,EIF2AK1,HK1,STAT5A,C3,BCOR,mir-29,MMADHC,TUBB2A,LCN2,IL12RB2,IFNGR1,NFKB2,GSN,IRF1,MPO,AHI1,CAPN1,RPS15A,ALAS2,CFLAR,PML,C1GALT1,TNS1,RPL41,GSTP1,PIK3CA,ITGA2B,ICAM1,TAX1BP1,IL1RL1,CRAT,PRDX6,RPL7,SELENBP1,HMOX1,ALDH2,CD47,DIAPH1,CLK1,PDCD1LG2,THBS1,FLNA,GP1BA,TLR7,CHUK,VDR,TUBB1,ALOX15,SLC4A1,EPAS1,ARHGEF12,TGFB1,IL3RA,HAT1,HIP1,CSF1R,CYP1B1,APP,GPI,CYP4F22,WAS,HBZ,RPS26,FECH,MYH9,NCAM1
Cellular Function and Maintenance	2.5E-05-1.73E-02	DPYSL2,CD4,ELANE,DOCK4,GATA2,LRPAP1,ITGB3,CXCL10,HMGB1,LTF,NAPA,ATM,EIF2AK1,C3,GSN,MPO,CD9,CAPN1,ITGA2B,CEACAM6,ICAM1,NFIX,IL1RL1,TGM2,CD47,THBS1,FLNA,GP1BA,CHUK,VDR,MFN2,TUBB1,AP2M1,SLC4A1,CLEC2D,RELB,GNA12,HIP1,PLXND1,CSF1R,APP,NR4A2,WAS,HBZ,KLRC4-KLRK1/KLRK1,ASAP2,MYH9,LRP1,ZFYVE16
Endocrine System Disorders	3.13E-05-7.53E-03	FOXO4,PRRC2A,CA2,ITGA2B,ICAM1,HSPA1A/HSPA1B,GLRA3,CD4,BAG6,ACTA2,IFIT1B,HLA-DQA1,HLA-DQB1,ITGB3,TGM2,HMOX1,ALDH2,PRF1,HLA-DQB2,PDCD1LG2,MUC21,mir-15,S100A8,VDR,CHUK,E2F2,KLF11,IL2RB,ALOX15,HLA-DMA,OAS1,JAZF1,CLEC2D,C3,mir-29,TUBB2A,DRD5,IFNGR1,IRF1,NR4A2,AHI1,SUMO4,IGF2BP2,LY6G6C,HLA-DQA2,TCF7L2,CLU

Gastrointestinal Disease	3.13E-05-1.29E-02	DPYSL2,COPS2,MKI67,HLA-DQB1,ODC1,ITGB3,CXCL10,PRF1,HMGB1,mir-15,PPBP,CYSLTR2,IL2RB,SMAD2,STAT5A,mir-29,TUBB2A,IRF5,IRF1,MPO,CD9,AHI1,GSTP1,MT1E,MME,ETV7,CA2,PRRC2A,PIK3CA,ITGA2B,ICAM1,CEACAM6,GBP1,GLRA3,BAG6,HLA-DQA1,SELENBP1,TGM2,HLA-DQB2,CST3,VDR,TUBB1,ALOX15,OAS1,CLEC2D,DRD5,CYP1B1,mir-27,APP,PI3,CLK4,GPI,NR4A2,WAS,SENP6,SUMO4,IGF2BP2,MAFB,TCF7L2,NCAM1,MT2A,SOC3S3,HSPA1A/HSPA1B,CD4,TYMP,HSPA5,TBX21,USP53,CES1,MUC21,SLC7A5,CEACAM1,KLF11,E2F2,EIF2AK1,PSPH,C3,LCN2,IFNGR1,GSN,NUCB1,LY6G6C,PML,HLA-DQA2,S100P,SCD,EPB41L3,ACTA2,CASD1,NRG1,HMOX1,ALDH2,DIAPH1,PDCD1LG2,THBS1,TIMP1,S100A8,CHUK,HLA-DMA,EPAS1,IAZF1,IL3RA,RELB,RPL9,CSF1R,WARS,LGALS2,FECH,RALGAP1,CLU
Cell Death and Survival	3.24E-05-1.73E-02	FURIN,ELANE,MKI67,LRPAP1,ODC1,ITGB3,CXCL10,PKN2,PRF1,LTF,HMGB1,mir-15,PPBP,CYSLTR2,SSBP3,BMP8B,ATM,IL2RB,SMAD2,STAT5A,mir-29,PRKRIR,NFKB2,IRF5,IRF1,DAXX,MPO,CD9,CAPN1,TMX1,MAP2K3,CFLAR,NDST1,MT1E,GSTP1,RAP1B,MME,ADM,PIK3CA,CEACAM6,EMILIN2,IL1RL1,BAG6,PLA2G10,EIF4G1,SELENBP1,TGM2,CD47,CST3,RB1CC1,SORT1,VDR,CCR1,ALOX15,OAS1,SLC4A1,TGFB1,GNA12,ENG,HIP1,SLC29A1,CYP1B1,APP,PI3,GPI,NR4A2,DHCR24,HBZ,TPP1,NCOR2,CTSE,LRP1,TCF7L2,NCAM1,MT2A,ABCD2,FOXO4,SOC3S3,SLC31A1,HSPA1A/HSPA1B,CD4,TAL1,ZNF429,TYMP,CX3CR1,TBX21,HSPA5,GATA2,RPS3A,CES1,SUB1,KLF11,E2F2,CEACAM1,ASGR2,HK1,EIF2AK1,SLC6A8,C3,LCN2,IFNGR1,GSN,CREB3L2,STAT2,PML,LGALS12,S100P,PVRL2,SCD,TAX1BP1,TRMT11,PRDX6,NRG1,HMOX1,ALDH2,DIAPH1,SH2D1A,PDCD1LG2,TIMP1,THBS1,FLNA,BMPR1A,CYB5R3,S100A8,SMOX,CHUK,GMFB,MFN2,HLA-DMA,RELB,RFWD2,CSF1R,APOL1,GPR56,NOC2L,KLRK4-KLRK1/KLRK1,PNPLA6,CLU,ZFYVE16
Organismal Survival	3.32E-05-8.6E-04	FURIN,ELANE,MKI67,LRPAP1,ITGB3,CXCL10,PRF1,HMGB1,PLXNB2,CYSLTR2,ATM,IL2RB,SMAD2,STAT5A,PIGF,SNX13,IL12RB2,NFKB2,IRF5,PLOD1,IRF1,DAXX,MPO,AHI1,CAPN1,ALAS2,MAP2K3,CFLAR,NDST1,GSTP1,MT1E,RAP1B,MME,ADM,ITGA2B,PIK3CA,SERPING1,ICAM1,IL1RL1,RSAD2,BAG6,TGM2,MCOLN1,LIPA,CD47,CST3,MMP8,TLR7,RB1CC1,VDR,CCR1,ALOX15,SLC4A1,TGFB1,GNA12,ENG,HIP1,APP,LY96,NR4A2,HBZ,TPP1,MAFB,NCOR2,HRH4,LRP1,TCF7L2,NCAM1,SOC3S3,SLC31A1,HSPA1A/HSPA1B,CD4,TAL1,TLN1,CX3CR1,TBX21,HSPA5,GATA2,LIMK1,SNRPN,GCA,E2F2,ASGR2,H1F0,FERMT3,EIF2AK1,C3,LCN2,IFNGR1,GSN,DDI1,CREB3L2,STXB5,C1GALT1,PML,TMOD1,NFIX,TAX1BP1,EPB41L3,PRDX6,ZMIZ1,NRG1,HMOX1,BMPR1A,FLNA,THBS1,TIMP1,S100A8,CHUK,MFN2,HLA-DMA,AP2M1,EPAS1,RELB,PLXND1,CSF1R,LGALS2,KLRK4-KLRK1/KLRK1,ATP1B2,FECH,PNPLA6,CARM1
Tissue Development	3.76E-05-1.73E-02	CCR3,SOC3S3,FURIN,CD4,TAL1,DOCK4,TLN1,HSPA5,LRPAP1,ODC1,ITGB3,PKN2,CXCL10,LTF,HMGB1,PPBP,CEACAM1,FERMT3,STAT5A,C3,PIGF,NFKB2,MYOF,GSN,CD9,CAPN1,MAP2K3,TMOD1,PVRL2,MME,ADM,RAP1B,CA2,SERPING1,PIK3CA,ITGA2B,ICAM1,GBP1,IL1RL1,CLIC1,ACTA2,NRG1,TGM2,HMOX1,CD47,FLNA,TIMP1,THBS1,BMPR1A,GP1BA,S100A8,VDR,CHUK,CCR1,AP2M1,SLC4A1,EPAS1,CLEC2D,TGFB1,GNA12,HDC,ENG,PLXND1,CSF1R,APP,LILRB4,WAS,MYH9,CLU,LRP1,NCA M1
Cardiovascular System Development and Function	6.84E-05-1.73E-02	CCR3,FOXO4,FURIN,HSPA1A/HSPA1B,TAL1,TYMP,HLA-DQB1,CX3CR1,HSPA5,LRPAP1,GATA2,NID1,ODC1,ITGB3,ANK1,CXCL10,LTF,HMGB1,PPBP,SLC7A5,E2F2,CEACAM1,FERMT3,STAT5A,C3,SNX13,PIGF,UTS2,IFNGR1,IL12RB2,KEL,GSN,MYOF,IRF1,CD9,MAP2K3,PML,C1GALT1,NDST1,TMOD1,S100P,RAP1B,MME,ADM,SERPING1,PIK3CA,ICAM1,GBP1,CCBP2,ACTA2,PRDX6,ZMIZ1,NRG1,ALDH2,HMOX1,CD47,CST3,BMPR1A,TIMP1,FLNA,THBS1,GP1BA,RNH1,S100A8,VDR,CCR1,ALOX15,SLC4A1,EPAS1,ARHGEF12,TGFB1,RELB,DRD5,ENG,PLXND1,CSF1R,mir-27,CYP1B1,APP,GPR56,WARS,MYH9,KCNMB1,PNPLA6,TCF7L2
Organismal Development	6.84E-05-1.73E-02	SOC3S3,CCR3,FOXO4,FURIN,TAL1,TYMP,CX3CR1,HLA-DQB1,LRPAP1,GATA2,NID1,ODC1,ITGB3,CXCL10,HMGB1,CEACAM1,FERMT3,STAT5A,C3,SNX13,PIGF,UTS2,NFKB2,GSN,MYOF,PLOD1,CD9,MAP2K3,PML,C1GALT1,TMOD1,NDST1,ADM,RAP1B,CA2,PIK3CA,ICAM1,GBP1,IL1RL1,ACTA2,ZMIZ1,NRG1,ALDH2,HMOX1,CD47,BMPR1A,THBS1,FLNA,CST3,RNH1,S100A8,CHUK,CLEC2D,TGFB1,RELB,ENG,CSF1R,PLXND1,mir-27,APP,LILRB4,PI3,WARS,WAS,PNPLA6,TCF7L2
Connective Tissue Development and Function	8.07E-05-1.51E-02	SOC3S3,CA2,ICAM1,IL1RL1,TAL1,TLN1,KREMEN1,LRPAP1,ITGB3,LIMK1,CD47,LTF,HMGB1,FLNA,BMPR1A,THBS1,PPBP,S100A8,VDR,CHUK,CLEC2D,C3,TGFB1,RELB,GNA12,HDC,UTS2,IFNGR1,ENG,NFKB2,GSN,CSF1R,CREB3L2,LILRB4,DHCR24,CD9,WAS,CAPN1,MYH9,NDST1,TNS1,LRP1

Psychological Disorders	9.49E-05-1.7E-02	ABCD2,C9orf72,HSPA1A/HSPA1B,HLA-DRB1,HLA-DQB1,HSPA5,LRPAP1,LIMK1,CXCL10,RPS3A,LTF,FAM117A,mir-15,SUB1,NAPA,C3,mir-29,GM2A,LCN2,TUBB2A,OSBPL8,KPNA5,MPO,CAPN1,CFLAR,GSTP1,MME,ABCD1,SCD,CA2,ICAM1,EIF4G1,PRDX6,SELENBP1,TGM2,NRG1,LIPA,HMOX1,ALDH2,CST3,TIMP1,VDR,MFN2,ALOX15,TUBB1,RELB,DRD5,CSF1R,mir-27,APP,GPI,NR4A2,DHCR24,CLU,LRP1
Respiratory Disease	1.73E-04-1.27E-02	CCR3,FOXO4,SOCS3,COPS2,FURIN,CD4,ELANE,HLA-DRB1,TBX21,ITGB3,CXCL10,PRF1,HMGB1,LTF,mir-15,SLC7A5,CYSLTR2,CEACAM1,EIF2AK1,C3,mir-29,TUBB2A,LCN2,IFNGR1,IL12RB2,GSN,IRF1,MPO,MAP2K3,mir-186,GSTP1,S100P,CA2,PIK3CA,ICAM1,IL1RL1,RPL7,PRDX6,SELENBP1,NRG1,LIPA,HMOX1,CST3,FLNA,THBS1,TIMP1,MMP8,GSTM4,RABGGTB,VDR,ALOX15,TUBB1,EPAS1,TGFB1,ENG,RPL9,SLC29A1,CSF1R,mir-27,CYP1B1,P2RY2,GPI,CLK4,LCN1,IGJ,FAM188A,MS4A2,MAFB,CLU,NCAM1
Ophthalmic Disease	1.75E-04-7.53E-03	SERPING1,FURIN,C3,GBP1,TGFB1,CX3CR1,MKI67,GSN,IRF1,CXCL10,MPO,HMGB1,CST3,TIMP1,PPBP,CLU,C2
Cellular Compromise	1.96E-04-1.73E-02	ADM,DPYSL2,SOCS3,ITGA2B,PLA2G10,ACTA2,ELANE,TLN1,FHL3,PRDX6,ITGB3,LIMK1,HMOX1,CD47,LTF,THBS1,FLNA,PGAM1,E2F2,BMP8B,MFN2,ATM,AP2M1,TGFB1,GNA12,MYOF,GSN,PLXND1,PLOD1,APP,PI3,GPI,MPO,CD9,MYH9,CLU,LRP1
Organismal Injury and Abnormalities	1.98E-04-1.71E-02	ABCD2,SOCS3,FURIN,CD4,ELANE,CX3CR1,TBX21,LRPAP1,ANK1,ITGB3,CXCL10,PRF1,mir-15,CYSLTR2,ATM,STAT5A,SMAD2,C3,mir-29,TUBB2A,IFNGR1,GSN,MPO,MAP2K3,mir-186,MT1E,GSTP1,ABCD1,MME,ADM,SERPING1,ICAM1,IL1RL1,PRDX6,TGM2,HMOX1,THBS1,CST3,TIMP1,BMPR1A,MMP8,VDR,CCR1,TUBB1,ALOX15,SLC4A1,EPAS1,RELB,CSF1R,mir-27,APP,NR4A2,HBZ,IGJ,CTSE,LRP1,CLU
Cellular Development	2.02E-04-1.65E-02	DPYSL2,SOCS3,CCR3,FOXO4,COPS2,HSPA1A/HSPA1B,TAL1,ELANE,TLN1,EXOC6,LRPAP1,GATA2,ODC1,ITGB3,LIMK1,CXCL10,PKN2,HMGB1,LTF,mir-15,SPTB,PLXNB2,NAPA,E2F2,CEACAM1,ATM,EIF2AK1,SMAD2,STAT5A,CMKLR1,IL5RA,C3,LCN2,UTS2,IFNGR1,NFKB2,GSN,MYOF,IRF1,CREB3L2,CD9,ALAS2,MAP2K3,PML,LGALS12,NDST1,MME,ADM,CA2,PIK3CA,GBP1,IL1RL1,CLIC1,BAG6,GPC2,NRG1,TGM2,HMOX1,CD47,BMPR1A,THBS1,TIMP1,GP1BA,SORT1,S100A8,CHUK,VDR,MFN2,ALOX15,EPAS1,CLEC2D,GNA12,ENG,CSF1R,mir-27,CYP1B1,APP,LILRB4,P2RY2,NR4A2,HBZ,WAS,FECH,MAFB,NCOR2,CTSE,PNPLA6,CLU,LRP1,NCAM1
Hematopoiesis	2.02E-04-1.73E-02	RAP1B,SOCS3,ITGA2B,HSPA1A/HSPA1B,IL1RL1,TAL1,EXOC6,GATA2,ITGB3,TGM2,HMOX1,ALDH2,CD47,THBS1,FLNA,TIMP1,SPTB,E2F2,IL2RB,EIF2AK1,STAT5A,SMAD2,ALOX15,SLC4A1,EPAS1,LCN2,IRF1,CD9,HBZ,FECH,ALAS2,MAFB,PML
Lipid Metabolism	2.43E-04-1.73E-02	ADM,ABCD2,ABCD1,FOXO4,SCD,PIK3CA,ICAM1,PLA2G10,BAG6,CRAT,GBP5,TBX21,LRPAP1,ODC1,PRDX6,ITGB3,TGM2,HMOX1,CD47,HMGB1,TIMP1,VDR,SMPD3,ATM,STAT5A,EPAS1,C3,GM2A,LCN2,IFNGR1,GSN,CYP1B1,OSBPL8,APP,LY96,MPO,CD9,DHCR24,GPBAR1,PIGK,MYH9,PNPLA6,LRP1,TCF7L2,GSTP1
Molecular Transport	2.61E-04-1.73E-02	ABCD2,FOXO4,CCR3,SLC31A1,GBP5,TBX21,HSPA5,LRPAP1,ODC1,ITGB3,CXCL10,LTF,PPBP,SLC7A5,CYSLTR2,ATM,EIF2AK1,STAT5A,AQP7,C3,GM2A,LCN2,IFNGR1,GSN,MPO,AHI1,ALAS2,MAP2K3,SLC38A5,MT1E,ABCD1,ADM,SCD,PIK3CA,ICAM1,SLC1A5,CCBP2,CRAT,PRDX6,TGM2,NRG1,HMOX1,TIMP1,SORT1,VDR,CHUK,CCR1,SLC4A1,EPAS1,AP3D1,HDC,PID1,HIP1,APP,P2RY2,DHCR24,WAS,GPBAR1,MYH9,HRH4,TCF7L2,LRP1,NCAM1
Cellular Growth and Proliferation	3.38E-04-1.4E-02	COPS2,FURIN,ELANE,DOCK4,MKI67,HLA-DQB1,LRPAP1,ODC1,ITGB3,CXCL10,PRF1,LTF,HMGB1,mir-15,PPBP,PLXNB2,SSBP3,IL2RB,ATM,SMAD2,STAT5A,CMKLR1,PIGF,mir-29,UTS2,IL12RB2,PRKRIR,NFKB2,IRF1,DAXX,CD9,CAPN1,MAP2K3,GSTP1,MT1E,RAP1B,ADM,PIK3CA,CEACAM6,ICAM1,EMILIN2,GBP1,IL1RL1,FOLR2,EIF4G1,SELENBP1,TGM2,LIPA,CD47,CST3,RB1CC1,VDR,CCR1,ALOX15,SLC4A1,CLEC2D,TGFB1,GNA12,ENG,CYP1B1,mir-27,APP,TNS3,GPI,NR4A2,DHCR24,TBC1D8,MS4A2,MYH9,FBP1,NCOR2,TCF7L2,LRP1,NCAM1,MT2A,CCR3,FOXO4,SOCS3,HSPA1A/HSPA1B,CD4,TAL1,HSPA5,SKP1,IL31RA,SART1,GATA2,RPS3A,CEACAM1,KLF11,E2F2,HK1,EIF2AK1,TSFY1 (includes others),IL5RA,C3,LCN2,IFNGR1,MYOF,GSN,DDB1,STAT2,SLC7A7,RPS15A,PML,LGALS12,S100P,NFIX,EPB41L3,CLIC1,ZMIZ1,NRG1,HMOX1,CLK1,PDCD1LG2,THBS1,TIMP1,BMPR1A,FLNA,RNH1,S100A8,CHUK,MFN2,EPAS1,IL3RA,RELB,CSF1R,GPR56,WARS,TAF1D,CARM1,CLU
Skeletal and Muscular System Development and Function	3.38E-04-1.4E-02	ADM,CA2,SOCS3,ICAM1,IL1RL1,TAL1,ELANE,FHL3,ODC1,ITGB3,TGM2,HMOX1,CD47,HMGB1,FLNA,BMPR1A,THBS1,mir-15,TIMP1,S100A8,VDR,CHUK,MFN2,CCR1,ALOX15,C3,CLEC2D,UTS2,IFNGR1,NFKB2,GSN,CSF1R,CYP1B1,mir-27,IRF1,LILRB4,NR4A2,DHCR24,CD9,WAS,LRP1,CLU

Embryonic Development	3.46E-04-1.73E-02	CCR3,SOCS3,CA2,FURIN,NFIX,ICAM1,IL1RL1,TAL1,DOCK4,LRPAP1,ODC1,ITGB3,CXCL10,NRG1,C D47,HMGB1,TIMP1,BMPR1A,THBS1,S100A8,PLXNB2,CHUK,CEACAM1,CCR1,EPAS1,C3,ARHGEF12 ,CLEC2D,ENG,NFKB2,GSN,CSF1R,APP,LILRB4,CD9,WAS,TMOD1,LRP1
Organ Development	3.46E-04-3.46E-04	SOCS3,CA2,CLEC2D,C3,IL1RL1,TAL1,NFKB2,GSN,CSF1R,LILRB4,CD47,CD9,WAS,BMPR1A,S100A8 ,CHUK
Lymphoid Tissue Structure and Development	4.29E-04-4.29E-04	ALOX15,RELB,LCN2,TAL1,TRAT1,IFNGR1,IL31RA,PRF1,DIAPH1,CD47,CD9,THBS1,TIMP1,FLNA
Cellular Assembly and Organization	6.26E-04-1.73E-02	DPYSL2,CD4,DOCK4,HSPA5,LRPAP1,ITGB3,LIMK1,PKN2,PRF1,LTF,HMGB1,NAPA,ATM,GSN,CD9,C APN1,ABCD1,MME,ITGA2B,ICAM1,NFIX,FHL3,MCOLN1,DIAPH1,CD47,THBS1,FLNA,CYB5R3,RB1CC 1,SORT1,CHUK,MFN2,ARHGEF12,CLEC2D,TGFB1,GNA12,RELB,HIP1,PLXND1,CSF1R,APP,GPI,TNS 3,KIAA1033,WAS,KLRC4-KLRK1/KLRK1,MYH9,TPP1,MAN2B1,CLU,LRP1,ZFYVE16
Tumor Morphology	7.1E-04-1.48E-02	MME,SOCS3,FOXO4,HSPA1A/HSPA1B,ELANE,ODC1,HMOX1,PRF1,CD47,SH2D1A,RPS3A,HMGB1, mir-15,TIMP1,THBS1,CEACAM1,E2F2,ATM,TGFB1,mir-29,IRF5,IRF1,APP,DAXX,NR4A2,KLRC4- KLRK1/KLRK1,NCOR2,CFLAR,PML,CLU
Renal and Urological System Development and Function	7.33E-04-7.47E-03	CCR1,CCR3,ITGA2B,ARHGEF12,ICAM1,C3,DOCK4,NFKB2,PLXND1,ITGB3,APP,TIMP1,LRP1
Carbohydrate Metabolism	8.78E-04-1.73E-02	AQP7,AP2M1,PIK3CA,EPAS1,C3,PLA2G10,CD4,BAG6,PID1,HIP1,GSN,RPIA,APP,CXCL10,NRG1,LY9 6,CD47,HMGB1,THBS1,AH11,PPBP,MYH9,SORT1,MAP2K3,CHUK,PNPLA6
Cell Morphology	1.2E-03-1.67E-02	DPYSL2,ABCD2,ABCD1,NFIX,FHL3,LRPAP1,LIMK1,NRG1,LTF,HMGB1,FLNA,THBS1,SORT1,VDR,AT M,FERMT3,TUBB1,APP,GPI,NR4A2,CD9,CAPN1,TPP1,MAN2B1,NDST1,MT1E,LRP1,NCAM1
Dental Disease	1.27E-03-1.27E-03	HDC,ITGB3
Nervous System Development and Function	1.27E-03-1.67E-02	ABCD1,ABCD2,NFIX,GM2A,HDC,IFNGR1,GATA2,LRPAP1,APP,NRG1,CD47,NR4A2,CD9,LTF,HMGB1 ,FLNA,PLXNB2,MAN2B1,MAFB,NDST1,LRP1,MT1E,NCAM1
Behavior	1.55E-03-1.55E-03	CD47,NR4A2,GM2A,HDC,MAN2B1,APP
Hair and Skin Development and Function	1.57E-03-7.53E-03	CCR1,CCR3,ARHGEF12,ICAM1,C3,DOCK4,NFKB2,ITGB3,APP,CXCL10,TIMP1,CLU,LRP1
Reproductive System Disease	2.01E-03-9.09E-03	MME,FOXO4,SOCS3,SERPING1,PIK3CA,COPS2,EPB41L3,IFIT1B,ACTA2,MKI67,ODC1,TGM2,HMOX 1,ALDH2,LTF,mir- 15,FLNA,TIMP1,BMPR1A,S100A8,VDR,EIF2AK1,STAT5A,TUBB1,C3,GNA12,RELB,TUBB2A,ENG,IRF 1,CYP1B1,P2RY2,GPR56,IGJ,LGALS12,CLU,GSTP1
Free Radical Scavenging	2.24E-03-4.28E-03	SOCS3,ICAM1,ELANE,PRDX6,ITGB3,TGM2,HMOX1,ALDH2,AHSP,PRF1,LTF,HMGB1,mir- 15,TLR7,S100A8,SMOX,VDR,HK1,EPAS1,CYP1B1,APP,MPO,DHCR24,FBP1,MAP2K3
Amino Acid Metabolism	2.61E-03-2.61E-03	SLC4A1,SLC1A5,SLC7A5,SLC38A5
Organismal Functions	3.08E-03-1.56E-02	ABCD1,ABCD2,ASGR2,ITGA2B,C3,CLIC1,LCN2,ITGB3,LIMK1,APP,NR4A2,THBS1,WAS,CAPN1,PPB P,GP1BA,IL2RB
DNA Replication, Recombination, and Repair	3.26E-03-1.73E-02	EIF2AK1,ABCD1,IFNGR1,HSPA5,DDB1,APP,TGM2,ALDH2,NR4A2,MPO,HMGB1,mir- 15,TLR7,SMOX,VDR,GSTP1,CLU,E2F2,ATM
Hypersensitivity Response	3.28E-03-3.28E-03	CCR1,IL1RL1,MMP8,PLA2G10,IL2RB
Post-Translational Modification	3.71E-03-1.27E-02	ADM,MME,ITGA2B,FURIN,HSPA1A/HSPA1B,CD4,BAG6,ELANE,HSPA5,LRPAP1,ITGB3,LIMK1,TGM2 ,NRG1,DIAPH1,FKBP9,CD47,CST3,THBS1,MMP8,ALOX15,HIP1,GSN,CSF1R,APP,MPO,LCN1,CD9,W AS,CAPN1,SENP6,PIGK,MYH9,TPP1
Cell Signaling	4.14E-03-4.14E-03	ADM,NRG1,CD47,ITGA2B,CD9,THBS1,CD4,HIP1,CSF1R,ITGB3,APP
Gene Expression	4.29E-03-9.83E-03	EIF2AK1,HSPA1A/HSPA1B,RELB,RPL17,NFKB2,EIF4G1,IRF1,APP,WARS,RPS3A,LTF,HMGB1,RPL3 9,SUB1,IGF2BP2,MAP2K3,CHUK,PML,CYSLTR2,RPL41,ATM
Nutritional Disease	6.03E-03-6.03E-03	STAT5A,AQP7,SOCS3,SLC4A1,NFIX,HSPA1A/HSPA1B,HIP1,NFKB2,TGM2,HMGB1,BMPR1A,TIMP1, VDR,MT1E,IL2RB
Antigen Presentation	7.24E-03-1.54E-02	HLA-DMA,PDCD1LG2,HMGB1,WAS,GM2A,AP3D1,CTSE
Energy Production	7.24E-03-1.18E-02	TGM2,EIF2AK1,ABCD2,ABCD1,HMGB1,HSPA5

Nucleic Acid Metabolism	7.24E-03-1.73E-02	ABCD1,EIF2AK1,ADM,OAS1,PID1,CRAT,HSPA5,RPIA,APP,TGM2,ALDH2,HMOX1,HMGB1,FBP1,MAN2B1,PML,MFN2
Cell Cycle	1.22E-02-1.22E-02	FLNA,GATA2,APP
Respiratory System Development and Function	1.22E-02-1.22E-02	CCR3,ICAM1,TBX21
Protein Degradation	1.27E-02-1.27E-02	MME,ALOX15,FURIN,BAG6,ELANE,GSN,TGM2,DIAPH1,LCN1,CST3,MMP8,SENP6,CAPN1,MYH9,TPP1

Anexo 1
Networks

ID	Molecules in Network	Score	Focus Molecules	Top Functions
1	ABCD2,C-C chemokine receptor,CCBP2,CCR1,CCR3,CD4,chemokine,chemokine receptor,CMKLR1,CX3CR1,CYSLTR2,DRD5,EMR1,Gpcr,GPR56,GP R160,hemoglobin,HLA-DMA,HLA-DQ,HLA-DQA1,HLA-DQA2,HLA-DQB1,HLA-DQB2,HLA-DRB1,HLA-DRB5,HRH4,IgG,LPAR6,MHC,Mhc class ii,MHC Class II (complex),MHC II-β,Mhc2 Alpha,P2RY2,TCF7L2	29	23	Inflammatory Response, Immunological Disease, Cell Signaling
2	ADM,Alpha Actinin,ARHGEF12,CAPN1,CSF1R,DPYSL2,EPAS1,Erm,FERMT3,Focal adhesion kinase,GATA2,GP1BA,GSN,IFNGR1,IL12RB2,IL2RB,JAK,MME,p85 (pik3r),Pdgf (complex),PI3K (complex),PIK3CA,PLC gamma,PLXNB2,PLXND1,Rac,RB1CC1,RFWD2,SOCS3,STAT5A,STAT5a/b,Talin,TBX21,Trk Receptor,WARS	29	23	Cellular Movement, Immune Cell Trafficking, Tissue Morphology
3	ALAS2,ANK1,C2,C3,CA2,Calmodulin,CD47,Collagen type IV,Collagen(s),Complement component 1,ELANE,EPB41L3,FBP1,Fibrinogen,GPIIB-IIIa,Immunoglobulin,ITGA2B,ITGB3,Laminin,LRP1,LRP,LRPAP1,LT F,Mac1,MPO,NCAM1,NID1,PI3,SERPING1,SLC4A1,Spectrin,SPTB,TGM2,THBS1,VPS29	28	24	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Tissue Development, Hematological System Development and Function
4	ABCD1,Adaptor protein 2,AP2M1,AP3D1,APOL1,APP,ASAP2,ATPase,BAG6,Claathrin,CLU,Collagen type I,CREB3L2,CST3,DAXX,FURIN,glutathione transferase,GM2A,GSTM4,HAT1,HDL,Histone h3,Histone h4,HMGB1,Hsp70,HSP,HSPA5,HSPA1A/HSPA1B,LDL,LY96,MMP8,MT1E,ORC4,SORT1,TGFBI	28	24	Developmental Disorder, Hereditary Disorder, Metabolic Disease
5	ACTA2,Actin,Alpha tubulin,ASGR2,Beta Tubulin,CEACAM1,CEACAM6,CEACAM8,CEACAM,EIF2AK1,F Actin,FHL3,Filamin,FLNA,G-Actin,HIP1,Hsp27,Hsp90,ICAM1,Integrin,Integrinβ,LIMK1,MYH9,MYL4,Myosin,NRG1,S100A8,S100P,TLN1,TNS1,TUBB1,TUBB2A,Tubulin,TYMP,WAS	27	22	Cancer, Hematological Disease, Cellular Assembly and Organization
6	Ap1,CARM1,CFLAR,CHUK,COPS2,Creb,Ctbp,CXCL10,estrogen receptor,GBP1,GSTP1,Hdac,HMOX1,IFN Beta,IRF1,IRF5,LCN2,Ncor,NCOR2,NFKB2,NFkB (complex),NR4A2,OAS1,PML,Pro-inflammatory Cytokine,RELB,RNA polymerase II,RSAD2,Rxr,SMAD2,Smad2/3,STAT2,SWI-SNF,thyroid hormone receptor,VDR	25	21	Infectious Disease, Cellular Development, Hematological System Development and Function
7	ACTA2,ARRB2,BMPR1A,BMPR1B,CALD1,CLIC1,GSN,HGS,HIST1 H2BA,HNRNPA2B1,KCNMB1,MS4A3,MYH9,MYL2,MYL4,MYOCD,OSBPL5,PPIA,RNH1,RNU4-2,RPS3A,S100A9,SART1,SF3B2,SF3B4,SMOOTH MUSCLE ACTIN,SNRNP48,snRNP,SNRPD3,SNRPN,SNX13,SRF,TOM1,TUBB2A,ZFYVE16	22	19	Hematological System Development and Function, Organismal Functions, Cell Cycle
8	ACACA,ACO2,ADAM12,CARM1,COL4A2,CPSF1,CSF3,EMB,ETV7,FOLR2,FOS,GAS5,IL1RL1,LCN1,LCN2,MMP9,MMP10,MMP11,Mmp,MT2A,MXD1,NR2C1,NRIP1,ODC1,ornithine decarboxylase,PENK,RARA,SCD,SELENBP1,SERPINE2,SUOX,TIMP1,TIMP3,Timp,TPP1	18	17	Post-Translational Modification, Protein Degradation, Protein Synthesis
9	ALOX15,CD247,CHI3L1,DUB,ESR1,Gbp2,IFI27,IFNGR1,IL2RB,IL9R,KPNA5,KPNA6,LILRB4,MAFA,MAFB,NFIX,OAS1,PAX6,PDX1,PTP N6,RGS18,Scg5,SIGLEC10,SSBP3,STAT1,STAT3,STAT1/3/5/6,TMX1,TRAT1,UCHL5,USP2,USP11,USP15,USP53,WARS	16	16	Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Endocrine System Disorders

10	ANKRD49,ATF4,CAPZA2,CCL20,CCNC,CKS1B,CXCL2,CYP1B1,E RAP1,GTF2H2,GTF2H2C,Holo RNA polymerase II,IFIT1,IFIT1B,IFNL1,IkB-NfκB2- RelA,IRF7,KIAA1033,KLF5,LCN2,NFKBIA,PSPH,RELA,Saa3,Scf Trcp beta,SKP1,SLC3A2,SLC7A5,STAG2,SUMO4,TAF4B,TLR7,TLR8,UB E2H,ZNF638	16	16	Cancer, Dermatological Diseases and Conditions, Antimicrobial Response
11	ANXA7,BATF2,CD9,CD47,DRD5,EDN1,EDN2,EDN3,EXOC6,G protein alpha,G-protein beta,GBP1,GCA,GMPR,GNA11,GNA12,GPR56,GTP,IL8,KEL,MLLT 4,MRAS,Nectin,Nectin2/3,NKX2-3,platelet activating factor,Ponsin- Afadin-Nectin2,PRF1,PVRL2,PVRL3,Rap1,Rap,RAP1B,RASA2,RIN2	16	16	Carbohydrate Metabolism, Small Molecule Biochemistry, Cancer
12	AHSP,ARID1A,ATF7IP,BCOR,BMP6,CCL16,CCL21,CCL3L1/CCL3L 3,CX3CL1,CXCL3,CXCL10,CXCL11,DPF2,FCER1A,GATA1,GLI1,he parin,IDE,IGFBP6,IL3RA,LGALS12,MED21,MS4A2,MT1L,NR3C1,P DCD1LG2,PLA2G10,PLOD1,PPBP,SASH1,SEN6,SMARCA4,ST6 GALNAC4,SUMO1,ZNF185	15	15	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Cellular Movement, Immune Cell Trafficking
13	ACTA2,ACVR2A,AKT2,ARHGAP15,BGN,CSNK1E,CTNBNB1,CYB5R 3,DKK1,GADD45B,GNA12,GTF2H2,Iga,IGJ,KIAA0930,KREMEN1,L AP3,LGALS2,LRP6,MUC1,NCAM1,NFYB,PAK1,Pak,PGAM1,PRDM 1,PRRC2A,S100A4,SLC1A5,TAF11,TAF12,TAF4B,TCF7L2,ZFP42,Z NF484	14	15	Embryonic Development, Organismal Development, Skeletal and Muscular System Development and Function
14	60S ribosomal subunit,ARRB2,CDKN2A,FKBP9,MDM2,MYC,MYCN,NUCB1,Riboso mal 40s subunit,RPL6,RPL7,RPL9,RPL12,RPL17,RPL30,RPL31,RPL34,RPL 39,RPL41,RPL10A,RPL22L1,RPL3L,RPLP0,RPS5,RPS6,RPS13,RP S26,RPS27,RPS15A,RPS27A,RPS3A,SORD,TMEM109,WT1	13	14	Protein Synthesis, Gene Expression, Cancer
15	AHR,ALDH2,AREG/AREGB,ATXN1,CD300C,CD300E,COL3A1,CSN K2A2,CTSD,EMILIN1,EMILIN2,FBLN2,GAS1,HDC,KLRC4- KLK1/KLRK1,KLRD1,KPNA2,MAF1,mir-10,MT- TY,MTOR,NOC2L,Nuclear factor 1,PIGF,PLAG1,POLA1,PRKRIR,SH2D1A,SUB1,TGFB1,TGM2,TIMP 2,TNFRSF10A,TP53,TYROBP	13	14	Cellular Movement, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Inflammatory Response
16	14-3- 3,AKT1S1,ATP1B2,CD74,CRIPT,DLG3,DLG4,EIF4A,EIF4G1,ERBB 2,ERBB2IP,FAM21A/FAM21C,GP1BA,GPI,GRI,GRIK1,GRIK2,GRIK 3,GRIK4,GRIK5,Grik,GRIN2A,GRIN2C,HAP1,KIF1C,MKRN1,MLXIP, MYOF,NRG1,PABPC1,PCBP1,RAB18,RPH3A,SNX27,YWHAZ	12	13	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Nervous System Development and Function, Cell Morphology
17	CDK6,DDX20,DHCR24,FHL1,FOXG1,FOXO4,H1F0,HBP1,KDM5B,M CM2,mir-17,mir-29,mir- 186,NEDD9,NLK,PAX3,PDCD1,phosphatase,PITX1,PPP2R5D,PPP4 R1,PTPN12,PTPRJ,PTPRN,RALGAPA1,RB1,Scd2,SCD,SMOX,SO CS3,TAL1,TAX1BP1,TCF3,TNS3,TSPY1 (includes others)	12	13	Cell Death and Survival, Tumor Morphology, Lymphoid Tissue Structure and Development
18	Akt,ATM,CSF1R,CTTNBP2,CTTNBP2NL,DIAPH1,E2F2,Jnk,MAP2K 3,mir-15,mir- 27,MOB4,MST4,MT1G,NCK,NUAK1,PDCD10,PIK3CA,PIK3CD,PKN 2,PPP2c,PPP2R1B,PPP2R2C,PRKCH,Ras homolog,RHOC,SIKE1,STK3,STK4,STK25,STRN,TAL1,TCL1A,UBE 2H,Vegf	12	13	Hematological System Development and Function, Hematopoiesis, Tissue Morphology
19	Ampa Receptor,AQP7,ARRB1,CHM,CHRNA1,CRAT,FDPS,geranylgeranyl pyrophosphate,GMFB,hexokinase,HK1,HTT,IDE,IGF2BP2,Ins1,JAZF 1,KLF11,MYH9,NAPA,NSF,PC,PEX6,PPARG,RAB7A,RABGGTA,R ABGGTB,Snare,SRP9,STX12,STXBP5,TPM2,TUBB2A,USE1,VAMP 8,VDAC1	12	13	Post-Translational Modification, Nucleic Acid Metabolism, Small Molecule Biochemistry

20	AHI1,carboxylic ester hydrolase,CCND1,CDKN2C,CDKN2D,CES1,Ces,Ces1d,CSF2RB,D OCK4,E2F1,FECH,heme,IL31RA,IL5RA,JAK2,LIPC,MCM2,MCM4,M CM5,mir-15,mir-17,miR-16-5p (and other miRNAs w/seed AGCAGCA),NDST1,ORC1,OSMR,PNPLA6,PRDX6,RBBP8,SMARC B1,sulfotransferase,SULT1B1,SULT2A1,TMOD1	11	12	Cell Cycle, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Cellular Growth and Proliferation
21	Calcineurin protein(s),Ces1d,ENG,GBP4,GLRA1,GLRA2,GLRA3,GLRA4,GLRB, HBG1,HBG2,HBZ,HIF1A,HOXA9,HUWE1,LDHA,LIPA,MFN2,NFAT (complex),NFATC2,OSBPL8,PDGFB,PSMA4,PSMA6,SETDB1,SLC2 9A1,SLC2A3,SLC31A1,SMAD3,SMPD1,SMPD3,SP1,TGFBR,TIMP1 ,ZMIZ1	11	13	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Cellular Growth and Proliferation, Lipid Metabolism
22	AGTPBP1,BNIP3,C9orf72,CLK1,CLK4,DBF4,DDDB1,DDDB2,E2F1,E2F 4,FAM60A,MCM3,MCM5,MKI67,MT1G,NPAT,ORC1,PNKP,POLA1,P OLB,RNF144A,SLC3A2,SRSF1,SRSF2,TAF1D,TFDP2,TFDP3,TOP 2B,TRIM28,UBE2O,UBL5,UNG,UXT,VPRBP,ZNF354A	10	11	DNA Replication, Recombination, and Repair, Cancer, Hematological Disease

Anexo 1

Pathways

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)	Ratio	Molecules
OX40 Signaling Pathway	4.97E00	1.02E-01	HLA-DMA,HLA-DQB2,CD4,HLA-DQA1,HLA-DRB1,HLA-DQB1,NFKB2,HLA-DQA2,HLA-DRB5
Allograft Rejection Signaling	4.81E00	8.79E-02	HLA-DMA,PRF1,HLA-DQB2,HLA-DQA1,HLA-DRB1,HLA-DQB1,HLA-DQA2,HLA-DRB5
iCOS-iCOSL Signaling in T Helper Cells	4.57E00	1.12E-01	HLA-DMA,PIK3CA,CD4,HLA-DQA1,TRAT1,HLA-DRB1,HLA-DQB1,CHUK,NFKB2,HLA-DRB5,ATM,IL2RB
Cytotoxic T Lymphocyte-mediated Apoptosis of Target Cells	4.34E00	9.88E-02	HLA-DMA,PRF1,HLA-DQB2,HLA-DQA1,HLA-DRB1,HLA-DQB1,HLA-DQA2,HLA-DRB5
Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer Cells	4.14E00	1.28E-01	PRF1,IL3RA,KLRK4-KLRK1/KLRK1,ACTA2,TLR7,HLA-DRB1,TLN1,NFKB2,HLA-DRB5,PVRL2,IL2RB
CTLA4 Signaling in Cytotoxic T Lymphocytes	4.04E00	1.28E-01	HLA-DMA,AP2M1,PIK3CA,CD4,HLA-DQA1,TRAT1,HLA-DRB1,HLA-DQB1,HLA-DRB5,ATM
Type I Diabetes Mellitus Signaling	3.88E00	1.03E-01	SOCS3,HLA-DMA,PRF1,HLA-DQA1,HLA-DRB1,IFNGR1,MAP2K3,HLA-DQB1,CHUK,NFKB2,HLA-DRB5,IRF1
Cdc42 Signaling	3.42E00	7.45E-02	HLA-DMA,DIAPH1,HLA-DQB2,WAS,HLA-DQA1,MYL4,HLA-DRB1,HLA-DQB1,EXOC6,HLA-DQA2,HLA-DRB5,LIMK1
CD28 Signaling in T Helper Cells	3.39E00	9.4E-02	HLA-DMA,PIK3CA,WAS,CD4,HLA-DQA1,HLA-DRB1,HLA-DQB1,CHUK,NFKB2,HLA-DRB5,ATM
B Cell Development	3.25E00	1.79E-01	HLA-DMA,HLA-DQA1,HLA-DRB1,HLA-DQB1,HLA-DRB5
Autoimmune Thyroid Disease Signaling	3.25E00	1.03E-01	HLA-DMA,PRF1,HLA-DQA1,HLA-DRB1,HLA-DQB1,HLA-DRB5
Antigen Presentation Pathway	3.25E00	1.67E-01	HLA-DMA,HLA-DQB2,HLA-DQA1,HLA-DRB1,HLA-DQA2,HLA-DRB5
EIF2 Signaling	3.15E00	7.87E-02	EIF2AK1,PIK3CA,RPL17,EIF4G1,RPL9,RPL7,RPS27,RPS3A,RPL39,RPS26,RPS15A,RPL31,RPL41,ATM
Altered T Cell and B Cell Signaling in Rheumatoid Arthritis	3.14E00	1.06E-01	HLA-DMA,RELB,HLA-DQA1,TLR7,HLA-DRB1,HLA-DQB1,CHUK,NFKB2,HLA-DRB5
Graft-versus-Host Disease Signaling	3.02E00	1.36E-01	HLA-DMA,PRF1,HLA-DQA1,HLA-DRB1,HLA-DQB1,HLA-DRB5
T Helper Cell Differentiation	3.01E00	1.18E-01	HLA-DMA,HLA-DQA1,HLA-DRB1,IFNGR1,IL12RB2,HLA-DQB1,TBX21,HLA-DRB5
PKCθ Signaling in T Lymphocytes	2.7E00	7.63E-02	HLA-DMA,PIK3CA,CD4,HLA-DQA1,HLA-DRB1,HLA-DQB1,CHUK,NFKB2,HLA-DRB5,ATM
IL-12 Signaling and Production in Macrophages	2.61E00	7.59E-02	APOL1,ALOX15,PIK3CA,IFNGR1,S100A8,IL12RB2,CHUK,NFKB2,IRF1,CLU,ATM
Dendritic Cell Maturation	2.61E00	6.52E-02	HLA-DMA,PIK3CA,ICAM1,RELB,HLA-DQA1,HLA-DRB1,STAT2,HLA-DQB1,CHUK,NFKB2,HLA-DRB5,ATM
Role of NFAT in Regulation of the Immune Response	2.53E00	6.9E-02	HLA-DMA,PIK3CA,CD4,GNA12,HLA-DQA1,MS4A2,HLA-DRB1,HLA-DQB1,CHUK,NFKB2,HLA-DRB5,ATM
IL-9 Signaling	2.48E00	1.43E-01	SOCS3,STAT5A,PIK3CA,NFKB2,ATM
Acute Myeloid Leukemia Signaling	2.44E00	1.04E-01	STAT5A,PIK3CA,MAP2K3,NFKB2,PML,CSF1R,TCF7L2,ATM
IL-4 Signaling	2.41E00	1.06E-01	HLA-DMA,PIK3CA,HLA-DQA1,HLA-DRB1,HLA-DQB1,HLA-DRB5,ATM
IL-10 Signaling	2.24E00	9.72E-02	CCR1,HMOX1,SOCS3,IL1RL1,MAP2K3,CHUK,NFKB2
Calcium-induced T Lymphocyte Apoptosis	2.12E00	9.09E-02	HLA-DMA,CD4,HLA-DQA1,HLA-DRB1,HLA-DQB1,HLA-DRB5
HMGB1 Signaling	2.03E00	8.99E-02	PIK3CA,ICAM1,HMGB1,HAT1,IFNGR1,MAP2K3,NFKB2,ATM
Dopamine Degradation	2.01E00	9.38E-02	ALDH2,SMOX,SULT1B1
CD40 Signaling	1.96E00	9.68E-02	PIK3CA,ICAM1,MAP2K3,CHUK,NFKB2,ATM

Actin Cytoskeleton Signaling	1.86E00	6.1E-02	PIK3CA, ARHGEF12, GNA12, ACTA2, TLN1, GSN, LIMK1, DIAPH1, FLNA, WAS, MYL4, MYH9, ATM
iNOS Signaling	1.79E00	9.43E-02	LY96, IFNGR1, CHUK, NFKB2, IRF1
LXR/RXR Activation	1.78E00	7.14E-02	APOL1, SCD, LY96, C3, IL1RL1, S100A8, NCOR2, NFKB2, CLU
Atherosclerosis Signaling	1.78E00	7.03E-02	APOL1, CCR3, ALOX15, ICAM1, PLA2G10, S100A8, NFKB2, CLU, PRDX6
Xenobiotic Metabolism Signaling	1.77E00	5.49E-02	PIK3CA, NFKB2, CYP1B1, HMOX1, CES1, GSTM4, SMOX, MAP2K3, NCOR2, NDST1, PNPLA6, GSTP1, SULT1B1, ATM
Nur77 Signaling in T Lymphocytes	1.75E00	8.33E-02	HLA-DMA, HLA-DQA1, HLA-DRB1, HLA-DQB1, HLA-DRB5
FAK Signaling	1.74E00	7.45E-02	PIK3CA, WAS, CAPN1, ACTA2, TLN1, TNS1, ATM
Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	1.73E00	7.04E-02	SMAD2, LY96, ICAM1, TIMP1, IL1RL1, ACTA2, MYL4, MYH9, IFNGR1, NFKB2
Interferon Signaling	1.73E00	1.18E-01	OAS1, IFNGR1, STAT2, IRF1
Role of Osteoblasts, Osteoclasts and Chondrocytes in Rheumatoid Arthritis	1.65E00	5.86E-02	PIK3CA, IL1RL1, GSN, CSF1R, ITGB3, BMPR1A, MMP8, MAP2K3, CHUK, BMP8B, LRP1, TCF7L2, ATM
Lymphotoxin β Receptor Signaling	1.64E00	9.26E-02	PIK3CA, RELB, CHUK, NFKB2, ATM
Heme Biosynthesis II	1.63E00	9.09E-02	FECH, ALAS2
UDP-N-acetyl-D-galactosamine Biosynthesis II	1.63E00	8.7E-02	HK1, GPI
Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages	1.57E00	5.73E-02	APOL1, RAP1B, PIK3CA, MPO, IFNGR1, S100A8, CHUK, NFKB2, IRF1, CLU, ATM
NF- κ B Activation by Viruses	1.56E00	7.89E-02	PIK3CA, CD4, CHUK, NFKB2, ATM, ITGB3
Glycolysis I	1.55E00	7.89E-02	GPI, PGAM1, FBP1
Docosahexaenoic Acid (DHA) Signaling	1.54E00	9.3E-02	ALOX15, PIK3CA, ATM, APP
Pathogenesis of Multiple Sclerosis	1.51E00	2.5E-01	CXCL10, CCR1
Phenylalanine Degradation IV (Mammalian, via Side Chain)	1.51E00	5.88E-02	ALDH2, SMOX
Gluconeogenesis I	1.49E00	6.67E-02	GPI, PGAM1, FBP1
Role of PKR in Interferon Induction and Antiviral Response	1.46E00	9.52E-02	MAP2K3, CHUK, NFKB2, IRF1
Superpathway of Melatonin Degradation	1.46E00	5.56E-02	MPO, SMOX, SULT1B1, CYP1B1
Melatonin Degradation III	1.45E00	1.67E-01	MPO
Sorbitol Degradation I	1.45E00	2E-01	SORD
Histamine Biosynthesis	1.45E00	3.33E-01	HDC
Sulfite Oxidation IV	1.45E00	2.5E-01	SUOX
Toll-like Receptor Signaling	1.43E00	8.2E-02	LY96, TLR7, MAP2K3, CHUK, NFKB2
Role of JAK1, JAK2 and TYK2 in Interferon Signaling	1.38E00	1.15E-01	IFNGR1, STAT2, NFKB2
TREM1 Signaling	1.37E00	7.25E-02	STAT5A, ICAM1, MPO, TLR7, NFKB2
Role of JAK1 and JAK3 in γ c Cytokine Signaling	1.37E00	8.2E-02	SOCS3, STAT5A, PIK3CA, ATM, IL2RB
MSP-RON Signaling Pathway	1.35E00	9.09E-02	PIK3CA, IL3RA, ACTA2, ATM
Putrescine Degradation III	1.33E00	8E-02	ALDH2, SMOX
Epithelial Adherens Junction Signaling	1.32E00	6.57E-02	RAP1B, TUBB1, WAS, ACTA2, TUBB2A, MYL4, MYH9, TCF7L2, PVRL2

IL-15 Signaling	1.31E00	8.06E-02	STAT5A,PIK3CA,NFKB2,ATM,IL2RB
Angiopoietin Signaling	1.29E00	7.46E-02	STAT5A,PIK3CA,CHUK,NFKB2,ATM
Tec Kinase Signaling	1.28E00	5.36E-02	STAT5A,PIK3CA,WAS,GNA12,ACTA2,MS4A2,STAT2,NFKB2,ATM
Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Viruses	1.25E00	6.52E-02	OAS1,PIK3CA,C3,TLR7,NFKB2,ATM
Tryptophan Degradation X (Mammalian, via Tryptamine)	1.25E00	8E-02	ALDH2,SMOX
Communication between Innate and Adaptive Immune Cells	1.21E00	5.1E-02	CXCL10,CD4,TLR7,HLA-DRB1,HLA-DRB5
Germ Cell-Sertoli Cell Junction Signaling	1.2E00	5.96E-02	TUBB1,PIK3CA,ACTA2,TUBB2A,MAP2K3,GSN,PVRL2,LIMK1,ATM
Complement System	1.2E00	1.03E-01	SERPING1,C3,C2
Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	1.19E00	5.41E-02	TGM2,NF1X,GSTM4,NCOR2,NFKB2,GSTP1,CYP1B1,ATM
Virus Entry via Endocytic Pathways	1.16E00	6.59E-02	AP2M1,PIK3CA,FLNA,ACTA2,ATM,ITGB3
Erythropoietin Signaling	1.16E00	6.85E-02	SOCS3,STAT5A,PIK3CA,NFKB2,ATM
JAK/Stat Signaling	1.16E00	7.69E-02	SOCS3,STAT5A,PIK3CA,STAT2,ATM
Spermine and Spermidine Degradation I	1.15E00	8.33E-02	SMOX
Melatonin Degradation II	1.15E00	9.09E-02	SMOX
Putrescine Biosynthesis III	1.15E00	2.5E-01	ODC1
Gα12/13 Signaling	1.13E00	6.09E-02	LPAR6,PIK3CA,GNA12,MYL4,CHUK,NFKB2,ATM
PEDF Signaling	1.11E00	6.94E-02	PIK3CA,CHUK,NFKB2,CFLAR,ATM
Antioxidant Action of Vitamin C	1.1E00	6E-02	HMOX1,STAT5A,PLA2G10,CHUK,NFKB2,PRDX6
IL-6 Signaling	1.09E00	6.14E-02	SOCS3,PIK3CA,IL1RL1,MAP2K3,CHUK,NFKB2,ATM
IL-17 Signaling	1.09E00	7.35E-02	CXCL10,PIK3CA,TIMP1,MAP2K3,ATM
Serotonin Degradation	1.08E00	4.84E-02	ALDH2,SMOX,SULT1B1
LPS-stimulated MAPK Signaling	1.07E00	6.58E-02	PIK3CA,MAP2K3,CHUK,NFKB2,ATM
Chronic Myeloid Leukemia Signaling	1.07E00	6E-02	STAT5A,PIK3CA,CHUK,NFKB2,E2F2,ATM
Paxillin Signaling	1.07E00	6E-02	PIK3CA,ITGA2B,ACTA2,TLN1,ATM,ITGB3
MIF-mediated Glucocorticoid Regulation	1.05E00	7.32E-02	LY96,PLA2G10,NFKB2
Reelin Signaling in Neurons	1.05E00	7.14E-02	PIK3CA,ARHGEF12,ATM,APP,ITGB3
Role of IL-17A in Arthritis	1.04E00	7.02E-02	PIK3CA,MAP2K3,NFKB2,ATM
IL-2 Signaling	1.04E00	7.55E-02	STAT5A,PIK3CA,ATM,IL2RB
Regulation of Actin-based Motility by Rho	1.02E00	6.67E-02	WAS,ACTA2,MYL4,GSN,LIMK1
Prolactin Signaling	1.02E00	6.67E-02	SOCS3,STAT5A,PIK3CA,IRF1,ATM
Glioma Invasiveness Signaling	1.02E00	7.55E-02	PIK3CA,TIMP1,ATM,ITGB3
Phospholipases	1.02E00	6.56E-02	CCR1,HMOX1,PLA2G10,PRDX6
Granzyme A Signaling	1.01E00	1.11E-01	H1FO,PRF1
ErbB2-ErbB3 Signaling	9.92E-01	7.41E-02	NRG1,STAT5A,PIK3CA,ATM
Uracil Degradation II (Reductive)	9.87E-01	1E-01	DPYSL2
Trehalose Degradation II (Trehalase)	9.87E-01	1.11E-01	HK1
Heme Degradation	9.87E-01	1E-01	HMOX1

Heme Biosynthesis from Uroporphyrinogen-III I	9.87E-01	1E-01	FECH
Phenylethylamine Degradation I	9.87E-01	1E-01	ALDH2
Thymine Degradation	9.87E-01	1E-01	DPYSL2
Purine Ribonucleosides Degradation to Ribose-1-phosphate	9.87E-01	6.25E-02	CECR1
Rapoport-Luebering Glycolytic Shunt	9.87E-01	1.25E-01	PGAM1
GDP-glucose Biosynthesis	9.87E-01	6.25E-02	HK1
GDP-mannose Biosynthesis	9.87E-01	1E-01	GPI
Acute Phase Response Signaling	9.78E-01	5.29E-02	HMOX1,SOCS3,SERPING1,PIK3CA,C3,MAP2K3,CHUK,NFKB2,C2
Heparan Sulfate Biosynthesis (Late Stages)	9.52E-01	6.25E-02	NDST1,SULT1B1,PRDX6
Clathrin-mediated Endocytosis Signaling	9.4E-01	5.2E-02	APOL1,AP2M1,PIK3CA,ACTA2,S100A8,HIP1,CLU,ATM,ITGB3
Prostate Cancer Signaling	9.27E-01	5.43E-02	PIK3CA,CHUK,NFKB2,GSTP1,ATM
RhoA Signaling	9.26E-01	6.12E-02	LPAR6,ARHGEF12,GNA12,ACTA2,MYL4,LIMK1
NGF Signaling	9.26E-01	5.56E-02	RAP1B,PIK3CA,CHUK,NFKB2,SMPD3,ATM
Estrogen-Dependent Breast Cancer Signaling	9.23E-01	6.25E-02	STAT5A,PIK3CA,NFKB2,ATM
Oncostatin M Signaling	9.23E-01	8.57E-02	MT2A,STAT5A,EPAS1
IL-17A Signaling in Fibroblasts	9.23E-01	7.5E-02	LCN2,CHUK,NFKB2
VDR/RXR Activation	9.08E-01	6.41E-02	CXCL10,CCNC,IL1RL1,NCOR2,VDR
IL-8 Signaling	8.81E-01	4.74E-02	HMOX1,PIK3CA,ICAM1,MPO,GNA12,CHUK,LIMK1,ATM,ITGB3
IL-17A Signaling in Airway Cells	8.8E-01	5.97E-02	PIK3CA,CHUK,NFKB2,ATM
Death Receptor Signaling	8.8E-01	6.45E-02	DAXX,CHUK,NFKB2,CFLAR
Molecular Mechanisms of Cancer	8.72E-01	4.24E-02	RAP1B,SMAD2,PIK3CA,ARHGEF12,HAT1,GNA12,NFKB2,DAXX,BMPR1A,MAP2K3,CFLAR,E2F2,LRP1,BMP8B,ATM
Glucose and Glucose-1-phosphate Degradation	8.69E-01	4.76E-02	HK1
Phosphatidylethanolamine Biosynthesis II	8.69E-01	7.69E-02	PIGF
Serine Biosynthesis	8.69E-01	7.69E-02	PSPH
Tetrapyrrole Biosynthesis II	8.69E-01	7.69E-02	ALAS2
Pentose Phosphate Pathway (Non-oxidative Branch)	8.69E-01	9.09E-02	RPIA
Adenine and Adenosine Salvage III	8.69E-01	7.14E-02	CECR1
Pancreatic Adenocarcinoma Signaling	8.64E-01	5.36E-02	SMAD2,HMOX1,PIK3CA,NFKB2,E2F2,ATM
Role of Tissue Factor in Cancer	8.64E-01	5.61E-02	STAT5A,PIK3CA,GNA12,LIMK1,ATM,ITGB3
RANK Signaling in Osteoclasts	8.56E-01	5.75E-02	PIK3CA,CHUK,NFKB2,GSN,ATM
Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling	8.52E-01	4.52E-02	PIK3CA,RPS27,RPS3A,RPS26,RPS15A,EIF4G1,ATM
MIF Regulation of Innate Immunity	8.42E-01	6.25E-02	LY96,PLA2G10,NFKB2
Heparan Sulfate Biosynthesis	8.42E-01	5.17E-02	NDST1,SULT1B1,PRDX6

Inhibition of Matrix Metalloproteases	8.42E-01	7.5E-02	TIMP1,MMP8,LRP1
Huntington's Disease Signaling	8.4E-01	4.52E-02	TGM2,PIK3CA,HSPA1A/HSPA1B,CAPN1,HIP1,NCOR2,HSPA5,NA PA,RPH3A,ATM
Eicosanoid Signaling	8.39E-01	5E-02	ALOX15,PLA2G10,CYSLTR2,PRDX6
Integrin Signaling	8.36E-01	4.86E-02	RAP1B,PIK3CA,ITGA2B,WAS,CAPN1,ACTA2,TLN1,ATM,ITGB3
T Cell Receptor Signaling	8.22E-01	5.26E-02	PIK3CA,CD4,CHUK,NFKB2,ATM
Cell Cycle: G1/S Checkpoint Regulation	8.2E-01	6.06E-02	NRG1,SKP1,E2F2,ATM
Macropinocytosis Signaling	8.2E-01	5.97E-02	PIK3CA,CSF1R,ATM,ITGB3
Type II Diabetes Mellitus Signaling	8.06E-01	3.92E-02	SOCS3,PIK3CA,CHUK,NFKB2,SMPD3,ATM
Leukocyte Extravasation Signaling	7.93E-01	4.79E-02	RAP1B,PIK3CA,ICAM1,WAS,TIMP1,MMP8,ACTA2,ATM,ITGB3
Factors Promoting Cardiogenesis in Vertebrates	7.91E-01	5.62E-02	SMAD2,BMPR1A,BMP8B,LRP1,TCF7L2
Glutathione-mediated Detoxification	7.67E-01	4.88E-02	GSTM4,GSTP1
Noradrenaline and Adrenaline Degradation	7.67E-01	4.65E-02	ALDH2,SMOX
Growth Hormone Signaling	7.64E-01	5.8E-02	SOCS3,STAT5A,PIK3CA,ATM
RAR Activation	7.56E-01	4.6E-02	SMAD2,STAT5A,PIK3CA,IL3RA,NCOR2,NFKB2,PML,CARM1
P2Y Purigenic Receptor Signaling Pathway	7.52E-01	4.65E-02	P2RY2,PIK3CA,ITGA2B,NFKB2,ATM,ITGB3
Ephrin A Signaling	7.48E-01	6.67E-02	PIK3CA,LIMK1,ATM
FLT3 Signaling in Hematopoietic Progenitor Cells	7.47E-01	5.88E-02	STAT5A,PIK3CA,STAT2,ATM
Role of MAPK Signaling in the Pathogenesis of Influenza	7.47E-01	5.97E-02	CXCL10,PLA2G10,MAP2K3,PRDX6
mTOR Signaling	7.45E-01	4.32E-02	HMOX1,PIK3CA,RPS27,RPS3A,RPS26,RPS15A,EIF4G1,ATM
PPAR Signaling	7.45E-01	4.95E-02	STAT5A,IL1RL1,NCOR2,CHUK,NFKB2
Role of p14/p19ARF in Tumor Suppression	7.36E-01	8E-02	PIK3CA,ATM
Caveolar-mediated Endocytosis Signaling	7.3E-01	5.06E-02	ITGA2B,FLNA,ACTA2,ITGB3
ILK Signaling	7.14E-01	4.73E-02	PIK3CA,FLNA,ACTA2,MYL4,MYH9,NFKB2,ATM,ITGB3
Small Cell Lung Cancer Signaling	7.13E-01	4.82E-02	PIK3CA,CHUK,NFKB2,ATM
Superpathway of Serine and Glycine Biosynthesis I	7.08E-01	5.56E-02	PSPH
Glycogen Degradation II	7.08E-01	7.69E-02	TYMP
IL-22 Signaling	7.06E-01	8.33E-02	SOCS3,STAT5A
IL-15 Production	7.06E-01	6.9E-02	NFKB2,IRF1
Triacylglycerol Degradation	7.06E-01	6.45E-02	NDST1,PRDX6
eNOS Signaling	6.9E-01	4.32E-02	AQP7,LPAR6,PIK3CA,HSPA1A/HSPA1B,HSPA5,ATM
IL-3 Signaling	6.81E-01	5.8E-02	STAT5A,PIK3CA,IL3RA,ATM
Tumoricidal Function of Hepatic Natural Killer Cells	6.78E-01	8.33E-02	PRF1,ICAM1
Role of JAK family kinases in IL-6-type Cytokine Signaling	6.78E-01	7.69E-02	SOCS3,STAT5A
Rac Signaling	6.76E-01	4.67E-02	PIK3CA,NFKB2,LIMK1,ATM,ANK1

HER-2 Signaling in Breast Cancer	6.66E-01	5.63E-02	NRG1,PIK3CA,ATM,ITGB3
Ceramide Signaling	6.51E-01	5.06E-02	PIK3CA,NFKB2,SMPD3,ATM
Fc Epsilon RI Signaling	6.5E-01	4.85E-02	PIK3CA,PLA2G10,MS4A2,MAP2K3,ATM
Cleavage and Polyadenylation of Pre-mRNA	6.49E-01	1.43E-01	CPSF1
Glycogen Degradation III	6.49E-01	7.14E-02	TYMP
Pentose Phosphate Pathway	6.49E-01	5E-02	RPIA
Colanic Acid Building Blocks Biosynthesis	6.49E-01	3.45E-02	GPI
Sphingomyelin Metabolism	6.49E-01	6.67E-02	SMPD3
CD27 Signaling in Lymphocytes	6.48E-01	5.66E-02	MAP2K3,CHUK,NFKB2
Semaphorin Signaling in Neurons	6.3E-01	6.38E-02	DPYSL2,ARHGEF12,LIMK1
Role of PI3K/AKT Signaling in the Pathogenesis of Influenza	6.3E-01	4.62E-02	PIK3CA,NFKB2,ATM
Antiproliferative Role of TOB in T Cell Signaling	6.26E-01	7.69E-02	SMAD2,SKP1
Dermatan Sulfate Biosynthesis (Late Stages)	6.26E-01	5.88E-02	NDST1,SULT1B1
Signaling by Rho Family GTPases	6.25E-01	4.19E-02	PIK3CA,ARHGEF12,WAS,GNA12,ACTA2,MYL4,NFKB2,LIMK1,ATM
NF- κ B Signaling	6.14E-01	4.32E-02	PIK3CA,BMPR1A,RELB,TLR7,CHUK,NFKB2,ATM
Human Embryonic Stem Cell Pluripotency	6.12E-01	4.14E-02	SMAD2,PIK3CA,BMPR1A,BMP8B,TCF7L2,ATM
Breast Cancer Regulation by Stathmin1	6.1E-01	4.32E-02	TUBB1,PIK3CA,ARHGEF12,TUBB2A,RB1CC1,E2F2,LIMK1,ATM
TNFR2 Signaling	6.02E-01	6.06E-02	CHUK,NFKB2
Airway Pathology in Chronic Obstructive Pulmonary Disease	5.99E-01	1.11E-01	MMP8
Oleate Biosynthesis II (Animals)	5.99E-01	6.25E-02	SCD
Salvage Pathways of Pyrimidine Deoxyribonucleotides	5.99E-01	4.76E-02	TYMP
Activation of IRF by Cytosolic Pattern Recognition Receptors	5.96E-01	4.55E-02	STAT2,CHUK,NFKB2
Glucocorticoid Receptor Signaling	5.93E-01	3.83E-02	SMAD2,STAT5A,PIK3CA,ICAM1,HMGB1,HSPA1A/HSPA1B,NCOR2,CHUK,HSPA5,ATM
Thrombopoietin Signaling	5.8E-01	5.17E-02	STAT5A,PIK3CA,ATM
4-1BB Signaling in T Lymphocytes	5.8E-01	5.88E-02	CHUK,NFKB2
Systemic Lupus Erythematosus Signaling	5.77E-01	3.29E-02	SNRPN,SNRNP48,PIK3CA,RNU4-2,TLR7,SART1,ATM
Granulocyte Adhesion and Diapedesis	5.77E-01	4.29E-02	CXCL10,ICAM1,IL1RL1,MMP8,PPBP,HRH4,ITGB3
Chondroitin Sulfate Biosynthesis (Late Stages)	5.58E-01	4.88E-02	NDST1,SULT1B1
Histamine Degradation	5.55E-01	3.85E-02	ALDH2
Fatty Acid α -oxidation	5.55E-01	5.88E-02	ALDH2
Induction of Apoptosis by HIV1	5.49E-01	5.08E-02	DAXX,CHUK,NFKB2

Antiproliferative Role of Somatostatin Receptor 2	5.49E-01	4.69E-02	RAP1B,PIK3CA,ATM
CCR3 Signaling in Eosinophils	5.46E-01	4.27E-02	CCR3,PIK3CA,PLA2G10,LIMK1,ATM
Inhibition of Angiogenesis by TSP1	5.38E-01	5.41E-02	CD47,THBS1
Retinol Biosynthesis	5.38E-01	3.7E-02	CES1,PNPLA6
ErbB4 Signaling	5.34E-01	4.84E-02	NRG1,PIK3CA,ATM
PAK Signaling	5.31E-01	4.21E-02	PIK3CA,MYL4,LIMK1,ATM
Gαq Signaling	5.24E-01	3.95E-02	HMOX1,PIK3CA,RGS18,CHUK,NFKB2,ATM
SAPK/JNK Signaling	5.2E-01	4.3E-02	DAXX,PIK3CA,GNA12,ATM
TGF-β Signaling	5.2E-01	4.65E-02	SMAD2,BMPR1A,MAP2K3,VDR
Role of JAK2 in Hormone-like Cytokine Signaling	5.18E-01	5.71E-02	SOCS3,STAT5A
Adenosine Nucleotides Degradation II	5.17E-01	4.76E-02	CECR1
Oxidative Ethanol Degradation III	5.17E-01	2.86E-02	ALDH2
PTEN Signaling	5.15E-01	4.07E-02	FOXO4,PIK3CA,BMPR1A,CHUK,NFKB2
NRF2-mediated Oxidative Stress Response	5.09E-01	4.17E-02	HMOX1,PIK3CA,ACTA2,GSTM4,MAP2K3,GSTP1,ATM
Agranulocyte Adhesion and Diapedesis	5.09E-01	4.07E-02	CXCL10,ICAM1,MMP8,ACTA2,PPBP,MYL4,MYH9
ErbB Signaling	5.08E-01	4.94E-02	NRG1,PIK3CA,MAP2K3,ATM
Tight Junction Signaling	5.06E-01	4.32E-02	ACTA2,CPSF1,MYL4,MYH9,NFKB2,PVRL2
Sertoli Cell-Sertoli Cell Junction Signaling	5.01E-01	3.95E-02	TUBB1,WAS,ACTA2,TUBB2A,SPTB,MAP2K3,PVRL2
TWEAK Signaling	4.99E-01	5.26E-02	CHUK,NFKB2
Role of Hypercytokinemia/hyperchemokinememia in the Pathogenesis of Influenza	4.99E-01	5.13E-02	CXCL10,CCR1
Melatonin Degradation I	4.99E-01	3.45E-02	SULT1B1,CYP1B1
DNA Double-Strand Break Repair by Homologous Recombination	4.83E-01	7.14E-02	ATM
Chondroitin Sulfate Degradation (Metazoa)	4.83E-01	4.55E-02	GM2A
Choline Biosynthesis III	4.83E-01	5.26E-02	HMOX1
Role of RIG1-like Receptors in Antiviral Innate Immunity	4.82E-01	4.35E-02	CHUK,NFKB2
Natural Killer Cell Signaling	4.75E-01	4.35E-02	PIK3CA,SH2D1A,KLRC4-KLRK1/KLRK1,ATM
p53 Signaling	4.65E-01	4.6E-02	PIK3CA,THBS1,PML,ATM
FcγRIIB Signaling in B Lymphocytes	4.65E-01	3.85E-02	PIK3CA,ATM
April Mediated Signaling	4.65E-01	4.88E-02	CHUK,NFKB2
Chondroitin Sulfate Biosynthesis	4.65E-01	3.64E-02	NDST1,SULT1B1
Axonal Guidance Signaling	4.58E-01	3.56E-02	DPYSL2,RAP1B,TUBB1,PIK3CA,ARHGEF12,GNA12,TUBB2A,PLXND1,LIMK1,WAS,MMP8,MYL4,PLXNB2,BMP8B,ATM
Colorectal Cancer Metastasis Signaling	4.58E-01	3.69E-02	SMAD2,PIK3CA,MMP8,TLR7,IFNGR1,NFKB2,LRP1,TCF7L2,ATM
Telomerase Signaling	4.55E-01	4.35E-02	PIK3CA,TPP1,ATM,IL2RB
Neurotrophin/TRK Signaling	4.54E-01	4.41E-02	PIK3CA,MAP2K3,ATM
Role of Lipids/Lipid Rafts in the Pathogenesis of Influenza	4.52E-01	4.17E-02	RSAD2

DNA Double-Strand Break Repair by Non-Homologous End Joining	4.52E-01	5.88E-02	ATM
Cholesterol Biosynthesis I	4.52E-01	2.56E-02	DHCR24
Purine Nucleotides Degradation II (Aerobic)	4.52E-01	3.45E-02	CECR1
Cholesterol Biosynthesis II (via 24,25-dihydrolanosterol)	4.52E-01	2.56E-02	DHCR24
Cholesterol Biosynthesis III (via Desmosterol)	4.52E-01	2.56E-02	DHCR24
Ethanol Degradation IV	4.52E-01	4.17E-02	ALDH2
Fcy Receptor-mediated Phagocytosis in Macrophages and Monocytes	4.45E-01	4.21E-02	HMOX1,WAS,ACTA2,TLN1
IL-1 Signaling	4.35E-01	3.85E-02	GNA12,MAP2K3,CHUK,NFKB2
B Cell Activating Factor Signaling	4.33E-01	4.76E-02	CHUK,NFKB2
Dermatan Sulfate Biosynthesis	4.33E-01	3.57E-02	NDST1,SULT1B1
LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function	4.27E-01	3.48E-02	LY96,IL1RL1,GSTM4,SMOX,NDST1,SULT1B1,GSTP1
Thrombin Signaling	4.27E-01	3.76E-02	PIK3CA,ARHGEF12,GNA12,MYL4,NFKB2,GATA2,ATM
Mouse Embryonic Stem Cell Pluripotency	4.25E-01	4.4E-02	PIK3CA,BMPR1A,TCF7L2,ATM
Role of IL-17A in Psoriasis	4.25E-01	7.69E-02	S100A8
Dermatan Sulfate Degradation (Metazoa)	4.25E-01	4.35E-02	GM2A
Remodeling of Epithelial Adherens Junctions	4.19E-01	4.69E-02	TUBB1,ACTA2,TUBB2A
Melanoma Signaling	4.18E-01	4.88E-02	PIK3CA,ATM
Role of IL-17F in Allergic Inflammatory Airway Diseases	4.18E-01	4.55E-02	CXCL10,NFKB2
Amyotrophic Lateral Sclerosis Signaling	4.16E-01	3.6E-02	PIK3CA,GRIK4,CAPN1,ATM
Neuroprotective Role of THOP1 in Alzheimer's Disease	4.04E-01	3.85E-02	MME,APP
Cell Cycle: G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation	4.04E-01	4.44E-02	SKP1,ATM
Relaxin Signaling	4E-01	3.4E-02	RAP1B,PIK3CA,GNA12,NFKB2,ATM
Thyroid Hormone Metabolism II (via Conjugation and/or Degradation)	4E-01	2.13E-02	SULT1B1
Agrin Interactions at Neuromuscular Junction	3.98E-01	4.55E-02	NRG1,ACTA2,ITGB3
Leptin Signaling in Obesity	3.98E-01	3.95E-02	SOCS3,PIK3CA,ATM
CNTF Signaling	3.9E-01	4.17E-02	PIK3CA,ATM
Thyroid Cancer Signaling	3.77E-01	4.76E-02	CXCL10,TCF7L2
Lipid Antigen Presentation by CD1	3.77E-01	4E-02	AP2M1
RAN Signaling	3.77E-01	4.35E-02	KPNA5
Granzyme B Signaling	3.77E-01	6.67E-02	PRF1
γ-linolenate Biosynthesis II (Animals)	3.77E-01	4.55E-02	CYB5R3

VEGF Family Ligand-Receptor Interactions	3.58E-01	3.85E-02	PIK3CA,PLA2G10,ATM
Sphingosine-1-phosphate Signaling	3.56E-01	3.64E-02	PIK3CA,GNA12,SMPD3,ATM
Polyamine Regulation in Colon Cancer	3.56E-01	4.35E-02	ODC1
Glutathione Redox Reactions I	3.56E-01	4.35E-02	PRDX6
Endothelin-1 Signaling	3.51E-01	3.51E-02	HMOX1,PIK3CA,PLA2G10,GNA12,PRDX6,ATM
UVA-Induced MAPK Signaling	3.49E-01	3.9E-02	PIK3CA,SMPD3,ATM
Role of Macrophages, Fibroblasts and Endothelial Cells in Rheumatoid Arthritis	3.48E-01	3.19E-02	SOCS3,PIK3CA,ICAM1,IL1RL1,TLR7,MAP2K3,CHUK,LRP1,TCF7L2,ATM
fMLP Signaling in Neutrophils	3.41E-01	3.33E-02	PIK3CA,WAS,NFKB2,ATM
Role of NANOG in Mammalian Embryonic Stem Cell Pluripotency	3.41E-01	3.81E-02	PIK3CA,BMPR1A,BMP8B,ATM
Retinoic acid Mediated Apoptosis Signaling	3.41E-01	3.28E-02	CFLAR,IRF1
TCA Cycle II (Eukaryotic)	3.37E-01	2.86E-02	ACO2
DNA damage-induced 14-3-3 σ Signaling	3.37E-01	5.26E-02	ATM
Endoplasmic Reticulum Stress Pathway	3.37E-01	5.88E-02	HSPA5
BMP signaling pathway	3.31E-01	3.75E-02	BMPR1A,NFKB2,BMP8B
Role of CHK Proteins in Cell Cycle Checkpoint Control	3.29E-01	4.35E-02	E2F2,ATM
PPAR α /RXR α Activation	3.27E-01	3.23E-02	SMAD2,IL1RL1,MAP2K3,NCOR2,CHUK,NFKB2
Cyclins and Cell Cycle Regulation	3.22E-01	3.53E-02	SKP1,E2F2,ATM
Cardiomyocyte Differentiation via BMP Receptors	3.19E-01	4.76E-02	BMPR1A
Role of BRCA1 in DNA Damage Response	3.19E-01	4E-02	E2F2,ATM
TNFR1 Signaling	3.19E-01	3.92E-02	CHUK,NFKB2
UVB-Induced MAPK Signaling	3.19E-01	4.08E-02	PIK3CA,ATM
Amyloid Processing	3.19E-01	3.77E-02	CAPN1,APP
Regulation of IL-2 Expression in Activated and Anergic T Lymphocytes	3.14E-01	3.45E-02	SMAD2,CHUK,NFKB2
Endometrial Cancer Signaling	3.08E-01	3.92E-02	PIK3CA,ATM
p38 MAPK Signaling	3.05E-01	3.7E-02	DAXX,IL1RL1,PLA2G10,MAP2K3
GADD45 Signaling	3.02E-01	4.35E-02	ATM
D-myo-inositol (1,4,5)-Trisphosphate Biosynthesis	3.02E-01	3.23E-02	CCR1
Ethanol Degradation II	3.02E-01	3.12E-02	ALDH2
14-3-3-mediated Signaling	2.99E-01	3.67E-02	TUBB1,PIK3CA,TUBB2A,ATM
FGF Signaling	2.98E-01	3.66E-02	PIK3CA,MAP2K3,ATM
3-phosphoinositide Biosynthesis	2.92E-01	2.84E-02	SOCS3,TNS3,PIK3CA,ATM

Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition Pathway	2.89E-01	3.39E-02	SMAD2,PIK3CA,MAP2K3,NFKB2,TCF7L2,ATM
Superpathway of Inositol Phosphate Compounds	2.87E-01	2.7E-02	CCR1,SOCS3,TNS3,PIK3CA,ATM
Superpathway of Cholesterol Biosynthesis	2.87E-01	1.27E-02	DHCR24
TR/RXR Activation	2.83E-01	3.41E-02	PIK3CA,NCOR2,ATM
CXCR4 Signaling	2.82E-01	3.29E-02	PIK3CA,CD4,GNA12,MYL4,ATM
Mitotic Roles of Polo-Like Kinase	2.79E-01	3.51E-02	CAPN1,STAG2
Phospholipase C Signaling	2.76E-01	2.99E-02	RAP1B,TGM2,HMOX1,ARHGEF12,PLA2G10,MYL4,NFKB2
Bupropion Degradation	2.73E-01	3.23E-02	CYP1B1
B Cell Receptor Signaling	2.71E-01	3.27E-02	PIK3CA,MAP2K3,CHUK,NFKB2,ATM
EGF Signaling	2.7E-01	3.57E-02	PIK3CA,ATM
Hypoxia Signaling in the Cardiovascular System	2.7E-01	3.57E-02	UBE2H,ATM
Protein Ubiquitination Pathway	2.67E-01	3.3E-02	PSMA6,USP53,USP15,UBE2H,HSPA1A/HSPA1B,SKP1,HSPA5
Myc Mediated Apoptosis Signaling	2.62E-01	3.7E-02	PIK3CA,ATM
Regulation of Cellular Mechanics by Calpain Protease	2.62E-01	2.82E-02	CAPN1,TLN1
Gap Junction Signaling	2.61E-01	3.07E-02	TUBB1,PIK3CA,ACTA2,TUBB2A,ATM
Acetone Degradation I (to Methylglyoxal)	2.59E-01	2.94E-02	CYP1B1
Insulin Receptor Signaling	2.56E-01	3.17E-02	FOXO4,SOCS3,PIK3CA,ATM
Apoptosis Signaling	2.55E-01	3.26E-02	CAPN1,CHUK,NFKB2
VEGF Signaling	2.55E-01	3.12E-02	PIK3CA,ACTA2,ATM
Actin Nucleation by ARP-WASP Complex	2.54E-01	3.23E-02	WAS,GNA12
PI3K Signaling in B Lymphocytes	2.5E-01	3.1E-02	PIK3CA,C3,CHUK,NFKB2
Differential Regulation of Cytokine Production in Intestinal Epithelial Cells by IL-17A and IL-17F	2.47E-01	4.35E-02	LCN2
tRNA Charging	2.47E-01	1.52E-02	WARS
Superpathway of Methionine Degradation	2.47E-01	1.75E-02	SUOX
Cell Cycle Control of Chromosomal Replication	2.35E-01	3.45E-02	ORC4
IL-17A Signaling in Gastric Cells	2.35E-01	4.17E-02	CXCL10
Estrogen-mediated S-phase Entry	2.35E-01	3.57E-02	E2F2
Pyridoxal 5'-phosphate Salvage Pathway	2.3E-01	2.9E-02	MAP2K3,LIMK1
Hematopoiesis from Pluripotent Stem Cells	2.14E-01	1.75E-02	CD4
Stearate Biosynthesis I (Animals)	2.04E-01	2.38E-02	DHCR24
Serotonin Receptor Signaling	2.04E-01	2.38E-02	SMOX

Anexo 2
Functions

Category	p-value	Molecules
Connective Tissue Disorders	2.72E-06-1.17E-02	HLA-DRB1,LY6G6C,TAP2,ALPL,DDR1,HLA-DPA1,C2
Immunological Disease	2.72E-06-7.83E-03	LY6G6C,HLA-DRB1,ALPL,TAP2,DDR1,HLA-DPA1,C2
Inflammatory Disease	2.72E-06-1.29E-02	LY6G6C,HLA-DRB1,ALPL,TAP2,DDR1,C2,HLA-DPA1
Skeletal and Muscular Disorders	2.72E-06-4.49E-02	HLA-DRB1,LY6G6C,TAP2,ALPL,DDR1,HLA-DPA1,C2
Endocrine System Disorders	1.88E-04-1.88E-04	LY6G6C,TAP2,DDR1,HLA-DPA1
Gastrointestinal Disease	1.88E-04-7.83E-03	LY6G6C,ALPL,TAP2,DDR1,HLA-DPA1
Metabolic Disease	1.88E-04-1.17E-02	LY6G6C,TAP2,ALPL,DDR1,HLA-DPA1
Developmental Disorder	1.31E-03-4.49E-02	HLA-DRB1,TAP2,ALPL,C2
Hereditary Disorder	1.31E-03-4.49E-02	TMTC1,HLA-DRB1,TAP2,ALPL,DDR1,C2
Cell Morphology	2.62E-03-3.23E-02	HBZ,ALPL,DDR1
Cellular Compromise	2.62E-03-2.62E-03	HBZ
Cardiovascular System Development and Function	3.92E-03-3.92E-03	DDR1
Lymphoid Tissue Structure and Development	3.92E-03-3.92E-03	DDR1
Neurological Disease	3.92E-03-1.29E-02	TMTC1,HLA-DRB1,TAP2,DDR1
Organismal Development	3.92E-03-1.56E-02	ALPL,DDR1
Psychological Disorders	3.92E-03-1.11E-02	TMTC1,HLA-DRB1,DDR1
Dermatological Diseases and Conditions	5.46E-03-5.46E-03	HLA-DRB1,HLA-DPA1
Cancer	6.53E-03-6.53E-03	ALPL
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	6.53E-03-6.53E-03	DDR1
Ophthalmic Disease	6.53E-03-6.53E-03	C2
Organ Development	6.53E-03-1.56E-02	ALPL
Skeletal and Muscular System Development and Function	6.53E-03-4.99E-02	ALPL,DDR1
Tissue Development	6.53E-03-2.08E-02	ALPL,DDR1
Cellular Function and Maintenance	1.3E-02-4.99E-02	HBZ,ALPL,DDR1
Hematological System Development and Function	1.3E-02-3.1E-02	HBZ
Cellular Development	1.43E-02-3.1E-02	HBZ,DDR1
Cellular Growth and Proliferation	1.43E-02-1.43E-02	DDR1
Connective Tissue Development and Function	1.56E-02-4.99E-02	ALPL
Embryonic Development	1.56E-02-1.56E-02	ALPL
Organ Morphology	1.56E-02-1.56E-02	ALPL
Tissue Morphology	1.56E-02-4.8E-02	HBZ,ALPL,DDR1
Protein Synthesis	1.69E-02-3.48E-02	HBZ,ALPL
Cell Death and Survival	1.82E-02-1.82E-02	HBZ
Cellular Assembly and Organization	2.08E-02-2.08E-02	DDR1
Hematological Disease	2.08E-02-2.59E-02	HBZ
Molecular Transport	2.08E-02-4.61E-02	HBZ,TAP2
Nervous System Development and Function	2.08E-02-2.08E-02	DDR1
Organismal Injury and Abnormalities	2.08E-02-3.86E-02	HBZ,DDR1
Hematopoiesis	3.1E-02-3.1E-02	HBZ
Cardiovascular Disease	3.86E-02-3.86E-02	DDR1
Respiratory Disease	4.61E-02-4.61E-02	ALPL
Small Molecule Biochemistry	4.61E-02-4.61E-02	HBZ

Anexo 2

Network

ID	Molecules in Network
1	ALPL,B2M,C2,CDKN2A,CENPK,CIITA,DDR1,HBZ,HLA-B,HLA-C,HLA-DPA1,HLA-DPB1,HLA-DQA1,HLA-DQA2,HLA-DQB1,HLA-DQB3,HLA-DRB1,HLA-DRB3,HLA-DRB5,HLA-E,HLA-F,KIR2DL1/KIR2DL3,KLRC2,KLRD1,MHC,MHC II-β,Mhc2 Alpha,phosphatase,PTPRN,RB1,SP1,TAP2,Tap,TP53,TPTE2

Anexo 2

Pathways

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)	Ratio	Molecules
Antigen Presentation Pathway	5.15E00	8.33E-02	HLA-DRB1,TAP2,HLA-DPA1
Allograft Rejection Signaling	3.09E00	2.2E-02	HLA-DRB1,HLA-DPA1
Cytotoxic T Lymphocyte-mediated Apoptosis of Target Cells	2.96E00	2.47E-02	HLA-DRB1,HLA-DPA1
OX40 Signaling Pathway	2.9E00	2.27E-02	HLA-DRB1,HLA-DPA1
D-myo-inositol (1,4,5,6)-Tetrakisphosphate Biosynthesis	2.24E00	1.72E-02	TPTE2,ALPL
D-myo-inositol (3,4,5,6)-tetrakisphosphate Biosynthesis	2.24E00	1.72E-02	TPTE2,ALPL
3-phosphoinositide Degradation	2.13E00	1.54E-02	TPTE2,ALPL
D-myo-inositol-5-phosphate Metabolism	2.12E00	1.53E-02	TPTE2,ALPL
3-phosphoinositide Biosynthesis	2.1E00	1.42E-02	TPTE2,ALPL
Cdc42 Signaling	2.09E00	1.24E-02	HLA-DRB1,HLA-DPA1
Dendritic Cell Maturation	1.91E00	1.09E-02	HLA-DRB1,DDR1
Superpathway of Inositol Phosphate Compounds	1.9E00	1.08E-02	TPTE2,ALPL
B Cell Development	1.59E00	3.57E-02	HLA-DRB1
Complement System	1.47E00	3.45E-02	C2
Autoimmune Thyroid Disease Signaling	1.41E00	1.72E-02	HLA-DRB1
Primary Immunodeficiency Signaling	1.4E00	1.79E-02	TAP2
Graft-versus-Host Disease Signaling	1.37E00	2.27E-02	HLA-DRB1
Nur77 Signaling in T Lymphocytes	1.26E00	1.67E-02	HLA-DRB1
Calcium-induced T Lymphocyte Apoptosis	1.21E00	1.52E-02	HLA-DRB1
IL-4 Signaling	1.14E00	1.52E-02	HLA-DRB1
T Helper Cell Differentiation	1.13E00	1.47E-02	HLA-DRB1
Communication between Innate and Adaptive Immune Cells	1.12E00	1.02E-02	HLA-DRB1
CTLA4 Signaling in Cytotoxic T Lymphocytes	1.09E00	1.28E-02	HLA-DRB1
Altered T Cell and B Cell Signaling in Rheumatoid Arthritis	1.06E00	1.18E-02	HLA-DRB1
Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer Cells	1.02E00	1.16E-02	HLA-DRB1
iCOS-iCOSL Signaling in T Helper Cells	9.95E-01	9.35E-03	HLA-DRB1
Natural Killer Cell Signaling	9.9E-01	1.09E-02	KLRC2
CD28 Signaling in T Helper Cells	9.43E-01	8.55E-03	HLA-DRB1
Type I Diabetes Mellitus Signaling	9.3E-01	8.62E-03	HLA-DRB1
PKCθ Signaling in T Lymphocytes	9.3E-01	7.63E-03	HLA-DRB1
PTEN Signaling	8.97E-01	8.13E-03	DDR1
Role of NFAT in Regulation of the Immune Response	7.91E-01	5.75E-03	HLA-DRB1
NF-κB Signaling	7.68E-01	6.17E-03	DDR1
Acute Phase Response Signaling	7.3E-01	5.88E-03	C2
Protein Ubiquitination Pathway	6.45E-01	4.72E-03	TAP2
Role of Osteoblasts, Osteoclasts and Chondrocytes in Rheumatoid Arthritis	6.43E-01	4.5E-03	ALPL

Anexo 3
Functions

Category	p-value	Molecules
Cancer	1.09E-06-4.46E-02	DPYSL2,MALAT1,FOXO4,COPS2,TAL1,TRAT1,PBX1,SKP1,OLR1,BPGM,TNFRSF17,ITGB3,OCN,CXCL10,PRF1,USP53,CES1,LTF,IFI44L,mir-15,TLR1,SLC7A5,PLXNB2,BIRC3,E2F2,ALPP,SLC6A8,SMAD2,PSPH,PSMA6,mir-29,PF4,ATG4B,LCN2,EPB49,IFNGR1,IL12RB2,DDR1,ORM1,EPB42,MAP2K3,ALAS2,CFLAR,TMOD1,S100P,RAP1B,MME,CA2,SCD,ITGA2B,SERPING1,PIK3CA,CEACAM6,mir-95,ITLN1,IFIT1B,CAPZA2,CASD1,RPL7,SELENBP1,TGM2,HMOX1,CD47,CLK1,THBS1,ZNF654,MMP8,RB1CC1,RABGGTB,GSTM4,DAB2,CD177,SMOX,S100A8,CA1,ALPL,ALOX15,TUBB1,GSTM1,SLC4A1,ARHGEF12,HIP1,RPL9,CSF1R,NBR2,GPR56,WARS,CLK4,KDM5D,IGJ,FAM188A,ANXA3,FECH,SPARC,CFHR4,MAFB,CLU,NCAM1
Renal and Urological Disease	1.09E-06-4.37E-02	MME,CA2,COPS2,ITGA2B,BPGM,SELENBP1,ITGB3,TGM2,HMOX1,THBS1,GP1BA,SMOX,CA1,E2F2,GSTM1,SLC6A8,TUBB1,SLC4A1,LCN2,EPB49,IL12RB2,IFNGR1,CSF1R,EPB42,ALAS2,MAP2K3,TMOD1,CLU,S100P
Infectious Disease	2.52E-05-3.38E-02	CA2,CEACAM6,OLFM4,IFIT1B,HLA-DQB1,TNFRSF17,TGM2,CXCL10,HMOX1,CD47,TLR10,PRF1,LTF,MMP8,TLR1,GCA,BIRC3,CA1,LILRA3,E2F2,ALPP,HLA-DMA,GSTM1,CMKLR1,LCN2,IL12RB2,IFNGR1,LY96,CEACAM8,IGJ,TLR6,MAP2K3,CLU
Developmental Disorder	4.5E-05-3.38E-02	PROK2,SLC6A8,CA2,PIK3CA,SERPING1,SLC4A1,NFIX,ANK1,OCN,HMOX1,GPR56,RPS26,EPB42,SMCHD1,FECH,ALAS2,USP9Y,ALPL,CA1,TCF7L2,C2
Hematological Disease	4.5E-05-4.42E-02	ITGA2B,TAL1,PBX1,SELENBP1,ITGB3,ANK1,TGM2,CXCL10,HMOX1,CD47,PRF1,mir-15,GP1BA,GCA,BIRC3,E2F2,TUBB1,ALOX15,SLC4A1,TNFAIP6,LCN2,EPB49,IFNGR1,CSF1R,LY96,HBZ,RPS26,EPB42,ANXA3,FECH,ALAS2,C1GALT1,RHCE/RHD
Hereditary Disorder	4.5E-05-3.88E-02	CA2,PIK3CA,ITGA2B,SERPING1,BPGM,OCN,ANK1,ITGB3,HMOX1,CES1,THBS1,GP1BA,ALPL,CA1,SLC6A8,TUBB1,SLC4A1,PSPH,PF4,RAB18,HDC,LRRK2,DRD5,IFNGR1,RPIA,CSF1R,GPR56,LPAR6,EPB42,RPS26,SMCHD1,FECH,ZNF644,ALAS2,USP9Y,C2
Organismal Injury and Abnormalities	4.5E-05-4.41E-02	ABCD2,MME,CA2,SERPING1,PIK3CA,ITGA2B,NFIX,OCN,ANK1,ITGB3,TGM2,LTF,GP1BA,CA1,ALPL,BIRC3,GCA,SMAD2,TUBB1,ALOX15,SLC4A1,PF4,EPB49,LRRK2,IFNGR1,CSF1R,GPR56,LY96,HBZ,EPB42,SPARC,CLU,LRP1
Small Molecule Biochemistry	5.11E-05-3.38E-02	SCD,PIK3CA,SLC1A5,BAG6,EXOC6,OLR1,ITGB3,ANK1,CXCL10,TGM2,HMOX1,CD47,THBS1,TLR1,GSTM4,SLC7A5,SMPD3,TSTA3,SLC6A8,GSTM1,ALOX15,SLC4A1,TNFAIP6,PF4,LCN2,HDC,OSBPL8,GCNT4,LY96,TLR6,PIGK,FECH,ALAS2,SLC38A5,SULT1B1
Immunological Disease	5.8E-05-4.42E-02	MME,DPYSL2,CA2,SERPING1,BAG6,HLA-DRB1,HLA-DQB1,HLA-DPA1,SELENBP1,TGM2,CXCL10,HMOX1,CD47,PRF1,LTF,mir-15,MUC21,THBS1,MMP8,GP1BA,CLEC4D,S100A8,CA1,ALPL,RPL31,E2F2,TUBB1,HLA-DMA,TNFAIP6,LCN2,GPR15,IL12RB2,IFNGR1,KEL,CSF1R,DDR1,DAXX,CEACAM8,ORM1,HIST1H3A (includes others),SUMO4,ANXA3,MS4A2,LY6G6C,TAP2,TCF7L2,C2,CLU
Cellular Assembly and Organization	1.1E-04-4.42E-02	DPYSL2,TUBB1,PIK3CA,SLC4A1,ITGA2B,NFIX,ATG4B,EPB49,HIP1,NID1,ITGB3,TNFRSF17,ANK1,ROCK1,DAXX,CD47,PRF1,THBS1,DAB2,STXBP5,RHCE/RHD,NCAM1
Hematological System Development and Function	1.28E-04-4.41E-02	RAP1B,ITGA2B,SERPING1,TAL1,PBX1,GBP5,ITGB3,OCN,TGM2,CXCL10,HMOX1,CD47,CES1,THBS1,MMP8,GP1BA,DAB2,NEDD4L,E2F2,TUBB1,SMAD2,ALOX15,CMKLR1,SLC4A1,ARHGEF12,PF4,HDC,LCN2,DRD5,LRRK2,EPB49,TREML1,IFNGR1,CSF1R,EPB42,HBZ,SPARC,RHCE/RHD,C1GALT1,CLU,LRP1,RNPEP

Inflammatory Response	1.28E-04-4.41E-02	DPYSL2,ABCD2,TAL1,HLA-DRB1,HLA-DQB1,OLR1,ITGB3,CXCL10,TLR10,PRF1,mir-15,TLR1,E2F2,ALPP,CMKLR1,TNFAIP6,mir-29,PF4,LCN2,EPB49,IFNGR1,IL12RB2,KEL,ORM1,MAP2K3,MME,RAP1B,SCD,CA2,ITGA2B,SELENBP1,TGM2,HMOX1,CD47,THBS1,MMP8,GP1BA,DAB2,S100A8,CA1,HLA-DMA,ALOX15,TUBB1,SLC4A1,HDC,DRD5,LRRK2,TREML1,CSF1R,IL18RAP,LY96,HBZ,TLR6,ANXA3,MS4A2,CLU
Tissue Morphology	1.28E-04-4.41E-02	ITGA2B,SERPING1,NFIX,TAL1,TRAT1,PBX1,NID1,ITGB3,TGM2,HMOX1,CD47,PRF1,THBS1,GP1BA,DAB2,ALPL,SMAD2,TUBB1,ALOX15,SLC4A1,SNX13,PF4,LCN2,EPB49,IFNGR1,TREML1,CSF1R,EPB42,HBZ,SPARC,MAFB,C1GALT1
Tissue Development	1.34E-04-4.46E-02	RAP1B,PROK2,SERPING1,ITGA2B,PIK3CA,TAL1,PBX1,OLR1,NID1,TNFRSF17,ITGB3,PKN2,CXCL10,TGM2,HMOX1,CD47,LTF,THBS1,GP1BA,DAB2,S100A8,ALPL,TSTA3,SMAD2,SLC4A1,SNX13,PIGF,PF4,HDC,EPB49,TREML1,MYOF,CSF1R,DDR1,ROCK1,SPARC,MAP2K3,RHCE/RHD,LRP1,CLU,NCAM1
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	2.2E-04-4.42E-02	RAP1B,SERPING1,ITGA2B,OLR1,NID1,TNFRSF17,ITGB3,PKN2,CXCL10,TGM2,CD47,LTF,THBS1,GP1BA,SLC7A5,DAB2,S100A8,BIRC3,TSTA3,ALOX15,HLA-DMA,SLC4A1,PF4,EPB49,DDR1,IL18RAP,LY96,SPARC,RHCE/RHD,CLU,LRP1,NCAM1
Reproductive System Development and Function	2.2E-04-2.26E-02	ITGA2B,NFIX,LTF,THBS1,PF4,GP1BA,HIP1,OLR1,CLU,ITGB3
Endocrine System Disorders	2.77E-04-4.4E-02	FOXO4,COPS2,HLA-DQB1,SKP1,ITGB3,OCLN,PRF1,MUC21,mir-15,E2F2,mir-29,LCN2,IFNGR1,DDR1,HIST1H3A (includes others),LY6G6C,TAP2,S100P,CA2,PROK2,SCD,ITGA2B,SERPING1,PIK3CA,CEACAM6,BAG6,ITLN1,IFIT1B,HLA-DPA1,TGM2,HMOX1,THBS1,DAB2,S100A8,CA1,ALOX15,HLA-DMA,TUBB1,GSTM1,SLC4A1,JAZF1,DRD5,CSF1R,SUMO4,IGF2BP2,SPARC,USP9Y,CLU,TCF7L2,NCAM1
Gastrointestinal Disease	2.77E-04-4.4E-02	SCD,CA2,COPS2,PIK3CA,ITGA2B,CEACAM6,BAG6,CASD1,HLA-DQB1,OLR1,HLA-DPA1,TNFRSF17,ITGB3,CXCL10,TGM2,PRF1,CES1,THBS1,mir-15,MUC21,S100A8,SMPD3,ALPL,CA1,E2F2,ALPP,TUBB1,GSTM1,ALOX15,HLA-DMA,JAZF1,mir-29,PF4,LCN2,DRD5,IFNGR1,RPL9,CSF1R,DDR1,KDM5D,HIST1H3A (includes others),SUMO4,IGF2BP2,SPARC,LY6G6C,CFHR4,TAP2,CLU,TCF7L2,S100P
Metabolic Disease	2.77E-04-4.41E-02	MME,SCD,CA2,ITGA2B,BAG6,PBX1,HLA-DQB1,BPGM,HLA-DPA1,ITGB3,TGM2,HMOX1,PRF1,CES1,THBS1,MUC21,ALPL,CA1,E2F2,AQP7,SLC6A8,ALOX15,HLA-DMA,PSPH,SLC4A1,JAZF1,mir-29,HDC,LCN2,DRD5,IFNGR1,RPIA,DDR1,ROCK1,HIST1H3A (includes others),SUMO4,IGF2BP2,LY6G6C,FECH,ALAS2,TAP2,LRP1,TCF7L2,CLU
Cellular Function and Maintenance	3.75E-04-4.4E-02	DPYSL2,ITGA2B,PIK3CA,NFIX,CEACAM6,ANK1,ITGB3,CXCL10,TGM2,CD47,THBS1,GP1BA,TLR1,RB1CC1,DAB2,S100A8,NEDD4L,TUBB1,SLC4A1,ATG4B,LRRK2,IFNGR1,HIP1,ROCK1,HBZ,TLR6,ANXA3,CFLAR,MAFB,RHCE/RHD,LRP1,ZFYVE16
Amino Acid Metabolism	4.83E-04-3.16E-02	SLC6A8,SLC4A1,SLC1A5,SLC7A5,SLC38A5,SULT1B1
Molecular Transport	4.83E-04-4.41E-02	SLC6A8,GSTM1,SCD,ALOX15,PIK3CA,SLC4A1,SLC1A5,LCN2,ROCK1,HMOX1,LTF,SLC7A5,ALAS2,RHCE/RHD,SMPD3,SLC38A5
Carbohydrate Metabolism	5.1E-04-3.38E-02	TSTA3,CXCL10,LY96,PIK3CA,CD47,TNFAIP6,THBS1,PF4,BAG6,PIGK,HIP1,SMPD3
Cellular Compromise	5.1E-04-2.26E-02	TSTA3,DPYSL2,ALOX15,ITGA2B,PIK3CA,SLC4A1,ATG4B,EPB49,ITGB3,OCLN,TGM2,CD47,PRF1,THBS1,DAB2,SPARC,CA1,LRP1,CLU
Dental Disease	5.1E-04-2.26E-02	HDC,SMPD3,ITGB3
Drug Metabolism	5.1E-04-4.41E-02	GSTM1,HMOX1,PIK3CA,CES1,TNFAIP6,THBS1,PF4,GSTM4,SLC7A5,SMPD3

Reproductive System Disease	5.1E-04-3.44E-02	MME,CA2,PROK2,FOXO4,SERPING1,COPS2,PIK3CA,CEACAM6,ITLN1,IFI T1B,SKP1,ITGB3,OCLN,TGM2,HMOX1,IFI44L,LTF,ZNF654,mir- 15,MMP8,DAB2,S100A8,CA1,ALPL,E2F2,ALPP,TUBB1,GSTM1,LCN2,IFNG R1,CSF1R,DDR1,GPR56,ORM1,IGJ,ANXA3,SPARC,USP9Y,CLU,S100P,N CAM1
Skeletal and Muscular System Development and Function	5.1E-04-3.88E-02	ALOX15,FOXO4,IFNGR1,CSF1R,DDR1,ITGB3,ROCK1,TGM2,HMOX1,CD47 ,mir-15,THBS1,SPARC,ALPL,LRP1,CLU
Lipid Metabolism	5.89E-04-3.38E-02	SCD,LY96,CD47,BAG6,LCN2,PIGK,TLR6,TLR1,SMPD3,OLR1,ITGB3,OSBP L8
Hematopoiesis	6.23E-04-3.38E-02	RAP1B,ALOX15,SMAD2,SLC4A1,SERPING1,ITGA2B,LCN2,TAL1,PBX1,EP B49,IFNGR1,ITGB3,TGM2,CXCL10,HMOX1,CD47,EPB42,THBS1,HBZ,RHC E/RHD,E2F2
Respiratory Disease	1.17E-03-2.45E-02	MALAT1,FOXO4,CA2,COPS2,PIK3CA,HLA- DRB1,RPL7,SELENBP1,ITGB3,HMOX1,PRF1,mir- 15,THBS1,MMP8,GSTM4,RABGGTB,SLC7A5,CA1,ALPP,TUBB1,GSTM1,T NFAIP6,mir- 29,LCN2,IFNGR1,IL12RB2,RPL9,CSF1R,CLK4,FAM188A,ANXA3,MAP2K3, MAFB,CLU,S100P,NCAM1
Cardiovascular System Development and Function	1.37E-03-4.46E-02	RAP1B,FOXO4,PROK2,SERPING1,ITGA2B,COPS2,PIK3CA,TAL1,PBX1,G BP5,HLA- DQB1,OLR1,NID1,BPGM,ANK1,ITGB3,CXCL10,HMOX1,CD47,THBS1,GP1 BA,SLC7A5,DAB2,S100A8,NEDD4L,E2F2,TSTA3,ALOX15,TUBB1,GSTM1, SLC4A1,ARHGEF12,SNX13,PIGF,PF4,DRD5,LRRK2,MYOF,CSF1R,ROCK1 ,WARS,ORM1,ANXA3,SPARC,MAP2K3,C1GALT1,TMOD1,TCF7L2,LRP1,R NPEP
Neurological Disease	1.51E-03-4.01E-02	MME,FOXO4,CA2,SCD,PIK3CA,ITGA2B,SERPING1,C9orf72,ITLN1,BAG6,I FIT1B,HLA-DRB1,HLA- DQB1,OLR1,ITGB3,SELENBP1,OCLN,CXCL10,TGM2,HMOX1,CD47,RPS3 A,LTF,mir-15,GP1BA,S100A8,CA1,TUBB1,SLC6A8,ALOX15,HLA-DMA,mir- 29,HDC,LCN2,DRD5,LRRK2,NAIP,CSF1R,GPR56,LY96,SPARC,TAP2,CLU, LRP1,S100P
Psychological Disorders	1.51E-03-4.09E-02	MME,SCD,CA2,C9orf72,HLA-DRB1,HLA- DQB1,OLR1,SELENBP1,CXCL10,TGM2,HMOX1,RPS3A,mir- 15,CA1,SLC6A8,TUBB1,ALOX15,mir- 29,LCN2,DRD5,LRRK2,NAIP,CSF1R,SPARC,CLU,LRP1
Cardiovascular Disease	1.9E-03-3.38E-02	RAP1B,CA2,SCD,SERPING1,PIK3CA,ITGA2B,PBX1,OLR1,ITGB3,TGM2,C XCL10,HMOX1,PRF1,THBS1,MMP8,GP1BA,S100A8,CA1,BIRC3,ALOX15,G STM1,TUBB1,PSMA6,PF4,LCN2,DRD5,IFNGR1,CSF1R,DDR1,LY96,TPTE2 ,SPARC,LRP1,CLU,S100P
Cellular Development	1.9E-03-4.46E-02	DPYSL2,PROK2,PIK3CA,COPS2,NFIX,TAL1,ITGB3,CXCL10,TGM2,HMOX1 ,CD47,THBS1,mir- 15,DAB2,S100A8,E2F2,SMAD2,ALOX15,PF4,LRRK2,IFNGR1,MYOF,CSF1 R,DDR1,ROCK1,HBZ,SPARC,MAP2K3,CLU,LRP1
Connective Tissue Disorders	2.12E-03-3.31E-02	CA2,NFIX,BAG6,HLA-DRB1,HLA-DQB1,HLA- DPA1,SELENBP1,CXCL10,HMOX1,LTF,THBS1,mir- 15,MMP8,GP1BA,CLEC4D,S100A8,SMPD3,ALPL,RPL31,HLA- DMA,TUBB1,SMAD2,TNFAIP6,LCN2,GPR15,IFNGR1,CSF1R,DDR1,DAXX, CEACAM8,LY6G6C,SPARC,MAFB,TAP2,TCF7L2,LRP1,C2,CLU
Inflammatory Disease	2.12E-03-4.4E-02	CA2,SERPING1,NFIX,BAG6,HLA-DRB1,HLA-DQB1,HLA- DPA1,SELENBP1,TGM2,CXCL10,HMOX1,CD47,PRF1,LTF,mir- 15,THBS1,MMP8,GP1BA,CLEC4D,S100A8,CA1,ALPL,RPL31,E2F2,ALPP,T UBB1,SMAD2,HLA- DMA,ALOX15,CMKLR1,TNFAIP6,PF4,LCN2,GPR15,IL12RB2,IFNGR1,DDR 1,DAXX,CEACAM8,ANXA3,LY6G6C,SPARC,TAP2,TCF7L2,LRP1,C2,CLU

Skeletal and Muscular Disorders	2.12E-03-3.31E-02	CA2,SERPING1,NFIX,BAG6,HLA-DRB1,HLA-DQB1,HLA-DPA1,SELENBP1,CXCL10,HMOX1,CD47,LTF,mir-15,THBS1,MMP8,GP1BA,CLEC4D,S100A8,CA1,SMPD3,RPL31,ALPL,HLA-DMA,SMAD2,TUBB1,TNFAIP6,PF4,LCN2,GPR15,LRRK2,DRD5,IFNGR1,CSF1R,DDR1,DAXX,CEACAM8,SMCHD1,LY6G6C,SPARC,MAFB,TAP2,TCF7L2,LRP1,C2,CLU
Cell Morphology	2.17E-03-4.41E-02	DPYSL2,TUBB1,FOXO4,SLC4A1,ITGA2B,PIK3CA,NFIX,ATG4B,LCN2,LRRK2,EPB49,IFNGR1,CSF1R,ITGB3,ANK1,CXCL10,ROCK1,CD47,LTF,THBS1,TLR6,TLR1,RB1CC1,SPARC,DAB2,S100A8,CFLAR,ALPL
Connective Tissue Development and Function	2.17E-03-4.41E-02	ROCK1,HMOX1,FOXO4,THBS1,PBX1,DAB2,SPARC,ALPL,CSF1R,LRP1,ITGB3
Embryonic Development	2.17E-03-2.99E-02	SMAD2,NFIX,SNX13,BAG6,TAL1,PBX1,CSF1R,NRGN,ITGB3,TGM2,PKN2,DAXX,LY96,THBS1,TLR6,TLR1,TMX1,AHCTF1,SPARC,DAB2,PLXNB2,CFLAR,MAFB,BIRC3,ALPL,NCAM1
Organ Development	2.17E-03-2.71E-02	TGM2,CXCL10,PF4,SPARC,ALPL,CSF1R,ALPP,ITGB3
Organ Morphology	2.17E-03-2.71E-02	SPARC,ALPL,CSF1R,ITGB3
Organismal Development	2.17E-03-4.46E-02	RAP1B,PROK2,FOXO4,SERPING1,PIK3CA,TAL1,PBX1,HLA-DQB1,OLR1,NID1,ITGB3,TGM2,CXCL10,HMOX1,THBS1,DAB2,S100A8,ALPL,SMAD2,GSTM1,SNX13,PIGF,PF4,MYOF,CSF1R,ROCK1,WARS,ORM1,ANXA3,SPARC,MAP2K3,C1GALT1,TMOD1,TCF7L2,NCAM1
Dermatological Diseases and Conditions	2.92E-03-3.35E-02	SCD,SERPING1,TNFRSF17,CXCL10,HMOX1,CD47,PRF1,LTF,IFI44L,THBS1,MMP8,TLR1,PLXNB2,S100A8,LILRA3,GSTM1,PSMA6,TNFAIP6,LCN2,IFNGR1,DDR1,LPAR6,TLR6,ANXA3,CLU,S100P
Cell Death and Survival	2.97E-03-4.42E-02	KIR2DL1/KIR2DL3,MME,FOXO4,PROK2,PIK3CA,TAL1,ZNF429,OLR1,NRGN,TNFRSF17,ITGB3,PKN2,CXCL10,TGM2,HMOX1,PRF1,CD47,RPS3A,LTF,THBS1,mir-15,TLR1,DAB2,BIRC3,E2F2,HLA-DMA,SLC6A8,SLC4A1,mir-29,PF4,LCN2,EPB49,LRRK2,HIP1,NAIP,CSF1R,DAXX,HBZ,TLR6,TMX1,AHCTF1,SPARC,CFLAR,LRP1,CLU,S100P
Lymphoid Tissue Structure and Development	2.97E-03-2.71E-02	ALOX15,TAL1,LCN2,TRAT1,PBX1,IFNGR1,HLA-DQB1,CSF1R,ITGB3,HMOX1,CD47,PRF1,THBS1,SPARC
Tumor Morphology	2.97E-03-4.41E-02	TSTA3,MME,FOXO4,mir-29,LRRK2,IL12RB2,TNFRSF17,HMOX1,DAXX,PRF1,CD47,RPS3A,THBS1,mir-15,SPARC,CFLAR,CLU,E2F2
Cellular Movement	9.01E-03-3.88E-02	FOXO4,OLR1,OCLN,ITGB3,CXCL10,CES1,LTF,mir-15,PLXNB2,E2F2,SMAD2,CMKLR1,mir-29,PIGF,PF4,LCN2,IFNGR1,DDR1,ORM1,MAP2K3,C1GALT1,S100P,RAP1B,MME,PROK2,PIK3CA,SERPING1,NFIX,RGS18,TGM2,HMOX1,CD47,THBS1,MMP8,GP1BA,DAB2,S100A8,ARHGEF12,LRRK2,DRD5,NAIP,CSF1R,ROCK1,GPR56,WARS,ANXA3,SPARC,MAFB,CLU,LRP1,NCAM1
Renal and Urological System Development and Function	9.82E-03-2.97E-02	TGM2,LY96,THBS1,LCN2,DAB2,BIRC3,ITGB3
Endocrine System Development and Function	9.94E-03-2.26E-02	GCNT4,SULT1B1
Hepatic System Disease	1.16E-02-3.35E-02	GSTM1,CA2,SCD,PIK3CA,mir-29,PF4,CASD1,RPL9,CSF1R,OLR1,TNFRSF17,CXCL10,CES1,KDM5D,mir-15,SPARC,CFHR4,ALPL,CLU,ALPP
Hair and Skin Development and Function	1.31E-02-4.4E-02	TGM2,LY96,DAB2,BIRC3,LRP1,ITGB3
Nervous System Development and Function	1.46E-02-4.41E-02	ROCK1,DPYSL2,CD47,NFIX,PLXNB2,MAFB,NCAM1
Protein Synthesis	1.82E-02-3.38E-02	MME,ALOX15,SLC4A1,BAG6,ATG4B,OLFM4,IL12RB2,IFNGR1,SERPINB10,OLR1,TGM2,HBZ,MMP8,TMPRSS11E,RNPEP
Post-Translational Modification	1.86E-02-4.21E-02	TSTA3,MME,PROK2,ALOX15,BAG6,ATG4B,DRD5,LRRK2,SERPINB10,OLR1,TGM2,DAXX,THBS1,MMP8,TMPRSS11E,MS4A2,DAB2,MAP2K3,LRP1,GMFB,SULT1B1,RNPEP
Protein Degradation	1.86E-02-2.88E-02	TGM2,MME,ALOX15,MMP8,ATG4B,BAG6,TMPRSS11E,SERPINB10,OLR1,RNPEP

Cellular Growth and Proliferation	1.99E-02-4.41E-02	COPS2,PIK3CA,NFIX,TAL1,PBX1,TGM2,HMOX1,CD47,THBS1,mir-15,S100A8,PLXNB2,ALOX15,SMAD2,PF4,LRRK2,IFNGR1,TREML1,MYOF,CSF1R,DDR1,ROCK1,SPARC,MAFB,LRP1,CLU,NCAM1
Respiratory System Development and Function	1.99E-02-1.99E-02	HMOX1,SMAD2,NFIX,PF4
Cell Cycle	2.26E-02-3.38E-02	TAL1,PBX1,NAIP,E2F2,TNFRSF17
Cell Signaling	2.26E-02-4.21E-02	DAXX,PROK2,ALOX15,THBS1,MS4A2,DRD5,DAB2,LRRK2,MAP2K3,LRP1,GMFB
Cell-mediated Immune Response	2.26E-02-2.26E-02	OCLN
DNA Replication, Recombination, and Repair	2.26E-02-3.86E-02	DAXX,mir-15,SMOX,IFNGR1,OLR1,E2F2,CLU
Digestive System Development and Function	2.26E-02-2.47E-02	CXCL10,PF4,TCF7L2,ALPP
Free Radical Scavenging	2.26E-02-2.26E-02	CLU
Gene Expression	2.26E-02-2.26E-02	ROCK1
Hepatic System Development and Function	2.26E-02-2.47E-02	CXCL10,PF4,ALPP
Humoral Immune Response	2.26E-02-2.26E-02	TAL1
Immune Cell Trafficking	2.26E-02-3.15E-02	TGM2,CXCL10,HMOX1,SERPING1,CMKLR1,CES1,PF4,MMP8,IFNGR1,C1GALT1,CSF1R,OCLN
Nucleic Acid Metabolism	2.26E-02-2.26E-02	TSTA3,SCD
Ophthalmic Disease	2.26E-02-3.38E-02	CA2,DRD5,ZNF644,CA1,CLU
Visual System Development and Function	2.26E-02-2.26E-02	SPARC
Organismal Functions	3.51E-02-3.51E-02	ERBB2IP,LCN2,LRP1
Nutritional Disease	3.88E-02-4.09E-02	CA2,DRD5,CA1
RNA Post-Transcriptional Modification	3.88E-02-3.88E-02	CLK4,CLK1

Anexo 3

Network

ID	Molecules in Network	Score	Focus Molecules	Top Functions
1	Adaptor protein 2,ANK1,ARHGEF12,BIRC3,CA2,Calmodulin,CARM1,caspase,CF LAR,Clathrin,CLU,DAXX,EPB42,ERBB2IP,glutathione transferase,GSTM1,GSTM4,HIP1,HIST1H3A (includes others),Histone h3,Histone h4,HMOX1,ITLN1,LDL,LTf,NEDD4L,NRGN,ORM1,PLXNB2,RHC E/RHD,S100A8,SLC4A1,SMAD2,TAL1,Trk Receptor	40	26	Developmental Disorder, Hematological Disease, Hereditary Disorder
2	CD47,CMKLR1,Collagen type I,Collagen type IV,DAB2,DDR1,DPYSL2,DRD5,Fibrinogen,Focal adhesion kinase,G-protein beta,Gpcr,GPIIB- IIIA,GPR15,GPR56,GPR160,HCAR2,Immunoglobulin,Integrin,ITG A2B,ITGB3,LPAR6,LRP1,MME,MMP8,NCAM1,NID1,p85 (pik3r),PLC gamma,RB1CC1,RFWD2,SERPING1,TGM2,THBS1,TNFAIP6	36	24	Cellular Movement, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Tissue Development
3	ABCD2,AHSP,ALAS2,BPGM,CA1,CD177,COL5A2,FCER1A,GAT A1,GP9,HBA1/HBA2,Hbb-ar,Hbb- b2,HBG1,HBG2,ITGA2B,KLF1,LEPR,MS4A2,MS4A3,NFE2,PBX1 ,PF4,Rhox4b (includes others),RND3,SERPINB10,SLC4A1,SMARCB1,SMARCD3,SRF,T AL1,TCF7L2,TMOD1,Tpm4,TUBB1	22	17	Cell Death and Survival, Hematological System Development and Function, Hair and Skin Development and Function
4	ALOX15,ATG4B,CD40LG,CFB,CHI3L1,CUL4A,DIABLO,HDC,HM OX1,IER3,IFIT1B,IFNGR1,ING2,JMY,KPNA5,mir- 29,NAIP,NFIC,NFIX,NOD2,NR3C1,OLR1,PIGF,POSTN,PROK2,R AD21,RELA,S100P,STAG2,STAT3,TNFRSF10A,TNFRSF10B,TP 53,WARS	19	16	Cellular Movement, Immune Cell Trafficking, Cell Death and Survival
5	ARHGAP15,ATF4,CD74,GTF2H2,GTF2H2C,HLA-DMA,HLA- DMB,HLA-DPA1,HLA-DPB1,HLA-DQA1,HLA-DQA2,HLA- DQB1,HLA-DQB3,HLA-DRB1,HLA-DRB3,HLA-DRB5,HLA-F,Holo RNA polymerase II,HOXA3,IGJ,IL12RB2,IL18RAP,MHC,MHC Class II (complex),MHC II-β,Mhc2 Alpha,NFYB,PSPH,RRAGD,SELENBP1,SLC7A5,SMCHD1,STAT 4,TAF12,ZNF484	18	15	Endocrine System Disorders, Gastrointestinal Disease, Immunological Disease
6	ALPP,ERG,FLNC,GMFB,GNG2,GNG10,HBG1,HBG2,HBZ,HGS, HOXA9,JUN,MAFA,MAFB,MEIS2,NCAM1,OSBPL8,PARVA,PAX3 ,PAX6,PCSK2,RAP1B,RHOB,Ribosomal 40s subunit,RPS5,RPS6,RPS26,RPS27,RPS27A,RPS3A,Scg5,SNX1 3,TMX1,TSC22D3,TSPY1 (includes others)	17	14	Cellular Development, Embryonic Development, Nervous System Development and Function
7	ABCC1,AHCTF1,ANXA3,ATP11B,BAG6,CASP8AP2,CCNG2,CD C42EP3,CEACAM1,CEACAM5,CEACAM8,CEACAM,CTNNB1,ER BB2,FOXO4,Foxo,Hsp70,LEMD3,LMNA,LRRFIP1,MYOF,OLR1,O VOL1,phosphatidylserine,RAB18,Scd2,SCD,SLC1A5,SMAD4,TNF RSF17,TNIF,TRAF2,TRAF1-TRAF2-TRAF3,YWHAZ,ZFYVE16	16	14	Cell Cycle, Cancer, Developmental Disorder
8	ANKRD49,C2,C3,C1S,C2-C3- C4b,CAPZA2,CFB,CFHR4,CKS1B,CSF3,CXCL3,CXCL10,FECH, heme,HLA- A,HMOX1,ING4,KDM5D,KIAA1033,KIR2DL1/KIR2DL3,KLF5,LCN 2,LILRB2,MASP1,NFkB (complex),NFKBIA,NFKBIE,NFKBIZ,NOD2,OLFM4,Saa3,Scf Trcp beta,SKP1,SUMO4	15	14	Cellular Movement, Hematological System Development and Function, Immune Cell Trafficking

9	60S ribosomal subunit, CDK6, CTBS, DDX5, DUB, ESR1, H1F0, HBP1, IER3, KDM5A, mir-17, mir-29, miR-17-5p (and other miRNAs w/seed AAAGUGC), MYC, ORC1, PMP22, PTX3, RB1, RNU4-1, RNU4-2, RNU5A-1, RPL7, RPL9, RPL31, RRM2, snRNP, SNRPD3, SNRPN, TGM2, UCHL5, USP15, USP19, USP53, USP9Y	15	13	Cancer, Neurological Disease, Reproductive System Disease
10	ALPL, ATP1B2, CD247, CEACAM1, CEACAM6, CLASRP, CLK4, CSK, DDX3Y, DOT1L, FAM21A/FAM21C, IGF2BP2, KIR2DS4 (includes others), LDLR, MKRN1, MVP, PABPC1, PCBP1, phosphatase, PTPN1, PTPN2, PTPN11, PTPRC, PTPRN, RASA1, SIRPA, SNX27, SOCS3, TOB1, TPTE2, TRAT1, TREML1, VTRNA1-1, VTRNA1-2, VTRNA1-3	15	13	Cell Signaling, Post-Translational Modification, Cell-To-Cell Signaling and Interaction
11	AQP7, ARRB1, Bvr, CCPG1, CTTNBP2, CTTNBP2NL, EDN1, EDN2, EDN3, EPB49, EXOC6, G6PC, GCA, GMPR, JAZF1, KEL, LIMK1, LRRK2, MAP2K3, MAPK1, MKK3/6, MOB4, MST4, NKX2-3, PDCD10, PPARG, PPP2CA, PPP2R1B, SIKE1, SLMAP, STK3, STK25, STRN3, STRN, STXBP5	13	12	Carbohydrate Metabolism, Small Molecule Biochemistry, Cell Morphology
12	C9orf72, CALR, CAPRIN1, CES1, Ces, CLK1, COPS2, COPS8, E2F1, E2F2, EAPP, FAM60A, JMY, KDM5B, mir-15, mir-23, mir-26, mir-221, miR-16-5p (and other miRNAs w/seed AGCAGCA), miR-18a-5p (and other miRNAs w/seed AAGGUGC), miR-23a-3p (and other miRNAs w/seed UCACAUU), miR-26a-5p (and other miRNAs w/seed UCAAGUA), miR-27a-3p (and other miRNAs w/seed UCACAGU), NPAT, PRF1, RALGPS2, RNF144A, SMOX, SPARC, SRSF1, SRSF6, TAP2, TFDP3, Vegf, WT1	13	12	Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic System Disease
13	1,3,4,5-IP4, Actin, AGAP2, Akt, ARAF, CSF1R, FCGR2A, Gap, Gef, GNAQ, GP1BA, INPPL1, LIMK1, MRAS, MST1R, NRAS, OCLN, P110, PBK, PI3K (complex), PI3K p85, PIK3CA, PIK3CD, PIK3R3, PKN2, Profilin, RABGGTB, Rac, RAS A2, RGS18, RLF, ROCK1, RRAS2, RRAS, STK4	10	10	Cancer, Cellular Movement, Carbohydrate Metabolism
14	BTK, Calcineurin protein(s), CD14, CD44, CD14/TLR4/LY96, Defa3 (includes others), FCER1A, Fibrinogen, FN1, HMGB1, Hmgb1, HSP, HSP90B1, hyaluronic acid, IL-1R/TLR, IRAK, LBP, LY96, LYN, MYD88, PSMA6, SARM1, SFTPA1, SMPD3, TICAM1, TIRAP, TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR10, Tlr12, Tlr, TLR1-TLR2	5	6	Inflammatory Response, Lipid Metabolism, Small Molecule Biochemistry

Anexo 3

Pathway

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)	Ratio	Molecules
Allograft Rejection Signaling	3.09E00	5.49E-02	HLA-DMA,PRF1,HLA-DRB1,HLA-DQB1,HLA-DPA1
Graft-versus-Host Disease Signaling	3.09E00	1.14E-01	KIR2DL1/KIR2DL3,HLA-DMA,PRF1,HLA-DRB1,HLA-DQB1
Altered T Cell and B Cell Signaling in Rheumatoid Arthritis	3.04E00	8.24E-02	HLA-DMA,TLR10,TLR1,TLR6,HLA-DRB1,HLA-DQB1,TNFRSF17
Cytotoxic T Lymphocyte-mediated Apoptosis of Target Cells	2.81E00	6.17E-02	HLA-DMA,PRF1,HLA-DRB1,HLA-DQB1,HLA-DPA1
Communication between Innate and Adaptive Immune Cells	2.64E00	6.12E-02	CXCL10,TLR10,TLR1,TLR6,HLA-DRB1,TNFRSF17
Autoimmune Thyroid Disease Signaling	2.36E00	6.9E-02	HLA-DMA,PRF1,HLA-DRB1,HLA-DQB1
Antigen Presentation Pathway	2.36E00	1.11E-01	HLA-DMA,HLA-DRB1,TAP2,HLA-DPA1
Role of Osteoblasts, Osteoclasts and Chondrocytes in Rheumatoid Arthritis	2.32E00	4.95E-02	PIK3CA,MMP8,MAP2K3,BIRC3,NAIP,CSF1R,ALPL,LRP1,TCF7L2,IL18RAP,ITGB3
Toll-like Receptor Signaling	2.21E00	8.2E-02	TLR10,LY96,TLR1,TLR6,MAP2K3
B Cell Development	2.01E00	1.07E-01	HLA-DMA,HLA-DRB1,HLA-DQB1
T Helper Cell Differentiation	2.01E00	7.35E-02	HLA-DMA,HLA-DRB1,IFNGR1,IL12RB2,HLA-DQB1
Heme Biosynthesis II	2E00	9.09E-02	FECH,ALAS2
OX40 Signaling Pathway	1.87E00	4.55E-02	HLA-DMA,HLA-DRB1,HLA-DQB1,HLA-DPA1
IL-12 Signaling and Production in Macrophages	1.83E00	4.83E-02	ALOX15,PIK3CA,ORM1,IFNGR1,S100A8,IL12RB2,CLU
CTLA4 Signaling in Cytotoxic T Lymphocytes	1.81E00	6.41E-02	HLA-DMA,PIK3CA,TRAT1,HLA-DRB1,HLA-DQB1
Type I Diabetes Mellitus Signaling	1.69E00	5.17E-02	HLA-DMA,PRF1,HLA-DRB1,IFNGR1,MAP2K3,HLA-DQB1
GDP-L-fucose Biosynthesis I (from GDP-D-mannose)	1.65E00	1.67E-01	TSTA3
Histamine Biosynthesis	1.65E00	3.33E-01	HDC
Colorectal Cancer Metastasis Signaling	1.64E00	4.1E-02	SMAD2,TLR10,PIK3CA,MMP8,TLR1,TLR6,IFNGR1,LRP1,TCF7L2,GNG10
Dopamine Degradation	1.47E00	6.25E-02	SMOX,SULT1B1
Death Receptor Signaling	1.45E00	6.45E-02	DAXX,CFLAR,BIRC3,NAIP
iCOS-iCOSL Signaling in T Helper Cells	1.44E00	4.67E-02	HLA-DMA,PIK3CA,TRAT1,HLA-DRB1,HLA-DQB1
LXR/RXR Activation	1.41E00	4.76E-02	SCD,LY96,ORM1,S100A8,CLU,IL18RAP
IL-4 Signaling	1.4E00	6.06E-02	HLA-DMA,PIK3CA,HLA-DRB1,HLA-DQB1
Granzyme A Signaling	1.36E00	1.11E-01	H1FO,PRF1
Spermine and Spermidine Degradation I	1.35E00	8.33E-02	SMOX
Melatonin Degradation II	1.35E00	9.09E-02	SMOX
EIF2 Signaling	1.32E00	3.93E-02	PIK3CA,RPS27,RPS3A,RPS26,RPL9,RPL31,RPL7
Uracil Degradation II (Reductive)	1.18E00	1E-01	DPYSL2
Heme Degradation	1.18E00	1E-01	HMOX1
Heme Biosynthesis from Uroporphyrinogen-III I	1.18E00	1E-01	FECH
Thymine Degradation	1.18E00	1E-01	DPYSL2
Rapoport-Luebering Glycolytic Shunt	1.18E00	1.25E-01	BPGM
Clathrin-mediated Endocytosis Signaling	1.16E00	4.05E-02	PIK3CA,ORM1,DAB2,S100A8,HIP1,CLU,ITGB3
Nur77 Signaling in T Lymphocytes	1.14E00	5E-02	HLA-DMA,HLA-DRB1,HLA-DQB1
Protein Ubiquitination Pathway	1.13E00	3.77E-02	PSMA6,USP53,USP15,SKP1,NEDD4L,BIRC3,USP9Y,TAP2
Acute Myeloid Leukemia Signaling	1.11E00	5.19E-02	PIK3CA,MAP2K3,CSF1R,TCF7L2
Glutathione-mediated Detoxification	1.09E00	4.88E-02	GSTM1,GSTM4
Role of NFAT in Regulation of the Immune Response	1.08E00	3.45E-02	HLA-DMA,PIK3CA,MS4A2,HLA-DRB1,HLA-DQB1,GNG10
Breast Cancer Regulation by Stathmin1	1.07E00	3.78E-02	ROCK1,TUBB1,PIK3CA,ARHGEF12,RB1CC1,E2F2,GNG10
Phosphatidylethanolamine Biosynthesis II	1.06E00	7.69E-02	PIGF

Serine Biosynthesis	1.06E00	7.69E-02	PSPH
Tetrapyrrole Biosynthesis II	1.06E00	7.69E-02	ALAS2
Pentose Phosphate Pathway (Non-oxidative Branch)	1.06E00	9.09E-02	RPIA
Molecular Mechanisms of Cancer	1.05E00	3.11E-02	RAP1B, SMAD2, DAXX, PIK3CA, ARHGEF12, MAP2K3, CFLAR, BIRC3, NAIP, LRP1, E2F2
Semaphorin Signaling in Neurons	1.05E00	6.38E-02	ROCK1, DPYSL2, ARHGEF12
Cdc42 Signaling	1.03E00	3.11E-02	HLA-DMA, HLA-DRB1, HLA-DQB1, EXOC6, HLA-DPA1
Calcium-induced T Lymphocyte Apoptosis	1E00	4.55E-02	HLA-DMA, HLA-DRB1, HLA-DQB1
Xenobiotic Metabolism Signaling	9.99E-01	3.14E-02	HMOX1, GSTM1, PIK3CA, CES1, GSTM4, MAP2K3, SMOX, SULT1B1
NF-κB Signaling	9.86E-01	3.7E-02	TLR10, PIK3CA, TLR1, TLR6, DDR1, TNFRSF17
Induction of Apoptosis by HIV1	9.47E-01	5.08E-02	DAXX, BIRC3, NAIP
Antiproliferative Role of Somatostatin Receptor 2	9.47E-01	4.69E-02	RAP1B, PIK3CA, GNG10
Antiproliferative Role of TOB in T Cell Signaling	9.34E-01	7.69E-02	SMAD2, SKP1
Complement System	9.34E-01	6.9E-02	SERPING1, C2
TREM1 Signaling	9.1E-01	4.35E-02	TLR10, TLR1, TLR6
TNFR2 Signaling	9.07E-01	6.06E-02	BIRC3, NAIP
Superpathway of Serine and Glycine Biosynthesis I	8.92E-01	5.56E-02	PSPH
Role of Macrophages, Fibroblasts and Endothelial Cells in Rheumatoid Arthritis	8.66E-01	2.88E-02	ROCK1, TLR10, PIK3CA, TLR1, TLR6, MAP2K3, LRP1, TCF7L2, IL18RAP
Serotonin Degradation	8.56E-01	3.23E-02	SMOX, SULT1B1
Acute Phase Response Signaling	8.46E-01	3.53E-02	HMOX1, SERPING1, PIK3CA, ORM1, MAP2K3, C2
Macropinocytosis Signaling	8.43E-01	4.48E-02	PIK3CA, CSF1R, ITGB3
Inhibition of Angiogenesis by TSP1	8.33E-01	5.41E-02	CD47, THBS1
Pentose Phosphate Pathway	8.29E-01	5E-02	RPIA
Colanic Acid Building Blocks Biosynthesis	8.29E-01	3.45E-02	TSTA3
Sphingomyelin Metabolism	8.29E-01	6.67E-02	SMPD3
Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages	8.18E-01	3.12E-02	RAP1B, PIK3CA, ORM1, IFNGR1, S100A8, CLU
CD28 Signaling in T Helper Cells	8.09E-01	3.42E-02	HLA-DMA, PIK3CA, HLA-DRB1, HLA-DQB1
IL-10 Signaling	7.97E-01	4.17E-02	HMOX1, MAP2K3, IL18RAP
Gαq Signaling	7.94E-01	3.29E-02	ROCK1, HMOX1, PIK3CA, RGS18, GNG10
TWEAK Signaling	7.88E-01	5.26E-02	BIRC3, NAIP
NGF Signaling	7.85E-01	3.7E-02	RAP1B, ROCK1, PIK3CA, SMPD3
Airway Pathology in Chronic Obstructive Pulmonary Disease	7.76E-01	1.11E-01	MMP8
Pathogenesis of Multiple Sclerosis	7.76E-01	1.25E-01	CXCL10
Oleate Biosynthesis II (Animals)	7.76E-01	6.25E-02	SCD
Phenylalanine Degradation IV (Mammalian, via Side Chain)	7.76E-01	2.94E-02	SMOX
PKCθ Signaling in T Lymphocytes	7.74E-01	3.05E-02	HLA-DMA, PIK3CA, HLA-DRB1, HLA-DQB1
Docosahexaenoic Acid (DHA) Signaling	7.67E-01	4.65E-02	ALOX15, PIK3CA
LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function	7.66E-01	2.99E-02	GSTM1, LY96, GSTM4, SMOX, SULT1B1, IL18RAP
Dendritic Cell Maturation	7.55E-01	2.72E-02	HLA-DMA, PIK3CA, HLA-DRB1, HLA-DQB1, DDR1
PEDF Signaling	7.54E-01	4.17E-02	ROCK1, PIK3CA, CFLAR
Pancreatic Adenocarcinoma Signaling	7.41E-01	3.57E-02	SMAD2, HMOX1, PIK3CA, E2F2
IL-17 Signaling	7.4E-01	4.41E-02	CXCL10, PIK3CA, MAP2K3
Superpathway of Melatonin Degradation	7.27E-01	2.78E-02	SMOX, SULT1B1
Reelin Signaling in Neurons	7.13E-01	4.29E-02	PIK3CA, ARHGEF12, ITGB3
Inhibition of Matrix Metalloproteases	6.91E-01	5E-02	MMP8, LRP1
Putrescine Degradation III	6.89E-01	4E-02	SMOX
IL-6 Signaling	6.69E-01	3.51E-02	PIK3CA, TNFAIP6, MAP2K3, IL18RAP
P2Y Purigenic Receptor Signaling Pathway	6.6E-01	3.1E-02	PIK3CA, ITGA2B, GNG10, ITGB3
Choline Biosynthesis III	6.52E-01	5.26E-02	HMOX1

Tryptophan Degradation X (Mammalian, via Tryptamine)	6.52E-01	4E-02	SMOX
Thyroid Cancer Signaling	6.4E-01	4.76E-02	CXCL10,TCF7L2
Granulocyte Adhesion and Diapedesis	6.27E-01	3.07E-02	CXCL10,MMP8,PF4,IL18RAP,ITGB3
Ephrin A Signaling	6.25E-01	4.44E-02	ROCK1,PIK3CA
Atherosclerosis Signaling	6.23E-01	3.12E-02	ALOX15,ORM1,S100A8,CLU
iNOS Signaling	6.09E-01	3.77E-02	LY96,IFNGR1
Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer Cells	6.07E-01	3.49E-02	KIR2DL1/KIR2DL3,PRF1,HLA-DRB1
Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Viruses	5.97E-01	3.26E-02	PIK3CA,TLR1,TLR6
Role of IL-17A in Psoriasis	5.89E-01	7.69E-02	S100A8
mTOR Signaling	5.76E-01	2.7E-02	HMOX1,PIK3CA,RPS27,RPS3A,RPS26
NRF2-mediated Oxidative Stress Response	5.69E-01	2.98E-02	HMOX1,GSTM1,PIK3CA,GSTM4,MAP2K3
TNFR1 Signaling	5.67E-01	3.92E-02	BIRC3,NAIP
Thyroid Hormone Metabolism II (via Conjugation and/or Degradation)	5.62E-01	2.13E-02	SULT1B1
Factors Promoting Cardiogenesis in Vertebrates	5.57E-01	3.37E-02	SMAD2,LRP1,TCF7L2
Apoptosis Signaling	5.57E-01	3.26E-02	ROCK1,BIRC3,NAIP
Natural Killer Cell Signaling	5.47E-01	3.26E-02	KIR2DL1/KIR2DL3,KIR2DS4 (includes others),PIK3CA
Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	5.4E-01	2.7E-02	TGM2,GSTM1,NFIX,GSTM4
HMGB1 Signaling	5.38E-01	3.37E-02	PIK3CA,IFNGR1,MAP2K3
RAN Signaling	5.36E-01	4.35E-02	KPNA5
Granzyme B Signaling	5.36E-01	6.67E-02	PRF1
Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling	5.33E-01	2.58E-02	PIK3CA,RPS27,RPS3A,RPS26
Role of IL-17A in Arthritis	5.28E-01	3.51E-02	PIK3CA,MAP2K3
Glioma Invasiveness Signaling	5.16E-01	3.77E-02	PIK3CA,ITGB3
Paxillin Signaling	5.11E-01	3E-02	PIK3CA,ITGA2B,ITGB3
IL-8 Signaling	5.03E-01	2.63E-02	ROCK1,HMOX1,PIK3CA,GNG10,ITGB3
Amyotrophic Lateral Sclerosis Signaling	4.94E-01	2.7E-02	PIK3CA,BIRC3,NAIP
Integrin Signaling	4.79E-01	2.7E-02	RAP1B,ROCK1,PIK3CA,ITGA2B,ITGB3
CD40 Signaling	4.71E-01	3.23E-02	PIK3CA,MAP2K3
Fc Epsilon RI Signaling	4.69E-01	2.91E-02	PIK3CA,MS4A2,MAP2K3
Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	4.63E-01	2.82E-02	SMAD2,LY96,IFNGR1,IL18RAP
Leukocyte Extravasation Signaling	4.56E-01	2.66E-02	RAP1B,ROCK1,PIK3CA,MMP8,ITGB3
Glycolysis I	4.52E-01	2.63E-02	BPGM
PXR/RXR Activation	4.5E-01	2.41E-02	GSTM1,SCD
RhoA Signaling	4.46E-01	3.06E-02	ROCK1,LPAR6,ARHGEF12
Gluconeogenesis I	4.35E-01	2.22E-02	BPGM
Cell Cycle: G1/S Checkpoint Regulation	4.21E-01	3.03E-02	SKP1,E2F2
Noradrenaline and Adrenaline Degradation	4.18E-01	2.33E-02	SMOX
Neurotrophin/TRK Signaling	4.12E-01	2.94E-02	PIK3CA,MAP2K3
CCR3 Signaling in Eosinophils	4.03E-01	2.56E-02	ROCK1,PIK3CA,GNG10
Role of JAK1, JAK2 and TYK2 in Interferon Signaling	4.02E-01	3.85E-02	IFNGR1
Role of p14/p19ARF in Tumor Suppression	4.02E-01	4E-02	PIK3CA
Gas Signaling	3.96E-01	2.59E-02	DRD5,HCAR2,GNG10
p38 MAPK Signaling	3.9E-01	2.78E-02	DAXX,MAP2K3,IL18RAP
Differential Regulation of Cytokine Production in Intestinal Epithelial Cells by IL-17A and IL-17F	3.88E-01	4.35E-02	LCN2
tRNA Charging	3.88E-01	1.52E-02	WARS
Role of MAPK Signaling in the Pathogenesis of Influenza	3.86E-01	2.99E-02	CXCL10,MAP2K3
Gα12/13 Signaling	3.83E-01	2.61E-02	ROCK1,LPAR6,PIK3CA
PTEN Signaling	3.83E-01	2.44E-02	FOXO4,PIK3CA,DDR1

Caveolar-mediated Endocytosis Signaling	3.78E-01	2.53E-02	ITGA2B,ITGB3
3-phosphoinositide Biosynthesis	3.77E-01	2.13E-02	PIK3CA,TPTE2,ALPL
Systemic Lupus Erythematosus Signaling	3.75E-01	1.88E-02	SNRPN,PIK3CA,RNU4-2,RNU5A-1
Tumoricidal Function of Hepatic Natural Killer Cells	3.74E-01	4.17E-02	PRF1
IL-17A Signaling in Gastric Cells	3.74E-01	4.17E-02	CXCL10
Estrogen-mediated S-phase Entry	3.74E-01	3.57E-02	E2F2
NF- κ B Activation by Viruses	3.62E-01	2.63E-02	PIK3CA,ITGB3
Dopamine Receptor Signaling	3.62E-01	2.35E-02	DRD5,SMOX
Phospholipase C Signaling	3.57E-01	2.14E-02	RAP1B,TGM2,HMOX1,ARHGEF12,GNG10
LPS-stimulated MAPK Signaling	3.54E-01	2.63E-02	PIK3CA,MAP2K3
Dermatan Sulfate Biosynthesis (Late Stages)	3.48E-01	2.94E-02	SULT1B1
HER-2 Signaling in Breast Cancer	3.47E-01	2.82E-02	PIK3CA,ITGB3
Ceramide Signaling	3.39E-01	2.53E-02	PIK3CA,SMPD3
G Protein Signaling Mediated by Tubby	3.36E-01	2.5E-02	GNG10
Serotonin Receptor Signaling	3.36E-01	2.38E-02	SMOX
eNOS Signaling	3.36E-01	2.16E-02	AQP7,LPAR6,PIK3CA
Ephrin B Signaling	3.32E-01	2.56E-02	ROCK1,GNG10
UVA-Induced MAPK Signaling	3.32E-01	2.6E-02	PIK3CA,SMPD3
Axonal Guidance Signaling	3.3E-01	2.14E-02	RAP1B,ROCK1,DPYSL2,TUBB1,PIK3CA,ARHGEF12,MMP8,PLXNB2,GNG10
IL-9 Signaling	3.14E-01	2.86E-02	PIK3CA
Chondroitin Sulfate Biosynthesis (Late Stages)	3.14E-01	2.44E-02	SULT1B1
Interferon Signaling	3.14E-01	2.94E-02	IFNGR1
Cyclins and Cell Cycle Regulation	3.12E-01	2.35E-02	SKP1,E2F2
Relaxin Signaling	3.09E-01	2.04E-02	RAP1B,PIK3CA,GNG10
Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition Pathway	3.04E-01	2.26E-02	SMAD2,PIK3CA,MAP2K3,TCF7L2
MIF-mediated Glucocorticoid Regulation	3.03E-01	2.44E-02	LY96
Retinol Biosynthesis	3.03E-01	1.85E-02	CES1
Human Embryonic Stem Cell Pluripotency	2.99E-01	2.07E-02	SMAD2,PIK3CA,TCF7L2
Cell Cycle Regulation by BTG Family Proteins	2.94E-01	3.12E-02	E2F2
Primary Immunodeficiency Signaling	2.94E-01	1.79E-02	TAP2
FGF Signaling	2.93E-01	2.44E-02	PIK3CA,MAP2K3
Thrombin Signaling	2.87E-01	2.15E-02	ROCK1,PIK3CA,ARHGEF12,GNG10
Role of Hypercytokinemia/hyperchemokineemia in the Pathogenesis of Influenza	2.84E-01	2.56E-02	CXCL10
Melatonin Degradation I	2.84E-01	1.72E-02	SULT1B1
TR/RXR Activation	2.81E-01	2.27E-02	PIK3CA,NRGN
RANK Signaling in Osteoclasts	2.81E-01	2.3E-02	PIK3CA,BIRC3
SAPK/JNK Signaling	2.76E-01	2.15E-02	DAXX,PIK3CA
TGF- β Signaling	2.76E-01	2.33E-02	SMAD2,MAP2K3
Heparan Sulfate Biosynthesis (Late Stages)	2.75E-01	2.08E-02	SULT1B1
ErbB Signaling	2.7E-01	2.47E-02	PIK3CA,MAP2K3
Fc γ RIIB Signaling in B Lymphocytes	2.66E-01	1.92E-02	PIK3CA
April Mediated Signaling	2.66E-01	2.44E-02	TNFRSF17
IL-17A Signaling in Fibroblasts	2.66E-01	2.5E-02	LCN2
Chondroitin Sulfate Biosynthesis	2.66E-01	1.82E-02	SULT1B1
Virus Entry via Endocytic Pathways	2.59E-01	2.2E-02	PIK3CA,ITGB3
VEGF Signaling	2.59E-01	2.08E-02	ROCK1,PIK3CA
Role of PKR in Interferon Induction and Antiviral Response	2.58E-01	2.38E-02	MAP2K3
B Cell Activating Factor Signaling	2.5E-01	2.38E-02	TNFRSF17
Dermatan Sulfate Biosynthesis	2.5E-01	1.79E-02	SULT1B1
p53 Signaling	2.49E-01	2.3E-02	PIK3CA,THBS1
Bladder Cancer Signaling	2.49E-01	2.25E-02	THBS1,MMP8

MIF Regulation of Innate Immunity	2.43E-01	2.08E-02	LY96
Melanoma Signaling	2.43E-01	2.44E-02	PIK3CA
Role of IL-17F in Allergic Inflammatory Airway Diseases	2.43E-01	2.27E-02	CXCL10
Heparan Sulfate Biosynthesis	2.43E-01	1.72E-02	SULT1B1
Neuroprotective Role of THOP1 in Alzheimer's Disease	2.35E-01	1.92E-02	MME
MSP-RON Signaling Pathway	2.35E-01	2.27E-02	PIK3CA
Cell Cycle: G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation	2.35E-01	2.22E-02	SKP1
Chronic Myeloid Leukemia Signaling	2.34E-01	2E-02	PIK3CA,E2F2
IL-1 Signaling	2.34E-01	1.92E-02	MAP2K3,GNG10
Mouse Embryonic Stem Cell Pluripotency	2.29E-01	2.2E-02	PIK3CA,TCF7L2
CNTF Signaling	2.28E-01	2.08E-02	PIK3CA
Glioma Signaling	2.25E-01	1.89E-02	PIK3CA,E2F2
D-myo-inositol (1,4,5,6)-Tetrakisphosphate Biosynthesis	2.25E-01	1.72E-02	TPTE2,ALPL
D-myo-inositol (3,4,5,6)-tetrakisphosphate Biosynthesis	2.25E-01	1.72E-02	TPTE2,ALPL
UVC-Induced MAPK Signaling	2.15E-01	2.44E-02	SMPD3
Retinoic acid Mediated Apoptosis Signaling	2.03E-01	1.64E-02	CFLAR
Role of CHK Proteins in Cell Cycle Checkpoint Control	1.97E-01	2.17E-02	E2F2
Phototransduction Pathway	1.97E-01	1.72E-02	RGS9