

**ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA EM
AMOSTRAS DE LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO:
ESTUDO DA PATOGÊNESE COM ÊNFASE NO PAPEL
DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DE EPSTEIN-BARR**

ANTÔNIO HUGO JOSÉ FRÓES MARQUES CAMPOS

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente
para obtenção do título de Doutor em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Fernando Augusto Soares

Co-orientador: Dr. Luis Fernando Lima Reis

São Paulo

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Campos, Antônio Hugo José Fróes Marques

Análise do perfil de expressão gênica em amostras de linfoma de Hodgkin clássico: estudo da patogênese com ênfase no papel da infecção pelo vírus de Epstein-Barr / Antônio Hugo José Fróes

Marques Campos -- São Paulo,
2009.

108p.

Tese(doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração:

Oncologia.

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. LINFOMA DE HODGKIN. 2. EBV. 3. CÉLULAS DE REED-STERNBERG. 4. EXPRESSÃO GÊNICA/patologia.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Antônio Marques Campos** (*in memorian*) e **Leda Fróes Marques Campos**, e à minha irmã, **Anna Paula**, pelo carinho e apoio em todos os momentos.

Aos **Prof. Dr. Fernando Augusto Soares**, meu orientador, e **Prof. Dr. Luiz Fernando Lima Reis**, meu co-orientador, pela confiança em mim depositada na elaboração e condução deste projeto.

À **Dra. Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami**, pela amizade e incentivo.

À **Prof. Dra. Ana Margarida Miguel Ferreira Nogueira** (*in memorian*), pelo exemplo de competência profissional e por acreditar em minha capacidade como patologista.

A todos aqueles que fazem ou fizeram parte de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Corpo Docente da Pós-Graduação da Fundação Antônio Prudente, pelo talento em ensinar e pelo incentivo constante aos alunos da Pós-Graduação.

Aos membros da Banca de Qualificação, **Prof. Dr. José Vassallo, Profa. Dra. Giselle Walli Braga Colleoni**, pelas críticas e sugestões que em muito contribuíram para o andamento deste estudo.

Aos **funcionários da Pós-Graduação da Fundação Antônio Prudente**, pela atenção que sempre me dispensaram.

Aos colegas de trabalho do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A C Camargo, **Dr. Gilles Landman, Dr. Clóvis Antônio Lopes Pinto, Dra. Cynthia Aparecida Bueno de Osório e Dra. Isabela Werneck da Cunha**, pela compreensão e disponibilidade durante o Curso de Pós-Graduação.

A todos no Laboratório de Genômica e Biologia Molecular (particularmente às **Profa. Dra. Dirce Maria Carraro, Louise Danielle de Carvalho Motta e Eloisa Ribeiro Olivieri**) pela ajuda na extração e análise de qualidade de RNA total, assim como pelo apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todos no Laboratório de Bioinformática (particularmente à **Dra. Helena Maria Brentani** e ao estatístico **César Henrique Torres**) pelo apoio durante a análise dos dados de expressão gênica gerados durante a execução deste trabalho.

Ao **Dr. Alex Fiorini de Carvalho**, pela ajuda inestimável com os experimentos de cultivo das linhagens celulares e expressão gênica, pelo apoio e incentivo constante.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A C Camargo, em especial ao **Sr. José Ivanildo Neves, Sr. Severino da Silva Ferreira e Sr. Carlos Ferreira Nascimento**, pela competência ao me auxiliarem durante a execução deste estudo.

À funcionária do Centro de Pesquisas do Hospital A C Camargo, **Sra. Sueli Nonogaki**, pela ótima qualidade das reações imunoistoquímicas.

Aos residentes do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A C Camargo, pelo carinho e apoio.

À **Sra. Alexandra Cardoso Longo**, pela dedicação e companheirismo.

À **Sra. Hirde Contesini**, Responsável pelo Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) do Hospital do Câncer A C Camargo, e demais funcionários, pela ajuda na seleção dos prontuários.

Às funcionárias da Biblioteca, em especial a **Sra. Suely Francisco**, pelo auxílio na revisão bibliográfica e formatação deste estudo.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, que financiou a realização deste estudo (Processo 06/02183-1, Processo CEPID 98/14335-2).

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste estudo.

RESUMO

Campos AHJFM. **Análise do perfil de expressão gênica em amostras de linfoma de Hodgkin clássico: estudo da patogênese com ênfase no papel da infecção pelo vírus de Epstein-Barr.** São Paulo; 2009. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução. O linfoma de Hodgkin clássico (LHC) é uma neoplasia linfóide monoclonal caracterizada pela presença de raras células de Hodgkin e Reed-Sternberg (CHRS) em meio a um infiltrado inflamatório abundante constituído por linfócitos, eosinófilos, plasmócitos, macrófagos e neutrófilos. Aspectos específicos da patogênese desta neoplasia, particularmente as alterações que impedem a entrada das células neoplásicas em apoptose, não são ainda totalmente conhecidos. É também controverso o papel do vírus de Epstein-Barr (EBV), detectado em aproximadamente 50% dos casos. Estudos sobre a associação da presença do vírus com a evolução clínica dos pacientes são contraditórios. Entretanto, há indicações de que os casos associados à infecção por EBV apresentam uma via diferente de bloqueio de apoptose. A elucidação destas questões pode levar ao desenvolvimento e aplicação de novos tratamentos baseados na presença ou ausência da infecção pelo EBV. A utilização da técnica de expressão gênica diferencial pode trazer novos dados para esclarecer estas questões. **Objetivos.** Os objetivos deste projeto foram: 1) Analisar e comparar os padrões de expressão gênica de casos de LHC associados e não associados à infecção pelo EBV, assim como de linhagens celulares derivadas de CHRS associadas e não associadas à infecção pelo vírus. 2) Validar potenciais marcadores moleculares em séries de casos de LHC diagnosticados no Departamento de Patologia do Hospital A C Camargo, por método imunistoquímico, comparando-se sua expressão com a presença de infecção por EBV e evolução clínica dos casos estudados. **Material e métodos.** Foram utilizadas três linhagens celulares negativas para o EBV (L428, L1236 e KM-H2), uma linhagem positiva (L591) e 10 amostras de tecido fresco congelado envolvidas por LHC. Após extração de RNA total, sondas de cRNA correspondentes foram hibridizadas em lâminas contendo microarranjos

de oligonucleotídeos. Após digitalização e leitura das imagens, os dados foram submetidos à pre-análise para verificação de critérios de qualidade, e posteriormente à análise estatística bioinformática para organização dos genes diferencialmente expressos do ponto de vista funcional. Blocos de parafina contendo material conservado em formalina de 148 casos de LHC foram selecionados do arquivo do Departamento de Patologia do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital A C Camargo, São Paulo, Brasil, no período de 1970 a 2005. Foram excluídos casos com material insuficiente para realização do estudo, biópsias de recidiva e casos HIV-positivos. Após revisão histopatológica e, quando necessário, imunoistoquímica, foram submetidos a estudo imunoistoquímico utilizando anticorpos para Aurora-B, Caspase-1, Caveolina-1, CCL20, CDC2, MMP9 e LMP-1. Foi realizada ainda hibridização “in situ” com sonda contra o transcrito EBER-1 do EBV. As lâminas foram analisadas e os resultados submetidos à análise estatística. **Resultados.** Foi observada expressão diferencial de 756 genes, que após análise funcional se agruparam em diversos grupos relevantes, incluindo os grupos de genes relacionados à sinalização célula-célula, ao desenvolvimento do sistema imune, envolvidos na regulação da via de NFkB, e quimiotaxia. Alguns destes grupos foram selecionados para estudo, com posterior validação por imunoistoquímica da expressão protéica de genes selecionados (Aurora-B, Caspase-1, Caveolina-1, CCL20, CDC2 e MMP9, observadas, respectivamente, em 58,78%, 38,51%, 25,68%, 49,32%, 75,68% e 52,03% dos casos). Foi observada correlação estatisticamente significativa entre CCL20 e EBV ($p < 0,0001$). A expressão de Caspase-1 e MMP-9 pelas CHRS associou-se a pior sobrevida doença-específica de pacientes na faixa etária de 15 a 45 anos, sendo a expressão de MMP9 pelas células neoplásicas fator prognóstico independente da classificação IPS para pacientes nesta faixa etária. **Conclusões.** Os resultados do presente estudo sugerem a capacidade das CHRS de explorarem diversas vias de sinalização para alterar seu ciclo-celular e controle mitótico, assim como evadir o sistema de imunovigilância do organismo, regulando diferentes genes de acordo com o “status” de infecção por EBV. Alguns dos genes estudados, como CCL20, tem sua regulação associada especificamente a casos que apresentam infecção pelo EBV. Foi ainda observada a expressão de novas proteínas pelas CHRS, como Caspase-

1 e Caveolina-1. Em pacientes entre 15 e 45 anos de idade, a expressão de Caspase-1 e MMP9 está associada a pior sobrevida doença-específica. A expressão de MMP9 pelas células neoplásicas é fator prognóstico independente de IPS em pacientes entre 15 e 45 anos.

SUMMARY

Campos AHJFM. **[Gene expression analysis in classical Hodgkin lymphoma: a pathogenetic study emphasizing the role of Epstein-Barr virus infection]**. São Paulo; 2009. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Background. Classical Hodgkin lymphoma is a monoclonal lymphoid neoplasm whose hallmark is the Reed-Sternberg cell and its variants, which are surrounded by an inflammatory background. Although extensively studied, many aspects of its pathogenesis, especially those involving the programmed cell death pathway, are still not understood. The role of Epstein-Barr virus (EBV), which is detected in approximately 50% of Hodgkin lymphomas, is also not well established. Although data on EBV association with clinical outcome of Hodgkin lymphoma patients are controversial, some studies suggest that the cases in which EBV is detected follow a different pathway leading to apoptosis blockage. This can stimulate the search for new treatments based on the presence or absence of EBV. Studies employing differential gene expression techniques can add new information to help solving these questions. **Objective.** This study analyzed the gene expression pattern of Hodgkin cell lines and tissues involved by classical Hodgkin lymphoma, comparing the differences related to the presence or absence of Epstein-Barr virus infection. Additionally, a Tissue Microarray containing cases of classical Hodgkin lymphoma was constructed to validate the protein expression of some of the genes observed in the analysis, comparing the results with Epstein-Barr status and clinical outcome of the patients. **Materials and methods.** Three EBV-negative Hodgkin cell lines (L428, L1236 e KM-H2), one EBV-positive Hodgkin cell line (L591), and 10 classical Hodgkin lymphoma frozen tissue samples were used in the gene expression analysis study. Following total RNA extraction, cRNA probes were hybridized in oligoarray glass slides. Data from the image acquisition were submitted to quality control pre-analysis prior to bioinformatic statistical analysis for gene clustering experiments and functional analysis. Paraffin-blocks from

148 retrospective cases of classical Hodgkin Lymphoma, diagnosed between 1970 and 2005, were retrieved from the archives of the Department of Pathology. Cases without enough formalin-fixed and paraffin-embedded tissue to run the immunohistochemical (IHC) reactions, relapse biopsies and HIV-associated HL were excluded. Histological diagnosis was revised, with the use of immunostains when necessary. A tissue microarray was built and immunostains performed with antibodies against Aurora-B, Caspase-1, Caveolin-1, CCL20, CDC2, MMP9 and LMP-1. Cases were also tested for EBV using "in situ" hybridization for "EBV early RNAs" (EBER-1). The reactions were analyzed and the results submitted to statistical analysis. **Results.** We observed that 756 genes are differentially expressed between EBV-positive and EBV-negative Hodgkin cell lines. These genes are functionally related to many relevant groups, such as cell-cell signaling, immune system development, NFkB regulation and chemotaxis. Some genes belonging to these groups were selected for immunohistochemical validation (Aurora-B, Caspase-1, Caveolin-1, CCL20, CDC2 and MMP9), whose protein expression was detected in 58,78%, 38,51%, 25,68%, 49,32%, 75,68% e 52,03% of the cases, respectively. CCL20 protein expression was specifically associated with EBV-infection ($p < 0,0001$). Disease-specific survival rates of patients between 15 and 45 years who expressed Caspase-1 and MMP9 in neoplastic cells were significantly lower than those who did not express these markers. The expression of MMP9 by neoplastic cells was an independent prognostic factor in this group of patients. **Conclusions.** The results of this study suggest the ability of Hodgkin-Reed-Sternberg cells to explore different signaling pathways to control their cell-cycle and mitotic activity, as well as evade immunosurveillance, regulating different genes according to EBV infection status. CCL20 protein expression is associated with EBV infection in Hodgkin lymphoma cases. We also observed the expression of new proteins by Hodgkin-Reed-Sternberg cells, such as Caspase-1 and Caveolin-1. The expression of Caspase-1 and MMP9 by Hodgkin-Reed-Sternberg cells associates with a poor outcome in Hodgkin lymphoma patients between 15 and 45 years. MMP9 expression by neoplastic cells is an independent prognostic factor in this group of patients.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Células das linhagens L428, L581, L1236 e KM-H2 (“cell-block”).....	20
Figura 2	Exemplo de análise de qualidade do RNA (Bioanalyzer)...	23
Figura 3	Pré-análise de qualidade: “ <i>Spot finding of Four Corners</i> ”..	27
Figura 4	Pré-análise de qualidade: Distribuição espacial dos <i>outliers</i> ”.....	28
Figura 5	Pré-análise de qualidade: <i>Scatterplot</i> dos sinais dos canais R X G.....	29
Figura 6	Pré-análise de qualidade: Distribuição espacial de <i>spots</i> mais e menos expressos.....	30
Figura 7	Pré-análise de qualidade: “ <i>MA plot</i> ”.....	31
Figura 8	Pré-análise de qualidade: Estatística do sinal de RNAs controles (<i>Spike in RNAs</i>).....	32
Figura 9	Pré-análise de qualidade: Estatística do sinal de RNAs controles (<i>Spike in RNAs</i>) – regressão linear.....	32
Figura 10	Pré-análise de qualidade: Estatística do sinal de RNAs controles (<i>Spike in RNAs</i>) – sensibilidade de detecção de sinais fracos em relação ao <i>background</i>	33
Figura 11	Pré-análise de qualidade: tabela de avaliação final.....	33
Figura 12	Gráfico “DAG” para linhagens celulares (EBV-NEG>EBV-POS).....	48
Figura 13	Gráfico “DAG” para linhagens celulares (EBV-NEG<EBV-POS).....	49

Figura 14	Assinatura de expressão gênica em amostras de tecido fresco congelado.....	53
Figura 15	Gráfico “DAG” para amostras de tecido fresco congelado (EBV-NEG<EBV-POS).....	56
Figura 16	Gráfico “DAG” para amostras de tecido fresco congelado (EBV-NEG>EBV-POS).....	57
Figura 17	Lâmina de “TMA” do “set” de validação.....	62
Figura 18	Imunoistoquímica em “TMA” para LMP-1, Aurora-B e Caspase-1; Hibridização “in situ” para EBER.....	63
Figura 19	Imunoistoquímica em “TMA” para Caveolina-1, CDC2, CCL20 e MMP9.....	64
Figura 20	Curva atuarial de sobrevida doença-específica segundo a expressão dos marcadores avaliados por imunoistoquímica em “TMA”, em pacientes entre 15 e 45 anos.....	65
Figura 21	Análise multivariada de mortes relacionadas à doença (Modelo de Regressão de Cox)	65
Figura 22	Interação entre CHRS, células Treg e células TCD4+ do tipo TH2.....	68
Figura 23	Papel alternativo de SOCS3 e CBLB na patogênese do LHC.....	71
Figura 24	Papel alternativo de TLR3 na via de NFkB em LHC.....	74
Figura 25	Hipóteses para o papel de TSC22D3/GILZ na ativação de células Treg em LHC.....	78

Figura 26 Organograma exibindo a proposta inicial de estudo e as modificações realizadas no projeto

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Perfil imunistoquímico da célula neoplásicas no LHC.....	9
Tabela 2	Algumas citocinas/quimiocinas produzidas pelas CHRS...	15
Tabela 3	Características clínicas do “set” de teste (Banco de Tumores).....	21
Tabela 4	Linhagens celulares selecionadas para compor o RNA de referência.....	26
Tabela 5	Características clínicas dos pacientes no “set” de validação (TMA).....	37
Tabela 6	Marcadores avaliados no “set” de validação (TMA).....	40
Tabela 7	Vias metabólicas relevantes em relação ao conjunto de genes menos expressos na linhagem EBV-positiva (L428/L1236/KM-H2>L591).....	50
Tabela 8	Vias metabólicas relevantes em relação ao conjunto de genes mais expressos na linhagem EBV-positiva (L428/L1236/KM-H2<L591).....	51
Tabela 9	Resultado da avaliação dos marcadores no “set” de validação (TMA).....	61
Tabela 10	Correlação entre os marcadores analisados e presença de EBV.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

ABVD	Adriamicina, Bleomicina, Vinblastina e Dacarbazina
BCR	Receptor de Células B (do inglês “B-Cell Receptor”)
BEACOPP	Regime quimioterápico com sete drogas: Ciclofosfamida, Doxorubicina, Etoposide, Procarbazina, Vincristina e Bleomicina.
CHRS	Célula de Hodgkin-Reed-Sternberg
DAG	“Directed Acyclic Graph”
DH	Doença de Hodgkin
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês “Deoxyribonucleic acid”)
EBV	Vírus de Epstein-Barr (do inglês “Epstein-Barr Virus”)
EBVD	Epirubicina, Bleomicina, Vinblastina e Prednisona
ESHAP	Etoposide, Metilprednisolona, Citarabina e Cisplatina
HeE	Hematoxilina-eosina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (do inglês “Human Immunodeficiency Virus”)
IHQ	Imunoistoquímica (do inglês “Immunohistochemistry”)
ISH	Hibridização “in situ” (do inglês “in situ Hybridization”)
LH	Linfoma de Hodgkin
LHC	Linfoma de Hodgkin Clássico
LHCM	Linfoma de Hodgkin Clássico tipo Celularidade Mista
LHDL	Linfoma de Hodgkin Clássico tipo Depleção Linfocitária
LHEN	Linfoma de Hodgkin Clássico tipo Esclerose Nodular
LHPLN	Linfoma de Hodgkin Predomínio Linfocitário Nodular
LHRL	Linfoma de Hodgkin Clássico tipo Rico em Linfócitos
MOPP	Mecloretamina, Oncovin, Procarbazina e Prednisona
NEG	Negativo
OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde/World Health Organization
POS	Positivo
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês “Ribonucleic acid”)
TMA	“Tissue MicroArray”

LISTA DE SÍMBOLOS

p valor estatístico de “p”

< menor que

> maior que

= igual a

% porcentagem

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Aspectos históricos	1
1.2	Linfoma de Hodgkin clássico	3
1.2.1	Aspectos clínicos e epidemiológicos	3
1.2.2	Classificação histológica e imunofenótipo da célula neoplásica	4
1.2.3	Origem da célula neoplásica	7
1.3	Vírus de Epstein-Barr e linfoma de Hodgkin clássico	10
1.4	Microambiente e linfoma de Hodgkin clássico	13
1.5	Fatores de transcrição e linfoma de Hodgkin clássico	16
2	OBJETIVOS	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1	Linhagens celulares	19
3.2	Amostras de tecido fresco congelado	20
3.3	Extração de RNA, amplificação, síntese e marcação de cRNA	21
3.4	Hibridização em lâmina de vidro e captura dos dados	24
3.5	Pré-análise de qualidade	26
3.6	Análise matemática	34
3.7	Validação de potenciais marcadores em material embocado em parafina pela técnica de TMA e imunistoquímica (“set” de validação)	36
3.8	Análise estatística dos potenciais marcadores estudados por imunistoquímica em bloco de TMA (“set” de validação)	42
3.9	Formulação de hipóteses biológicas	43
4	RESULTADOS	44
4.1	Análise de expressão gênica	44
4.1.1	Linhagens celulares	44
4.1.2	Amostras de tecido fresco congelado	52

4.2	Validação de marcadores selecionados em TMA de LHC (“set” de validação)	58
4.2.1	Resultados por marcadores pesquisados	59
4.2.2	Correlação entre os marcadores pesquisados e infecção por EBV	60
4.2.3	Análise de sobrevida em relação aos marcadores pesquisados	60
5	DISCUSSÃO	66
5.1	Análise funcional do padrão de expressão gênica EBV-positivo e EBV-negativo, e suas implicações na patogenia do LHC	66
5.1.1	Análise em linhagens celulares	66
5.1.2	Análise em amostras de tecido fresco congelado	75
5.2	O Linfoma de Hodgkin clássico como entidade única – separação entre casos primários EBV-positivos e EBV-negativos por clusterização hierárquica	79
5.3	Validação dos marcadores moleculares por imunistoquímica	82
5.4	Análise crítica	89
6	CONCLUSÕES	94
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

ANEXOS

Anexo 1 267 genes mais expressos nas linhagens EBV-negativas

Anexo 2 489 genes mais expressos na linhagem EBV-positiva

Anexo 3 Genes diferencialmente expressos em amostras de tecido fresco congelado

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS

Em 1832, Thomas Hodgkin publica o artigo “On Some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen”.

Em 1865, Samuel Wilks publica artigo denominando a entidade como “Doença de Hodgkin” (DH).

Em 1898, Carl Sternberg publica a primeira descrição histológica detalhada da DH, posteriormente realizada de forma independente por Dorothy Reed, em 1902. As células grandes observadas nos tecidos acometidos pela doença são a partir de então denominadas células de Reed-Sternberg (a abreviação CHRS será utilizada para se referir às células citadas e sua variante, a célula de Hodgkin).

As tentativas de subclassificação da DH careciam de reprodutibilidade ou embasamento biológico até 1963, quando LUKES (1963) publica a primeira classificação amplamente aceita por patologistas e clínicos, posteriormente refinada por LUKES e BUTLER (1966), e melhorada na classificação de Rye, por LUKES e colaboradores (1966).

No final dos anos 80 e início dos anos 90, a associação entre o vírus de Epstein-Barr (EBV) e DH é confirmada através de estudos moleculares, utilizando-se as técnicas de Southern-Blot e PCR (ANAGNOSTOPOULOS et al. 1989; WEISS et al. 1989).

O tratamento do LH tem evoluído desde as décadas de 1940 e 1950, quando foram feitas as primeiras abordagens terapêuticas utilizando mostarda nitrogenada e radioterapia. A partir da década de 60, com a adoção do esquema quimioterápico MOPP (mechloretoamina, oncovin, procarbazona e prednisona), houve uma melhora dramática na sobrevida dos pacientes, seguida, entretanto, de numerosos efeitos colaterais. Regimes posteriores, como ABVD (Adriamicina, Bleomicina, Vinblastina e Dacarbazina), EBVP (Epirrubicina, Bleomicina, Vinblastina e Prednisona), Stanford IV (Doxorrubicina, Vinblastina, Mechloretoamina, Vincristina, Bleomicina, Etoposide e Prednisona) e BEACOPP (Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Etoposide, Procarbazona, Vincristina e Bleomicina) obtiveram alguma redução na incidência de efeitos colaterais, com pouca melhora nas taxas de cura. Embora os esquemas ABVD ou BEACOPP sejam os mais adotados na atualidade, continua a busca por alternativas de tratamento que minimizem a toxicidade (MAUCH et al. 1999; LIMA et al. 2006).

Finalmente, estudos moleculares, patológicos e clínicos levaram a um melhor entendimento da entidade e à necessidade de uma melhora em sua classificação. A “Classificação REAL” (HARRIS et al. 1994), seguida pela “Classificação da Organização Mundial de Saúde para Tumores dos Tecidos Linfóide e Hematopoiético” (HARRIS et al. 1999; JAFFE et al. 2001; SWERDLOW et al. 2008), dedicaram um capítulo específico à DH. Na Classificação da OMS, o termo Linfoma de Hodgkin (LH) foi adotado após estudos que comprovaram a origem das CHRS a partir de linfócitos B do centro germinativo.

1.2 LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO

Os aspectos clínicos, epidemiológicos e histopatológicos do LH são extensamente abordados em livros-texto, descrevendo-se a seguir um resumo do que pode ser encontrado na literatura atual (SCHNITZER 2007; SWERDLOW et al. 2008):

1.2.1 Aspectos clínicos e epidemiológicos

Aproximadamente 95% dos LH são representados pelo tipo clássico, que exibe um pico de incidência entre os 15-35 anos e um segundo pico após a sexta década de vida. Pacientes portadores de mononucleose infecciosa apresentam uma maior predisposição ao desenvolvimento de LHC, assim como é bem documentado o aumento de risco de desenvolvimento da doença entre membros de uma mesma família ou habitantes de uma mesma região geográfica.

Os linfonodos cervicais são preferencialmente acometidos, e a maioria dos pacientes apresenta doença localizada ao diagnóstico. O envolvimento do baço pode ocorrer em até 20% dos casos. Já o envolvimento da região mediastinal e da medula óssea é menos comum, embora possa crescer em proporção de acordo com o subtipo histológico da neoplasia (ver item 1.2.2).

Sintomas “B”, caracterizados por febre, sudorese noturna e perda de peso, são observados em até 40% dos pacientes, dependendo da população estudada.

1.2.2 Classificação histológica e imunofenótipo da célula neoplásica

A subclassificação do LHC é baseada nas características do infiltrado inflamatório e na morfologia das CHRS, identificando-se quatro subtipos histológicos:

a) **Celularidade Mista (LHCM):** corresponde a aproximadamente 25% dos casos de LHC, sendo mais freqüente no sexo masculino, em países subdesenvolvidos e em pacientes portadores do HIV. A distribuição etária bimodal não é observada neste subtipo, com idade média ao diagnóstico de 37 anos. Há acometimento preferencial de cadeias linfonodais periféricas, sendo raro o envolvimento do mediastino. Há acometimento do baço em 30% dos casos, e da medula óssea em 10% dos casos.

Morfologicamente, caracteriza-se pela presença de CHRS clássicas (células grandes, binucleadas, multinucleadas ou lobuladas, com um nucléolo proeminente circundado por um halo em cada núcleo) em um fundo inflamatório, cujo tipo celular predominante costuma variar. As **células de Hodgkin** (células mononucleares que exibem o mesmo padrão das células clássicas) também podem estar presentes. Pode-se observar fibrose intersticial, mas espessamento capsular e bandas grossas de colágeno estão ausentes (ver adiante).

b) **Esclerose Nodular (LHEN):** responde por aproximadamente 70% dos casos de LHC, acometendo preferencialmente adultos jovens, sem predileção por gênero. Há envolvimento preferencial do mediastino (80%), sendo infrequente o acometimento do baço e medula óssea.

Morfologicamente, os casos pertencentes a este subtipo caracterizam-se pela presença de variantes da CHRS chamadas **células lacunares**, assim

denominadas por serem encontradas em espaços claros ou lacunas. Estas lacunas são formadas por uma retração do citoplasma à volta do núcleo, embora alguns pontos do citoplasma possam estar ainda conectados à membrana celular. As lacunas são artefatos de fixação pelo formol. As células lacunares costumam exibir núcleo hiperlobado e nucléolo menos proeminente que o da célula clássica (algumas variantes podem ser mais pleomórficas que o usualmente observado e também exibir nucléolos proeminentes, ocasionalmente lembrando as células do linfoma anaplásico).

As células lacunares estão dispostas em meio a um infiltrado inflamatório polimórfico, em um padrão de profiliação nodular, ao qual se associa um processo fibrosante com espessamento da cápsula linfonodal e proliferação de bandas de colágeno que envolve pelo menos um dos nódulos neoplásicos.

Pode-se dividir o LHEN em graus I e II, de acordo com esquema proposto pelo *British National Lymphomas Investigation* (BENNETT et al. 1983; MACLENNAN et al. 1992), embora não haja indicação de seu uso na rotina clínica (HESS et al. 1994; VAN SPRONSEN et al. 1997). A classificação da OMS de tumores do tecido hematopoiético não preconiza sua aplicação na prática clínica, embora aprove seu uso em protocolos de pesquisa (JAFFE et al. 2001; SWERDLOW et al. 2008).

c) **Rico em Linfócitos (LHRL):** responde por uma pequena parcela dos casos de LHC, sendo mais freqüente no sexo masculino. Há envolvimento preferencial de linfonodos periféricos, sendo incomum o acometimento do mediastino. Apresenta características clínicas sobrepostas às do linfoma de

Hodgkin tipo Predomínio Linfocitário Nodular (LHPLN), exceto pela menor ocorrência de recidivas freqüentes.

Morfologicamente, caracteriza-se pela presença de áreas nodulares compostas por pequenos linfócitos, em meios aos quais se identificam CHRS diagnósticas. Alguns nódulos podem exibir centros germinativos, que são pequenos ou apresentam um aspecto regressivo. Neste caso, as CHRS são localizadas fora destes centros. Eosinófilos e/ou neutrófilos são raramente observados.

O aspecto nodular deste subtipo torna crítica a distinção entre o mesmo e o LHPLN, sendo imperativo o uso de imunistoquímica para a realização do diagnóstico (Tabela 1).

Raros casos deste subtipo apresentam padrão difuso de proliferação, no qual histiócitos são observados.

d) **Depleção Linfocitária (LHDL):** é o subtipo mais raro de LHC, respondendo por menos de 1% dos casos. Os pacientes são usualmente do sexo masculino, com média de idade 35 anos. É visto com mais freqüência em países em desenvolvimento e em pacientes portadores do HIV.

Morfologicamente, as variantes de LHDL possuem em comum um predomínio de CRS em relação ao fundo inflamatório. Alguns casos possuem CHRS intensamente pleomórficas, assemelhando-se a um sarcoma. Outros podem assemelhar-se ao LHCM, com um número maior de CHRS, ou apresentar fibrose intensa, com ou sem proliferação de fibroblastos e um número escasso de CHRS.

1.2.3 Origem da célula neoplásica

Atualmente há um consenso de que, na grande maioria dos casos, as CHRS são derivadas de uma expansão clonal de linfócitos B transformados, originados do centro germinativo (RE et al. 2005). Até a confirmação de sua derivação e natureza clonal, advogou-se sua origem a partir de macrófagos e células dendríticas, entre outros tipos celulares. O perfil imunoistoquímico incomum das células neoplásicas, com expressão de uma série de antígenos (Tabela 1), também não se assemelha ao de nenhuma célula hematopoiética normal.

Sua origem só se tornou clara após o desenvolvimento de técnicas que permitiram o isolamento de células neoplásicas de tecidos acometidos por LHC, para que se pudesse estudar sua clonalidade através de PCR para rearranjo de genes de região variável (V) da imunoglobulina (KÜPPERS et al. 1994). Mutações nestes genes são encontradas apenas em linfócitos B, e como cada linfócito é portador de uma mutação única, estudos destes genes são ideais para se investigar a derivação de uma célula a partir de células B, assim como se sua natureza é clonal. Estas mutações ocorrem nos centros germinativos de órgãos linfóides em resposta a estímulos antigênicos, por um processo denominado hipermutação somática, no qual a introdução de mutações nas regiões variáveis dos genes de imunoglobulinas assegura a geração, pelos linfócitos B, de uma miríade de anticorpos, um dos quais apresentará alta afinidade com o antígeno que está sendo apresentado. Os linfócitos que produzem anticorpos de alta afinidade são preferencialmente selecionados para sobrevivência no centro germinativo, ao passo que aqueles não-produtores são eliminados via apoptose (KÜPPERS 1999).

Inicialmente, acreditou-se que mutações defeituosas (“cripling mutations”) eram responsáveis pela incapacidade das CHRS de produzirem imunoglobulina (KÜPPERS et al. 1994; KANZLER et al. 1996a e b; KLEIN et al. 1998), fato também demonstrado pela ausência de detecção de mRNA da cadeia pesada de imunoglobulina nas CHRS (VON WASIELEWSKI et al. 1996). Estudos recentes mostraram, entretanto, que as “cripling mutations” estão ausentes em aproximadamente 75% dos casos estudados. Na maioria dos casos de LHC, a ausência de transcritos de imunoglobulina deve resultar de uma ruptura na atividade dos fatores BOB.1, OCT1, OCT2 e PU.1 (RE et al. 2001; TORLAKOVIC et al. 2001; JUNDT et al. 2002). Os fatores de transcrição OCT1, OCT2 e seu cofator, BOB.1, são necessários para a transcrição octâmero-dependente de imunoglobulina e de outros genes específicos de células B. Ao passo que OCT1 é expresso em uma grande variedade de tipos celulares, a expressão de OCT2 é restrita a células B e neurônios, sendo importante na transativação do promotor do gene de imunoglobulina (STURM et al. 1988; LATCHMAN 1996). Ambos participam no controle da transcrição de numerosos genes que codificam proteínas envolvidas na proliferação e diferenciação de linfócitos B, como CD20, CD79a, Ig e cadeia J, tendo sido observado que a ausência de OCT2 pode ser compensada por OCT1. O fator coativador BOB.1, também necessário para a atividade octamérica, tem sua expressão restrita às células B, sendo de grande importância para a indução da formação de centros germinativos (SÁEZ et al. 2002). Já PU.1 é um fator de transcrição da família *Ets*, de expressão restrita às linhagens hematopoiéticas, e de papel crítico para o desenvolvimento de células B e macrófagos. PU.1 regula a expressão de numerosos genes, que codificam proteínas necessárias

para a diferenciação de células B, como CD19, CD20, cadeia-J e imunoglobulinas Kappa e Lambda. A ausência de sua expressão leva a um bloqueio do desenvolvimento de células B (TORLAKOVIC et al. 2001; JUNDT et al. 2002).

Estas observações sugerem que as CHRS são derivadas de células B do centro germinativo, destinadas a serem eliminadas do organismo pelo processo de apoptose, tendo escapado deste destino por um evento de transformação. Pelo menos em parte dos casos de LHC, este evento parece estar ligado à infecção pelo vírus de Epstein-Barr (EBV).

Tabela 1: Perfil imunoistoquímico da célula neoplásica no LHC.

Marcador	LHC	LHPLN
CD30	positivo	raras células
CD15	positivo (1)	negativo
CD45	negativo	positivo
CD20	negativo (2)	positivo
CD79a	negativo (3)	positivo
PAX5	positivo (4)	positivo
OCT-2	negativo (5)	positivo
BOB.1	negativo (6)	positivo
CD3	negativo (7)	negativo
CD2	negativo (7)	negativo
PERFORINA/GRANZIMA/TIA-1	negativo (7)	negativo
CD43	negativo	negativo
EMA	negativo (8)	positivo (11)
ALK	negativo	negativo
LMP-1	positivo (9)	negativo
BCL-6	negativo (10)	positivo

Obs: Adaptado de Hsi (2007) e Swerdlow et al. (2008).

Abreviaturas: LHC - Linfoma de Hodgkin clássico; LHPLN - Linfoma de Hodgkin predomínio linfocitário nodular.

(1) Alguns casos são negativos.

(2) Positivo em até 40% dos casos, com intensidade variável nas células neoplásicas.

(3) Positivo em raros casos.

(4) Pode ser negativo em até 10% dos casos.

(5) Pode haver forte marcação em até 10% dos casos.

(6) Até 10% dos casos podem apresentar marcação fraca em células isoladas.

(7) Positivo em raros casos.

(8) Fraca marcação em até 5% dos casos.

(9) Positivo em até 40-50% dos casos.

(10) Ocasionalmente positivo.

(11) Em alguns casos pode ser negativo.

1.3 VÍRUS DE EPSTEIN-BARR E LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO

O EBV é um vírus amplamente disseminado na população, infectando mais de 90% dos indivíduos que chegam à idade adulta. Foi o primeiro vírus a ser associado a uma neoplasia humana, o linfoma de Burkitt (TAO et al. 1998). A descrição de partículas virais em células neoplásicas de pacientes com linfoma de Burkitt foi feita por EPSTEIN e colaboradores (1964).

O EBV pertence à família herpesvírus, sendo um vírus DNA de cadeia dupla que apresenta tropismo por linfócitos B e células epiteliais da orofaringe. A infecção dos linfócitos B é latente, não havendo replicação do vírus e morte celular. Anticorpos produzidos contra o EBV, presentes em altos títulos no soro, correlacionam-se com o diagnóstico de mononucleose infecciosa e outras neoplasias malignas além do linfoma de Burkitt, como carcinoma nasofaríngeo, linfoma de células B associado à imunossupressão e LH (HENLE et al. 1968; HENLE e HENLE 1985; ZENG 1985).

Estudos epidemiológicos e sorológicos, apoiados por estudos moleculares que demonstram a presença de DNA, RNA e proteínas do EBV em CHRS, sugerem uma associação entre infecção pelo EBV e LH (WEISS et al. 1989; HERBST et al. 1990). Atualmente, o método de detecção de RNAs codificados pelo EBV (EBER1 e EBER2) por hibridização “in situ” é considerado a técnica “padrão-ouro” para investigação da presença de EBV em amostras de tecidos acometidos por LH (KAPATAI e MURRAY 2007).

Através de hibridização “in situ” e imunoistoquímica, detecta-se EBV em amostras de LH em aproximadamente 50% dos casos, podendo aumentar a

porcentagem de casos positivos em países subdesenvolvidos ou com diferenças sócio-econômicas regionais (ABREU et al. 1997; VASSALLO 2000).

A maior parte dos casos de LHC nos quais se detecta a presença do EBV pertence às categorias *celularidade mista* (60-95%) e *esclerose nodular* (40-60%) (WEISS et al. 1989; HERBST et al. 1990; VASSALLO 2000). Além disso, há uma maior associação entre infecção pelo EBV e sexo masculino, e sintomas “B” (HUH et al. 1997; CAMPOS et al. 2009).

No LH, assim como em outros tumores associados ao EBV, o genoma viral está presente na célula neoplásica de forma latente, sendo replicado durante a divisão celular junto com os cromossomos da célula hospedeira. Durante a infecção latente, o vírus retém sua capacidade de transcrição, com diferentes padrões de expressão gênica (mais ou menos restrita) denominados “tipo de latência viral”. No LH, a infecção pelo EBV caracteriza-se por um padrão de expressão gênica de latência tipo II, com os seguintes produtos de transcrição (MIDDELDORP et al. 2003; KAPATAI e MURRAY 2007):

- a) EBERs (“EBV-encoded RNAs”): EBER1 e EBER2 são RNAs não-poliadenilados, localizados no núcleo da célula infectada, onde acredita-se participarem de “splicing” alternativo de outros transcritos virais, como EBNA e LMPs, além de induzirem a produção de IL-10, suprimirem a ação de interferon-alfa e gama (com conseqüente supressão de defesas anti-virais) e mediarem o bloqueio do processo de apoptose.
- b) EBNA1 (“EBV nuclear antigen 1”): seu transcrito codifica uma proteína nuclear envolvida na replicação e persistência do epissomo viral, além de postular-se um papel na oncogênese através da promoção de instabilidade genética.

- c) LMP1 (“Latent Membrane Protein 1”): seu produto de transcrição codifica uma proteína localizada na membrana citoplasmática da célula infectada, envolvida em numerosos eventos relacionados à oncogênese, tais como inibição da apoptose através da indução de *bcl-2*; supressão de resposta imune anti-tumoral através da indução de secreção de IL-10 pela célula infectada; ativação constitutiva de *NFκB* através de da mimetização de um receptor CD40-CD40L ativo; indução da via *JAK-STAT* através de ligação com JAK3-kinase e sinalização *ERK-MAPK*. Com relação à supressão da apoptose através da superregulação de *bcl-2*, numerosos estudos indicaram uma relação inversa entre LMP-1 e expressão da proteína *bcl-2* no LHC, sugerindo que o bloqueio da apoptose, se realizado através do aumento da proteína *bcl-2*, deve ser mediado através de outro mecanismo (KHAN et al. 1993; VASSALLO 2000; KIM et al. 2004; CAMPOS et al. 2009).
- d) LMP2a e LMP2b (Latent Membrane Protein 2a e 2b”): estas proteínas são codificadas através de “splicing” de um mRNA transcrito na formação do epissomo circular. LMP2 bloqueia e, ao mesmo tempo, mimetiza a sinalização via receptor de células B (BCR). Assim, ao mesmo tempo em que impede ou diminui a expressão de genes de linhagem do tipo B (CD19, CD20, PU.1), LMP2 induz a expressão de genes de proliferação, proteção de apoptose e supressão da resposta imune necessários à sobrevivência da célula neoplásica.
- e) BARTs (“Bam H1A rightward transcripts”): estes transcritos codificam uma proteína hipotética cuja função “in vivo” ainda não está bem

estabelecida, embora haja indicações de sua ação na manutenção da latência viral.

É interessante observar que os casos de LHC apresentam perfil morfológico e imunofenotípico aparentemente igual, independente do status de associação com infecção pelo EBV. Entretanto, um estudo epidemiológico (KEEGAN et al. 2005) sugere influência do EBV no comportamento e sobrevida de populações distintas (melhor sobrevida em pacientes jovens e pior sobrevida em pacientes em idade avançada), o que suporta a busca por um melhor entendimento da patogênese deste tumor quando associado ou não à infecção viral, para a eventual adoção de terapia específica para os casos EBV-positivos e EBV-negativos.

1.4 MICROAMBIENTE E LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO

O sistema imune humano tem como principal função neutralizar agentes infecciosos (fungos, bactérias, vírus e células infectadas por estes agentes), utilizando as mesmas estratégias para reconhecer e eliminar células cancerosas. Os dois principais tipos de vigilância empregados para este fim são a *resposta imune humoral* (que leva à produção de anticorpos capazes de reconhecer e se ligar aos antígenos exibidos pelo agente infeccioso ou célula infectada) e a *resposta imune do tipo celular* (na qual células T citotóxicas reconhecem e atacam diretamente outras células que apresentam determinados tipos de antígenos em sua superfície). Além disso, o sistema imune possui tanto um *padrão de resposta adaptativo* (no qual células dendríticas e macrófagos fagocitam a célula cancerosa, célula infecciosa ou

agente infeccioso, apresentando-os às outras células do sistema imune para que, sempre que o agente estranho for reconhecido, possa ser montada rapidamente uma resposta contra sua presença) e um *padrão de resposta inato* (no qual as células imunes, principalmente células do tipo “natural killer” são capazes de reconhecer e atacar agentes estranhos ou células cancerosas sem terem sido previamente “educadas” para esta função).

Levando isto em consideração, é intrigante o fato de que linfonodos e outros tecidos acometidos por LHC exibem uma minoria de células neoplásicas (<1% da população observada) em meio a um exuberante infiltrado inflamatório constituído por linfócitos B, linfócitos T, macrófagos, eosinófilos, mastócitos e neutrófilos e fibroblastos. Há evidências de que a formação deste infiltrado inflamatório, longe de constituir-se em uma tentativa do sistema imune em combater as CHRS, contribua para a sobrevivência e proliferação das células neoplásicas. A atração destas células inflamatórias pelas CHRS, através da produção de uma miríade de fatores (tabela 2), parece ter como objetivo modular o microambiente à sua volta para impedir seu reconhecimento e eliminação por células T citotóxicas ou células “natural killer”, além de atrair células que estimulam o desenvolvimento das CHRS (DE JONG e ENBLAD 2008; KÜPPERS 2009).

Os linfócitos TCD4+ “helper” (TH) e linfócitos T regulatórios (Treg) constituem uma grande parte do infiltrado inflamatório do LHC. Os linfócitos TH são uma classe de células responsáveis por modular o padrão de resposta imune, seja ativando linfócitos B para a produção de anticorpos (células do tipo TH2, que fazem parte do padrão de resposta tipo humoral), seja produzindo citocinas que ativam linfócitos T citotóxicos (células do tipo TH1, que fazem

parte do padrão de resposta tipo celular). Os linfócitos Treg são células imunes descritas recentemente, cuja função fisiológica é regular a atividade de células T CD8+ citotóxicas (TCD8), impedindo que estas células reconheçam antígenos exibidos por células normais do organismo. Tanto a presença de linfócitos tipo TH2 quanto linfócitos Treg no ambiente inflamatório do LHC parece estar relacionada à imunossupressão de células TCD8. As CHRS também possuem a capacidade de inibir as células TCD8 através da secreção direta de IL-10 e expressão entre PD1L (“programmed cell death 1 ligand”) e o receptor PD1, presente nas células TCD8.

Entretanto, evidências de que uma maior proporção tanto de células TH2 quanto de células Treg no infiltrado inflamatório do LHC correlaciona-se com melhor prognóstico dos pacientes, e uma maior proporção de células T citotóxicas correlaciona-se com pior prognóstico, sublinham a necessidade de um melhor entendimento dos mecanismos de interação entre as CHRS e o microambiente no qual estão imersas (KELLEY et al. 2007; SCHRECK et al. 2009).

Tabela 2: Algumas citocinas/quimiocinas produzidas pelas CHRS.

Fator	Referências
CCL-5	Maggio et al., 2002; Küppers, 2009.
CCL-13	Maggio et al., 2002
CCL-17	Maggio et al., 2002; Karube et al., 2005; Küppers, 2009.
CCL-20	Baumforth et al., 2008
CCL-22	Maggio et al., 2002; Karube et al., 2005; Küppers, 2009.
CCL-28	Küppers, 2009.
CCR-7	Karube et al., 2005.
CXCL-10	Maggio et al., 2002
CXCR-3	Karube et al., 2005.
CXCR-5	Karube et al., 2005.
IL-5	Küppers, 2009.
IL-6	Karube et al., 2005.
IL-8	Küppers, 2009.

Observação: CHRS - célula de Hodgkin-Reed-Sternberg.

Além disso, a adoção de tratamentos imunoterápicos em substituição (ou como uma alternativa) ao tratamento padrão com drogas citotóxicas e radioterapia deve levar em conta o fato de que os casos EBV-negativos não se beneficiariam de uma estratégia que estimulasse, por exemplo, células citotóxicas LMP-1 e LMP-2 específicas (BOLLARD et al. 2004), uma vez que não há evidências de que o EBV esteja envolvido na patogênese de casos que não expressam produtos gênicos deste vírus.

1.5 FATORES DE TRANSCRIÇÃO NO LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO

A regulação da expressão gênica nas CHRS, com a finalidade de sustentar sua proliferação e protegê-las do fenômeno de apoptose, está intrinsecamente ligada a anormalidades em vias de fatores de transcrição como NFkB e JAK/STAT (SWERDLOW et al. 2008).

A família de fatores de transcrição NFkB é responsável pela regulação da transcrição de numerosos genes que codificam citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão e reguladores do processo de apoptose. Em condições fisiológicas, NFkB é encontrado no citoplasma, retido por proteínas inibidoras I-kappa-B. Apenas após estimulação (por exemplo, por citocinas ou quimiocinas em resposta a um processo infeccioso) NFkB pode translocar-se para o núcleo celular e iniciar o processo de transcrição, depois que seu inibidor I-kappa-B é fosforilado por uma “kinase” (IKK) e destinado a degradação pelo sistema de proteassomo. A via de NFkB encontra-se constantemente estimulada nas CHRS, seja por alterações funcionais (estimulo

contínuo à ação de IKK por CD30, CD40, RANK e membros da família TNF), seja por alterações genômicas (mutações deletérias em membros da família I-kappa-B, amplificação do locus *c-REL* ou ainda ganhos cromossômicos ou translocação envolvendo o locus *BCL3*, cuja proteína possui similaridade estrutural às proteínas da família I-kappa-B).

Da mesma forma, a via de ativadores de transcrição e transdutores de sinal Janus kinase (JAK/STAT) parece estar intimamente envolvida na biologia das CHRS. Envolvida em cascatas de sinalização de numerosas citocinas, a via JAK/STAT opera fisiologicamente de modo semelhante à via de NFkB, onde proteínas STAT, localizadas no citoplasma, são fosforiladas por JAKs, o que permite sua translocação para o núcleo celular e início do processo de transcrição. Alterações nesta via, em CHRS (descritas até o presente momento), incluem amplificações do gene *JAK2* e mutações inativadoras do gene *SOCS1*, que codifica proteína responsável por regular a atividade de JAK.

O encontro de mais de um tipo de alteração relacionada à regulação de vias como NFkB e JAK/STAT pelas CHRS sugere a adoção, por estas células, de numerosas estratégias para manutenção da ativação destas vias, com conseqüente ativação de vias envolvidas na auto-proliferação e evasão do processo de apoptose.

2 OBJETIVOS

Este é um estudo exploratório, que teve como objetivos:

- 1) Analisar e comparar os padrões de expressão gênica de casos de LHC associados e não associados à infecção pelo EBV, assim como de linhagens celulares derivadas de CHRS associadas e não associadas a infecção pelo vírus;
- 2) Validar potenciais marcadores moleculares em séries de casos de LHC diagnosticados no Departamento de Patologia do Hospital A C Camargo, por método imunoistoquímico utilizando-se a técnica de “tissue microarray”, comparando-se sua expressão com a presença de EBV e investigando-se o impacto de sua expressão na sobrevida dos pacientes estudados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS CELULARES

Foram utilizadas três linhagens celulares negativas para o EBV (L428, L1236 e KM-H2) e uma linhagem positiva (L591), gentilmente cedidas pelo Profs. Drs. Harald Stein e Dido Lenze (Institut für Pathologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin). A linhagem L428 é derivada de efusão pleural de um paciente com LHCM (DIEHL et al. 1982). A linhagem L1236 foi estabelecida a partir do sangue periférico de um paciente com LH (KANZLER et al. 1996a). A linhagem celular KM-H2 (EBV-negativo) foi estabelecida em 1974, a partir de efusão pleural de paciente masculino, de 37 anos de idade, com LHCM, estágio IV. A linhagem L591 foi também estabelecida a partir de efusão pleural de uma paciente com LHEN (DIEHL et al. 1985).

As amostras foram mantidas em meio RPMI 1640, suplementado com FCS a 10%, L-glutamina (2mM) e solução de penicilina/estreptomicina a 1%.

Na Figura 1 podem ser visualizadas as células de cada linhagem estudada, em lâmina de “cell-block” obtido a partir de citocentrifugado dos meios de cultura.

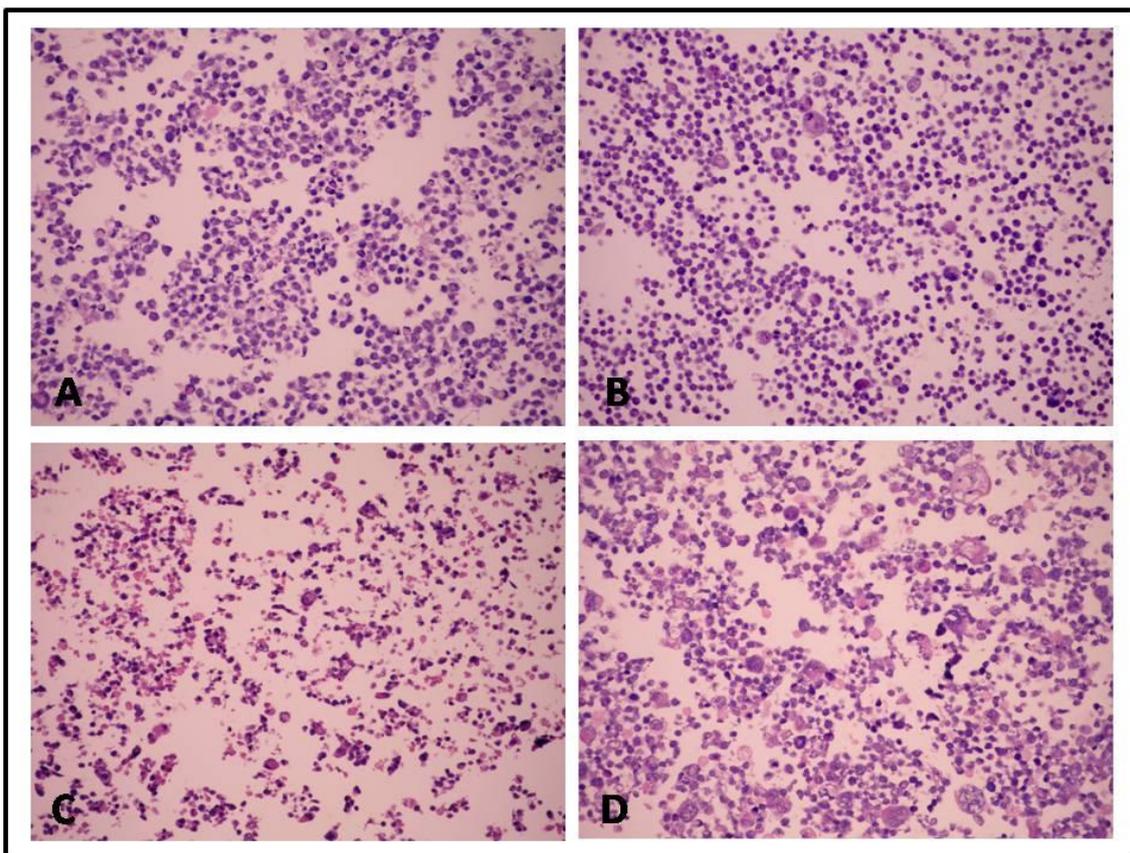


Figura 1: Fotomicrografias de lâminas de “cell-block” obtidas a partir de citocentrifugado dos meios de cultura das linhagens L428 (A), L591 (B), L1236 (C) e KM-H2 (D). H&E, 400x.

3.2 AMOSTRAS DE TECIDO FRESCO CONGELADO

Uma busca no sistema de gerenciamento do Banco de Tumores do Hospital A C Camargo identificou 23 amostras classificadas como LH. Todos os pacientes ou responsáveis assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para utilização de excedente de material biológico em pesquisa na Instituição. As amostras foram submetidas a exame de corte-congelação, confeccionando-se uma lâmina corada pela técnica de hematoxilina-eosina, para confirmação da representatividade da neoplasia. Foram ainda avaliados os respectivos blocos de parafina correspondentes ao material submetido a exame anátomo-patológico, para confirmação por

morfologia e imunoistoquímica do diagnóstico de LHC, e levantados os dados clínicos dos prontuários dos pacientes doadores. Nesta etapa, duas amostras foram excluídas do estudo: uma proveniente de paciente portador do HIV e outra correspondente a um caso de LHPLN. Após extração e análise de qualidade do RNA, 10 amostras foram selecionadas para a condução do estudo (Tabela 3).

Tabela 3: Características clínicas do “set” de teste (Banco de Tumores).

Número	Idade (anos)	Gênero	Subtipo histológico	EBV	Ann Arbor	Sintomas B	Seguimento
1	7	M	EN	POSITIVO	III	NÃO	VSD
2	46	M	CM	POSITIVO	I	NÃO	VSD
3	47	M	EN	POSITIVO	III	SIM	VSD
4	16	M	EN	POSITIVO	II	NÃO	VSD
5	77	M	EN	POSITIVO	III	SIM	VSD
6	25	F	RL	NEGATIVO	III	SIM	VSD
7	16	M	EN	NEGATIVO	II	NÃO	VSD
8	14	M	EN	NEGATIVO	III	NÃO	VSD
9	21	M	EN	NEGATIVO	II	NÃO	VSD
10	37	M	EN	NEGATIVO	I	NÃO	VSD

Abreviaturas: M- masculino; F - feminino; EN - esclerose nodular; CM - celularidade mista; RL - rico em linfócitos; VSD - vivo sem doença.

3.3 EXTRAÇÃO DE RNA, AMPLIFICAÇÃO, SÍNTESE E MARCAÇÃO DE cRNA

Para extração de RNA total, as linhagens celulares e amostras de tecido congelado foram homogeneizadas em TRIZOL (Life Technologies, EUA). O RNA foi extraído conforme instruções do fabricante e dissolvido em H₂O tratada com DEPC. A qualidade do RNA extraído foi analisada através do fracionamento eletroforético em gel de agarose 1% em condições desnaturantes ou através de eletroforese capilar utilizando o equipamento Bioanalyser 2100 (Agilent, USA). No gel de agarose, o padrão de fracionamento do RNA total foi

verificado por comparação visual e somente as amostras com relação 28S/18S maior que 1 foram utilizadas. No Bioanalyser, a integridade do RNA foi avaliada pelo Número de Integridade do RNA (do inglês RIN, “RNA Integrity Number”). Amostras de RNA degradados, parcialmente degradados ou não degradados apresentam os valores de RIN que variam em faixas de 0-5, 6-8 e 9-10 respectivamente. Foram utilizadas amostras de RNA de pacientes com RIN maior que 6 (figura 2) ou RNA obtidos de culturas de células com RIN maior que 9.

A técnica utilizada neste projeto foi modificada em relação à técnica originalmente prevista, que utilizaria lâminas contendo 4800 elementos ORESTES e obtenção de sondas de cDNA após um ciclo de amplificação do RNA total, conforme descrito por GOMES et al. (2003), seguido de síntese do cDNA marcado com nucleotídeos fluorescentes.

Na técnica substituta, foi utilizada a lâmina Agilent (*Whole Human Genome Array* 4X44K, número de catálogo G4112F), contendo 44000 oligonucleotídeos de 60 bases de comprimento, representando todo o genoma humano. Foi utilizado o *Quick Amp Labeling Kit* (Agilent – USA, número de catálogo 5190-0424) para a amplificação e marcação dos mRNAs, presentes em uma alíquota de 250 a 500 ng de RNA total isolado, tanto das linhagens celulares quanto das amostras de tecido fresco congelado.

A utilização de cRNA em substituição a cDNA obtido por transcriptase reversa tem a vantagem de preservar a orientação da fita do “template” do RNA original, uma vez que a obtenção de cDNA por transcriptase reversa pode gerar uma segunda fita de cDNA complementar, com marcação artificial de um

alvo com orientação oposta àquele da mensagem original (VERJOVSKI-ALMEIDA et al 2007).

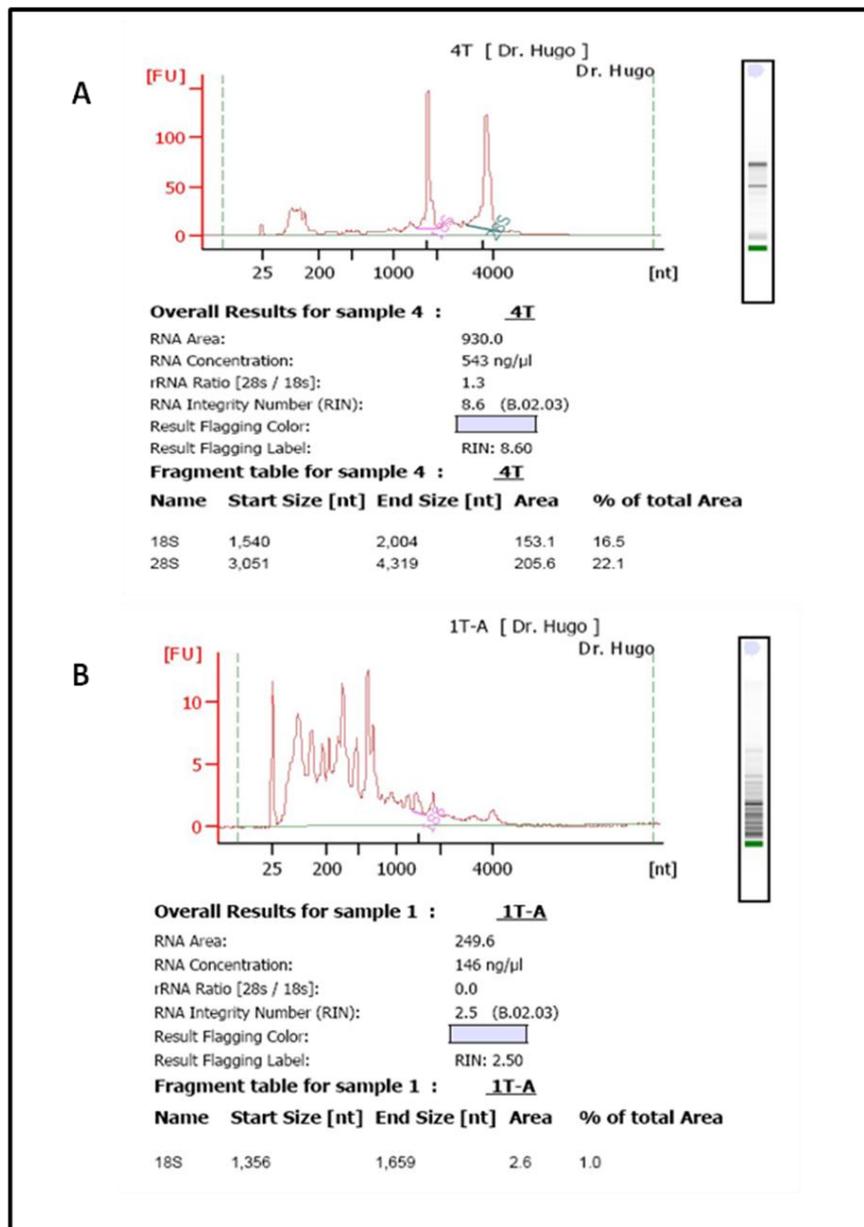


Figura 2: Exemplo de resultado de análise de qualidade fornecido para amostras do Banco de Tumores pelo equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer™. A representação é fornecida tanto por meio de dado de eletroforese quanto por meio de visualização gel-símile. Um “número de integridade de RNA” (“RNA Integrity Number” ou RIN) é também fornecido. Em uma escala até 10, a integridade do RNA é proporcional ao valor RIN obtido pelo equipamento. Assim, na parte superior da figura, observa-se a representação para um RNA intacto. Na parte inferior, representação para uma amostra com RNA parcialmente degradado.

3.4 HIBRIDIZAÇÃO EM LÂMINA DE VIDRO E CAPTURA DOS DADOS

Os *oligoarrays* foram hibridados com os alvos fluorescentes durante 17 hs à 65°C em forno de hibridização dedicado, utilizando-se tampão *Hi-RPM* (Agilent-USA). Após a hibridização, as lâminas foram processadas utilizando tampões fornecidos pelo fabricante (Agilent-USA) para eliminação de alvos não específicos e eliminação de *background*. Neste processo, as lâminas foram retiradas do suporte e lavadas por 1 min em tampão de lavagem #1 à temperatura ambiente, seguido pelo tampão #2 por 1 min, a 42°C. Em seguida, as lâminas passaram pelo processo de secagem, que consiste nas lavagens em acetonitrilo por 1 min e na Solução de Lavagem e Estabilização p/ microarrays por 1 min. Os arrays foram digitalizados com o emprego do Scanner modelo Agilent Bundle (Agilent-USA), com capacidade para 48 lâminas em resolução de 5µm.

Os dados de intensidade de cada *spot* digitalizados no *scanner* foram extraídos e pré-processados utilizando o programa *Agilent Feature Extraction* (v 10.0). Esta etapa incluiu a realização do controle de qualidade das hibridações. Também foram feitas as correções necessárias nos valores de intensidade provenientes de cada corante (usando o algoritmo *Lowess*), a fim de eliminar as diferenças de eficiência da emissão de Cy3 e Cy5; foi feita também a subtração do *background* local (valor de intensidade ao redor de cada *spot*).

No experimento de *microarray* com linhagens celulares, a linhagem EBV-positiva (L591) foi considerada como RNA de referência. No experimento

com amostras de tecido congelado, todas foram comparadas contra uma referência comum, como proposto por POLLACK (2002), de modo a permitir comparações horizontais. Assim, a expressão de cada gene de cada amostra foi calculada através da razão entre a intensidade do sinal na amostra sobre a intensidade do sinal na referência. Ao final, as amostras foram comparadas entre si através da razão das razões.

Segundo POLLACK (2002), a referência ideal seria aquela que produz um sinal mínimo em todos os elementos do *array*, além de ser facilmente produzida e reprodutível, não só no tempo, mas também em diferentes laboratórios. Dessa forma, o que mais se aproxima da referência ideal seria um *pool* de RNA de linhagens celulares, como o utilizado na Universidade de Stanford (PEROU et al. 1999, 2000; ROSS et al. 2000). No presente estudo, um novo conjunto de 15 linhagens celulares foi escolhido, tomando-se o cuidado de selecionar tipos celulares equivalentes (tabela 4). Todas as linhagens foram cultivadas no meio sugerido da *American Type Cell Collection* (ATCC, www.atcc.org), suplementados com 10% de soro fetal bovino. As linhagens foram mantidas a 37°C, na presença de 5% de CO₂, até alcançarem 80-90% de confluência, quando foi extraído o RNA total pelo método do TRIZOL. Quantidades iguais do RNA total das linhagens que compõem o RNA referência foram misturadas, aliquotadas e armazenadas a – 80°C.

Tabela 4: Linhagens celulares selecionadas para compor o RNA referência.

Linhagem	Descrição
Daudi	Linfoma de Burkitt
DLD-1	Adenocarcinoma de Cólon
DU 145	Carcinoma de Próstata
FaDu	Carcinoma Epidermóide de Faringe
GM 637	Fibroblasto Humano diplóide
H 146	Carcinoma de Pulmão
H 1080	Fibrossarcoma
HB4 α	Célula Luminal de Mama
HEK 293	Rim embrionário Humano
Jurkat	Leucemia Aguda de Células T
Saos-2	Osteossarcoma
SK-BR-3	Adenocarcinoma de Mama
SK-MEL-28	Melanoma
T24	Carcinoma de Bexiga
T98G	Glioblastoma

3.5 PRÉ-ANÁLISE DE QUALIDADE

Após a digitalização das lâminas de microarray, foi realizada pré-análise de qualidade pelo programa “Feature Extration”, através de análise de vários parâmetros exibidos pelo “QC Report”. Esta análise fornece uma indicação sobre a qualidade da hibridização, o diagnóstico das possíveis falhas e a necessidade da repetição do experimento. Alguns dos parâmetros analisados estão exemplificados a seguir:

1. **“Spot Finding of Four Corners”**: Foram visualizados os spots e os centróides ou localização nas quatro pontas do array. Se as suas localizações ficarem fora do centro em uma ou mais esquinas, deve-se iniciar a extração dos dados novamente com um novo *grid* (Figura 3).

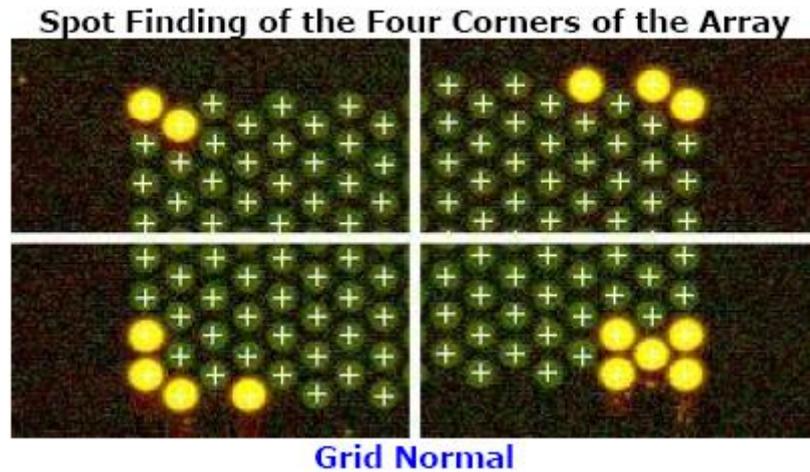


Figura 3: Pré-análise de qualidade: “Spot Finding of Four Corners”.

2. **“Outlier Stats”**: Na lâmina, são depositadas diversas réplicas do mesmo “oligo”. Os spots não uniformes ou “outliers” são determinados pela análise estatística das intensidades das réplicas de um mesmo “oligo”. Além disso, também são calculadas as regiões com background não uniforme. Uma possível causa dos “outliers” é a má localização do *grid* ou *background* excessivo na lâmina.

3. **Distribuição Espacial dos “Outliers”**: O “QC report” apresenta uma figura contendo a distribuição na lâmina da população dos “spots” de boa qualidade, dos “outliers” e do “background”. Além disso, fornece uma tabela contendo spots e genes “outliers” não uniformes em ambos os canais (Figura 4).

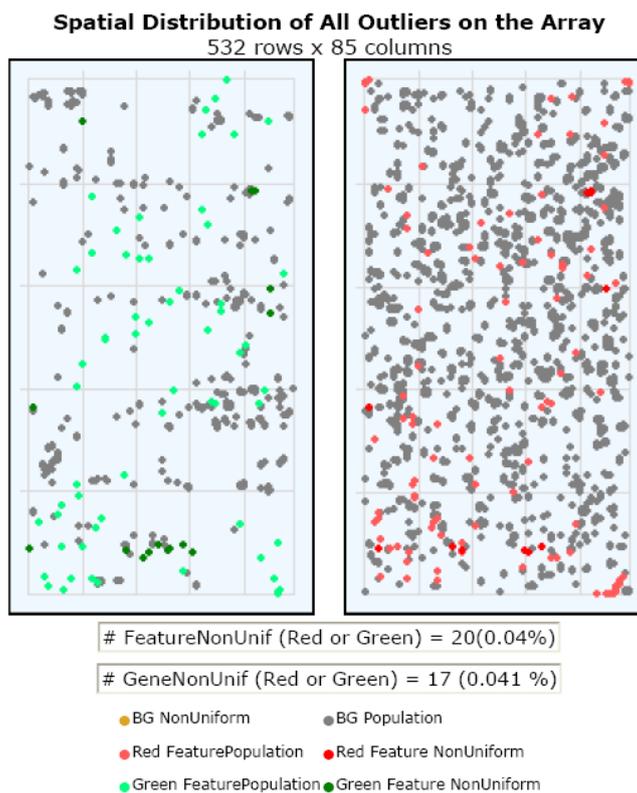


Figura 4: Pré-análise de qualidade: “Distribuição especial dos outliers”.

4. **“Scatterplot” dos sinais dos canais “Red” X “Green”:** Neste gráfico são “plotados” os dados dos canais “Red” e “Green” subtraídos do background, excetuando-se os controles. O “plot” deve ser linear. A interseção entre as linhas vermelhas vertical e horizontal mostra o valor mediano do sinal dos genes da lâmina (Figura 5).

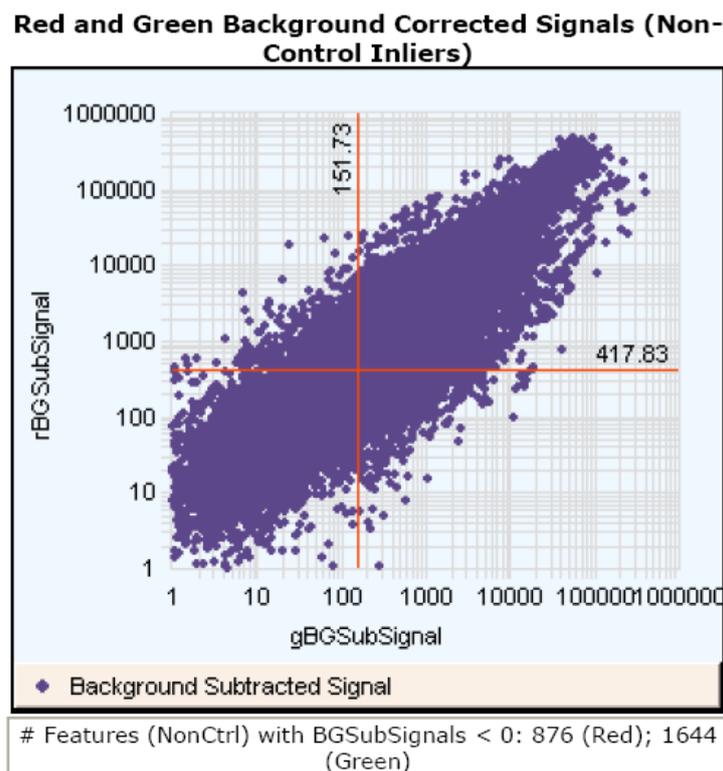


Figura 5: Pré-análise de qualidade: “Scatterplot dos sinais dos canais Red X Green”.

5. **Distribuição espacial dos “spots” mais (“Up-regulated”) e menos (“Down-regulated”) expressos:** O programa escolhe aleatoriamente 5000 spots e representa em vermelho os mais expressos e em verde os menos expressos, assim como sua distribuição ao longo da lamina. Os sinais devem estar distribuídos aleatoriamente em toda a lâmina, sendo esta distribuição importante para verificar a existência de alguma tendência para acumulação de determinado sinal (Figura 6).

Spatial Distribution of Significantly Up-Regulated and Down-Regulated Features

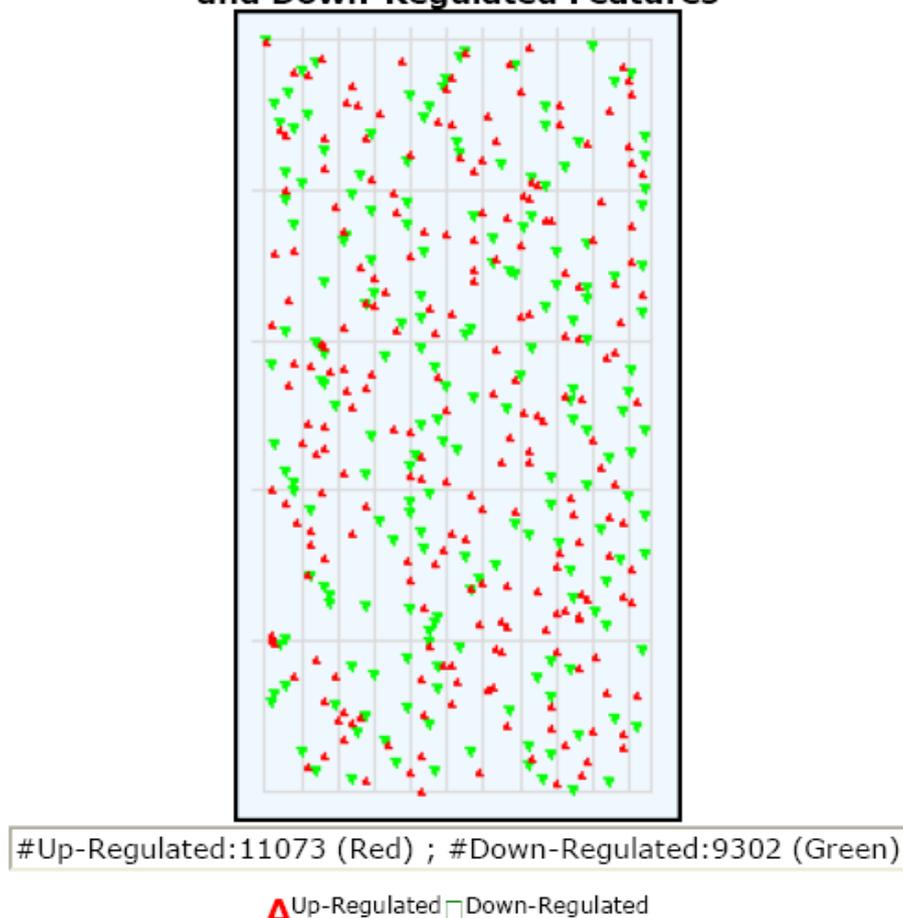


Figura 6: Pré-análise de qualidade: “*Distribuição espacial de spots mais e menos expressos*”.

6. “*Plotagem*” do Log da razão dos canais R/G versus o log do sinal (*MA plot*): O gráfico mostra, seguindo parâmetros previamente definidos pelo programa, quanto cada gene é diferencialmente expresso (vermelho= mais expresso; verde=menos expresso) e aqueles cuja expressão não é diferencial (amarelos). Os genes apresentados em azul são aqueles utilizados para a normalização dos dados (Figura 7).

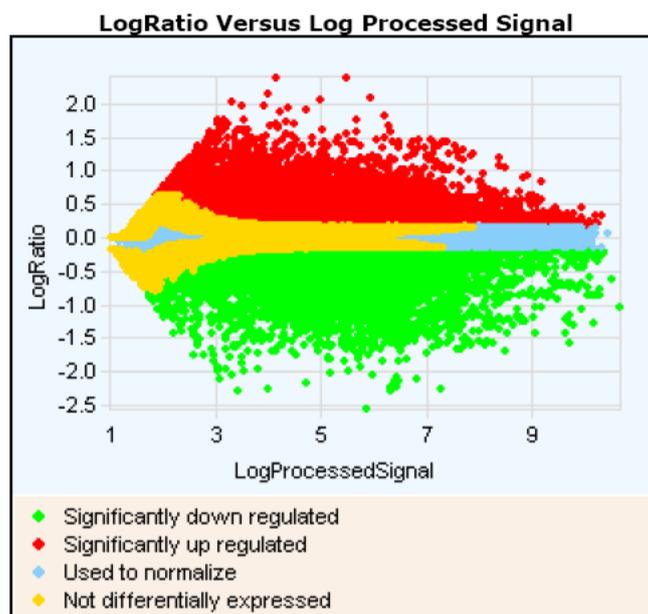


Figura 7: Pré-análise de qualidade: “MA plot”.

7. **RNAs controles ou “Spike-In” RNAs:** Durante a reação de marcação, são adicionados um conjunto de 10 diferentes mRNAs que não hibridizam com nenhum gene humano e que são denominados “Spike-Ins RNAs” ou RNAs controles. Nesta mistura de RNAs, variam-se o número de cópias ou quantidades relativas dos 10 diferentes mRNAs. A proporção entre os RNAs controles adicionados ao tubo a ser marcado pelo fluoróforo Cy3 são diferentes daqueles adicionados ao tubo marcado pelo Cy5. Na lamina estão depositadas sondas para cada um dos 10 RNAs controles, de modo que, após a hibridização, é esperado um valor de log da razão para cada um destes dez diferentes “Spike-In RNAs”. São exibidos em uma tabela (figura 8) os RNAs controles, na coluna “Exp” a razão em Log_{10} esperada e na coluna “Obs” aquela obtida no experimento. Também são apresentados o desvio padrão e o S/N (*signal to noise ratio* ou razão sinal/ruído) observados.

Agilent SpikeIns Signal Statistics				
Probe Name	Exp	Obs	SD	S/N
(+)E1A_r60_n9	-1.00	-0.59	0.01	48.07
(+)E1A_r60_a107	-0.48	-0.06	0.01	4.52
(+)E1A_r60_a135	-0.48	-0.02	0.01	1.07
(+)E1A_r60_n11	-0.48	-0.03	0.02	1.43
(+)E1A_r60_1	0.00	0.41	0.01	33.53
(+)E1A_r60_a20	0.00	0.32	0.01	30.64
(+)E1A_r60_3	0.48	0.73	0.02	37.11
(+)E1A_r60_a104	0.48	0.74	0.01	79.04
(+)E1A_r60_a97	0.48	0.82	0.07	12.42
(+)E1A_r60_a22	1.00	1.07	0.01	84.30

Figura 8: Pré-análise de qualidade: “Estatística de sinal de RNAs controles (Spike in RNAs)”.

8. Usando os dados calculados na tabela acima, o log da razão observada dos RNAs controles (Obs) é plotado contra o log da razão esperada (Exp). É feita uma análise de regressão linear e os resultados são apresentados (figura 9). Uma inclinação da reta igual à 1, interseção da reta no eixo Y em 0 e R^2 igual à 1 são os parâmetros ideais. A inclinação da reta menor que 1 indica compressão dos dados causada por contaminação pelo *background*. O coeficiente de regressão R^2 mede o ajuste da reta aos dados e reflete a reprodutibilidade do experimento.

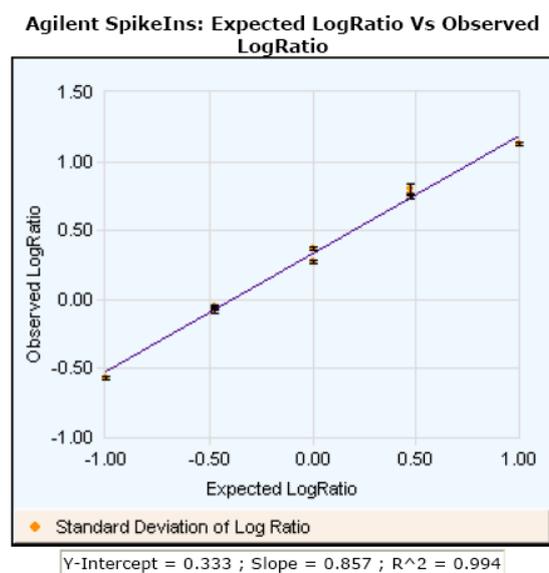


Figura 9: Pré-análise de qualidade: “Estatística de sinal de RNAs controles (Spike in RNAs) – regressão linear”.

9. A partir da hibridização dos RNAs controles, é feita uma estimativa da sensibilidade da detecção de sinais fracos em relação ao *background*. Neste cálculo (figura 10) são mostradas quantas vezes o valor dos canais verde e vermelho dos dois espécimes de RNAs controles de menor concentração é maior que o valor de “background”.

Sensitivity:Agilent SpikeIns - Ratio of Signal to Background for 2 dimmest probes			
(+E1A_r60_n11		(+E1A_r60_a97	
(g)	(r)	(g)	(r)
3.7	3.5	3.0	1.6

Figura 10: Pré-análise de qualidade: “Estatística de sinal de RNAs controles (Spike in RNAs) – sensibilidade de detecção de sinais fracos em relação ao background”.

10. **Tabela de avaliação:** Finalmente, o “QC report” mostra uma tabela de avaliação final com diversos dados importantes para se avaliar a qualidade do experimento. A Tabela (Figura 11) apresenta 5 colunas constituídas do nome da medida, o valor limite superior, valor limite inferior e se é necessário uma inspeção cuidadosa do parâmetro analisado.

Evaluation Metrics for GE2_QCMT_Feb07				
Metric Name	Value	UpLim	LowLim	IsMandatory
AnyColorPrcntBGNonUnifOL	0.02	5.00	NA	False
AnyColorPrcntFeatNonUnif...	0.06	1.00	NA	False
absE1aObsVsExpCorr	0.99	NA	0.86	False
absE1aObsVsExpSlope	0.87	NA	0.85	False
gE1aMedCVBkSubSignal	15.21	25.00	NA	False
gNegCtrlAveBGSubSig	-3.62	10.00	-20.00	False
gNegCtrlSDevBGSubSig	3.32	15.00	NA	False
gNonCntrlMedCVBkSubSignal	15.97	25.00	NA	False
rE1aMedCVBkSubSignal	14.20	25.00	NA	False
rNegCtrlAveBGSubSig	-5.35	4.00	-20.00	False
rNegCtrlSDevBGSubSig	3.39	6.00	NA	False
rNonCntrlMedCVBkSubSignal	15.67	25.00	NA	False

◆ In Normal Range ◆ Evaluate

Figura 11: Pré-análise de qualidade: “Tabela de avaliação final”.

3.6 ANÁLISE MATEMÁTICA

Todas as análises matemáticas foram realizadas pelo Laboratório de Bioinformática do Hospital A C Camargo, sob orientação da Dra. Helena Brentani, com lâminas que apresentaram qualidade satisfatória em todos os itens da pré-análise.

Os valores relativos normalizados de cada gene foram submetidos ao teste T de *Student* permutado para determinar o p valor para a expressão de cada gene individualmente nas diferentes classes analisadas. Foram submetidos à clusterização hierárquica os genes diferencialmente expressos em pelo menos 2 vezes e com os valores de $p < 0,01$. Nos clusters, o degradê de cores entre verde e vermelho representa o nível de expressão de um determinado gene para uma determinada amostra, sendo os genes superexpressos representados em vermelho e os pouco expressos, em verde.

Posteriormente, foi utilizada a ferramenta de bioinformática WebGestalt (WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit), um sistema que possibilita a organização, visualização, análise estatística e interpretação de uma grande quantidade de genes (ZHANG et al. 2005). Com o auxílio desta ferramenta, os genes diferencialmente expressos foram analisados do ponto de vista funcional. Esta análise foi realizada porque, uma vez que um processo biológico é regulado por um grupo de genes (e não apenas por um gene isolado), a identificação de grupos de genes anormalmente expressos tem maior possibilidade de identificar os processos biológicos com maior potencial de participação na patogênese do LHC. Foram utilizadas as seguintes funções:

- a) “GO Tree - Enriched DAG” (Gene Ontology Tree - Enriched Directed Acyclic Graph): para visualização do grupo de genes em um gráfico de acordo com processos biológicos, função molecular ou componente celular.
- b) Tabelas e Mapas KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes): para visualização das vias metabólicas nas quais os genes diferencialmente expressos estão localizados.

Para utilização da ferramenta WebGestalt, foram considerados os seguintes critérios estatísticos:

- a) Linhagens celulares: mínimo de 5 genes associados e p -valor de 0,01.
- b) Amostras de tecidos congelados: mínimo de 3 genes associados e p -valor de 0,01.
- c) Teste estatístico Hipergeométrico: utilizado porque os genes obtidos na análise das linhagens celulares e tecidos acometidos por LHC pertencem ao set de genes de referência utilizado na análise (humano).

3.7 VALIDAÇÃO DE POTENCIAIS MARCADORES EM MATERIAL EMBLOCADO EM PARAFINA PELA TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA (“SET” DE VALIDAÇÃO)

Alguns marcadores moleculares identificados na análise de expressão gênica foram testados em uma série histórica de casos de LHC diagnosticados no Hospital A C Camargo entre 1970 e 2005. Para otimização do estudo, contruiu-se um TMA (do inglês “Tissue MicroArray”). Blocos de parafina dos casos selecionados foram resgatados dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A C Camargo. Uma nova lâmina corada pela técnica da hematoxilina-eosina foi confeccionada e analisada, escolhendo-se área com maior concentração de CHRS, que foi delimitada. Utilizando-se um “tissue microarrayer” (Beecher Instruments, Silver Spring, MD), cilindros de 1mm (“cores”) de duas áreas distintas do tumor (amostragem em duplicata) foram retirados e transferidos para um bloco receptor. O bloco receptor foi cortado em micrótomo rotativo na espessura de 5 µm, colhendo-se material com o “tape” adesivo e colando-se em lâmina apropriada. As lâminas obtidas foram submetidas à irradiação ultravioleta por 30 minutos e mergulhadas em solução solvente (TPC), sendo posteriormente secadas à temperatura ambiente. Após a secagem, os tapes foram retirados e as lâminas imersas em banho de parafina, sendo armazenadas a vácuo, em freezer a -20° C, até a realização das reações imunoistoquímicas.

Os prontuários médicos dos casos selecionados foram revistos, coletando-se informações como idade, gênero, estadiamento, classificação IPS (HASENCLEVER e DIEHL 1998) e evolução clínica (Tabela 5).

Tabela 5 - Características clínicas dos pacientes no "set" de validação (TMA).

Características	Valor	%
"STATUS" DE EBV		
Positivo	69	46,6
Negativo	79	53,4
IDADE		
<15 anos	42	28,4
15-45 anos	88	59,5
>45 anos	18	12,2
GÊNERO		
Masculino	82	55,4
Feminino	66	44,6
DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO		
Esclerose nodular	91	61,5
Celularidade mista	39	26,4
Rico em linfócitos	8	5,4
Depleção linfocitária	3	2,0
Inclassificável	7	4,7
ESTADIO ANN ARBOR		
I	12	8,1
II	55	37,2
III	44	29,7
IV	27	18,2
N/A	10	6,8
IPS		
0-2	94	63,5
>2	38	25,7
N/A	16	10,8
SINTOMAS "B"		
Sim	63	42,6
Não	81	54,7
N/A	4	2,7
SEGUIMENTO		
VSD	106	71,6
VCD	8	5,4
MPD	29	19,6
MPOC	4	2,7
PS	1	0,7

Abreviaturas: IPS - International Prognostic Score; N/A - não avaliável; VSD - vivo sem doença; VCD - vivo com doença; MPD - morto pela doença; MPOC - morto por outras causas ; PS - perda de seguimento.

As reações imunoistoquímicas foram realizadas pelo método HRP polimérico livre de biotina. Os passos técnicos realizados estão detalhados abaixo:

- 1 Desparafinização das lâminas por 24 horas em estufa a 60°C.
- 2 Imersão em Xilol a 60°C por 20 minutos; Xilol à temperatura ambiente por 20 minutos; Etanol 100% por 30 segundos; Etanol 95% por 30 segundos; Etanol 70% por 30 segundos.
- 3 Lavagem das lâminas em água corrente e destilada
- 4 Imersão das lâminas em panela de pressão (Eterna[®], Nigro) com solução tampão citrato 10mM pH 6.0 pré-fervida e fechamento da panela com a válvula de segurança aberta.
- 5 Após a saída do vapor saturado, colocação da válvula de segurança para pressurização total. Contar 4 minutos após esse sinal.
- 6 Colocação da panela fechada sob água corrente até a despressurização total para abertura e retirada das lâminas.
- 7 Lavagem em água corrente e destilada.
- 8 Bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 3%, com 3 trocas de 10 minutos cada.
- 9 Lavagem em água corrente e destilada.
- 10 Lavagem com solução salina tamponada com fosfatos (PBS-phosphate buffered saline) 10mM pH 7.4 por 5 minutos.
- 11 Incubação das lâminas com os anticorpos primários diluídos em títulos previamente estabelecidos, em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, cod # A9647, EUA) e azida sódica 0,1%, por 18 horas a 4°C em câmara úmida.

- 12 Incubação por 30 min a 37° C com Post Primary Block (NovoLink Max Polymer cod # RE7260-k, Reino Unido).
- 13 Lavagem com tampão PBS com 3 trocas de 3 min cada.
- 14 Incubação com o NovoLink Polymer por 30 min a 37° C.
- 15 Lavagem em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.
- 16 Incubação das lâminas em solução substrato: 100 mg% 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, cod# D-5637, EUA); 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO); 1 mL de H₂O₂ 6%); 100 mL de PBS; por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz.
- 17 Observação, ao microscópio, nas lâminas controles, o desenvolvimento de precipitado castanho-dourado, como produto final da reação.
- 18 Lavagem em água corrente e água destilada por 3 minutos.
- 19 Contracoloração com Hematoxilina de Harris por 1 minuto.
- 20 Lavagem em água corrente e destilada.
- 21 Imersão por 2 vezes em água amoniacal (hidróxido de amônio 0,5%), lavando-se em seguida em água corrente e destilada.
- 22 Desidratação das lâminas em Etanol 80% por 30 segundos; Etanol 95% por 30 segundos; Etanol 100% por 30 segundos, duas vezes seguidas; Xilol por 30 segundos, 4 vezes seguidas.

A Tabela 6 relaciona os genes cujas proteínas foram testadas por imunistoquímica, procedência segundo o grupo avaliado (linhagem celular ou amostras de tecido fresco congelado) e diluição do anticorpo primário. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum, sendo considerados negativos ("scores" 0-1) casos que não apresentaram marcação, ou que

apresentaram fraca marcação nas células de interesse, e positivos (“scores 2-3) os casos que apresentaram moderada ou forte intensidade de marcação.

Tabela 6: Marcadores avaliados no "set" de validação (TMA).

Marcador	Procedência	Diluição	Clone	Fabricante
Aurora B	Tecido fresco congelado	1:1000	EP1009Y	Epitomics
Caspase-1	Linhagem celular	1:50	30F12	Neomarkers
Caveolina-1	Linhagem celular	1:250	E249	Epitomics
CCL20	Linhagem celular	1:25	rhCCL20	ReD
CDC2	Tecido fresco congelado	1:500	Policlonal	Neomarkers
MMP-9	Linhagem celular	1:100	Policlonal	Neomarkers

Para detecção do vírus EBV, foi realizada imunohistoquímica com anticorpo LMP-1 (clone CS1-4, Novocastra, na diluição 1/100), segundo o protocolo acima descrito), e técnica de hibridação “*in situ*” (ISH) para detecção de transcritos EBER (sonda de oligonucleotídeo NCL-EBV, Novocastra). A revelação da reação de hibridização “*in situ*” foi feita com kit de detecção para sondas fluoresceinadas (NCL-ISH-D, Novocastra). Por se tratar de kits, o procedimento foi seguido segundo instruções do fabricante, descritas a seguir:

1. Desparafinização dos cortes em xilol, 2 passagens de 3 minutos cada.
2. Hidratação em etanol 99%, 2 passagens de 3 minutos cada.
3. Hidratação em etanol 95%, 2 passagens de 3 minutos cada.
4. Imersão em água por 3 minutos.
5. Incubação dos cortes em 100um de proteinase K em tampão Tris-HCl 0,05M, pH7,6 por 10 a 15 minutos a 37°C.
6. Imersão em água, 2 passagens de 3 minutos cada.
7. Desidratação em etanol 95% por 3 minutos.
8. Desidratação em etanol 99% por 3 minutos.

9. Secagem do corte ao ar.
10. Aplicação de 20ul de sonda, cobrindo-se os cortes com lamínula, deixando-se por toda a noite a 37⁰C (cerca de 16 horas).
11. Retirada das lamínulas delicadamente com tampão.
12. Lavagem em tampão 0,05M Tris-HCl 0,3M NaCl, pH7,6 (TBS) com 0,1% de TritonX-100 em 3 passagens de 3 minutos cada.
13. Aplicação de 100ul de tampão TBS com soroalbumina bovina (BSA) a 3%, 0,1% de Triton X-100 e 20% de soro normal de coelho por 10 minutos.
14. Retirada do excesso de soro normal e, sem lavagem, aplicação de anticorpo anti-fluoresceína diluído a 1:150 em tampão TBS com BSA a 3% e Triton X-100 a 0,1%; incubação por 30 minutos.
15. Lavagem dos cortes em tampão TBS, 2 passagens de 3 minutos cada.
16. Lavagem dos cortes em tampão do substrato da fosfatase alcalina pH 9,0 por 5 minutos;
17. Incubação com substrato da fosfatase alcalina (BCIP-NBT, 5 bromo-4-chloro-3-indolyphosphate e nitroblue tetrazolium), preparado a 1:150 em tampão Tris-HCl 100mM, MgCl₂ 50mM, NaCl 100mM, pH9,0, além de 1 ul de Levamisole (inibidor de fosfatase alcalina) para cada ml de substrato; incubar por toda a noite (cerca de 16 horas), à temperatura ambiente.
18. Lavagem em água corrente por 5 minutos.
19. Contra-coloração com hematoxilina de Meyer por um minuto.
20. Passagem em água amoniacal por segundos.
21. Montagem em meio aquoso.

A visualização da reação de HIS é expressa através da coloração enegrecida do núcleo das células tumorais. Como nas reações imunohistoquímicas, foram coradas simultaneamente uma lâmina com controle positivo externo e outra com controle negativo (a mesma lâmina do controle positivo com aplicação de tampão TBS no lugar dos anticorpos primários e da sonda EBER), para validar a reação.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS POTENCIAIS MARCADORES ESTUDADOS POR IMUNOISTOQUÍMICA EM BLOCO DE TMA (“SET” DE VALIDAÇÃO)

Os dados obtidos do estudo dos potenciais marcadores foram colocados em tabelas e a análise estatística realizada utilizando-se os programas de computador GraphPad Prism v.4.02 (Graphpad Software Inc. USA, 2000) e/ou MedCalc v. 11.0.1 (MedCalc Software, Bélgica, 2009). Foram realizados para a análise de comparação entre os grupos (EBV-positivo e EBV-negativo) e os marcadores biológicos o teste de qui-quadrado ou o teste exato de Fisher. O nível de significância foi estabelecido para $\alpha < 0,05$. Cálculos de estimativa de sobrevida foram realizados através da técnica de Kaplan e Meyer. Comparações entre as curvas de probabilidade de sobrevida acumulada para categorias de uma mesma variável foram realizadas pelo teste de log rank. Análise multivariada foi realizada através do Modelo de Cox. Os pacientes foram agrupados nas categorias “vivos sem doença”, “vivos com doença”, “mortos pela doença”. Pacientes mortos por outra causa ou perdidos de vista foram devidamente censurados.

3.9 FORMULAÇÃO DE HIPÓTESES BIOLÓGICAS

Além dos recursos fornecidos pela ferramenta de bioinformática WebGestalt, foi realizada uma busca no site PubMed (<http://ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed>) usando como termos os genes selecionados para estudo e “cancer”, “neoplasia”, “Hodgkin”, “lymphoma”, “Reed-Sternberg cells”, “nf-kappaB signalling pathway”, “JAK/STAT signalling pathway”, “apoptosis”, “regulatory”, “cytotoxic”, “T-cells”, “CD4”, “CD8”, “immune response”, “immune modulation” e “EBV”.

Esta busca teve como objetivo obter dados de literatura sobre cada um dos genes selecionados para estudo, assim como para se verificar a eventual descrição da participação dos mesmos em processos biológicos sabidamente envolvidos na patogênese do LHC (auto-estímulo proliferativo, bloqueio de apoptose e evasão do sistema de imunovigilância).

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

Um objetivo inicial quando da apresentação do plano para o desenvolvimento deste projeto não foi atingido: a comparação entre as linhagens celulares e CHRS primárias, isoladas do tecido a fresco congelado por microdissecção a laser. Os contratempos que impediram a realização deste objetivo foram de natureza técnica, envolvendo o isolamento de uma quantidade mínima de CHRS em um tempo que minimizasse a degradação do RNA que se pretendia extrair. Por isso, adotou-se a estratégia de analisar o padrão de expressão gênica das amostras de tecido congelado como um todo (ou seja, avaliando as CHRS e o infiltrado inflamatório circundante). Desta forma os resultados das análises das linhagens celulares e das amostras de tecido a fresco são apresentados (e discutidos no item 5) de forma separada.

4.1.1 Linhagens celulares

4.1.1.1 Genes diferencialmente expressos em relação ao “status” de EBV

A comparação entre as linhagens celulares EBV-negativas (L428, L1236 e KM-H2) e a linhagem EBV-positiva (L591) revelou um total de 756 genes diferencialmente expressos, sendo 267 genes mais expressos (EBV-negativo>EBV-positivo, listados no anexo 1) e 489 genes menos expressos (EBV-negativo<EBV-positivo, listados no anexo 2). A diferença de expressão

variou de -286.5622331 para o gene CPE (carboxypeptidase E) até +108.2109172 para o gene KLF3 (Kruppel-like factor 3 (basic)).

4.1.1.2 Análise funcional

Utilizando-se a ferramenta de análise bioinformática *WebGestalt* (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/gotm/>), os genes diferencialmente expressos foram anotados de acordo com os bancos de dados disponibilizados pelo sistema e usados para identificação dos grupos relevantes.

Inicialmente, os grupos de genes diferencialmente expressos foram classificados segundo o *Gene Ontology Tree*, para a geração do gráfico “Enriched DAG” (“Enriched Directed Acyclic Graph”). Os grupos relevantes foram apresentados de acordo com as categorias “processo biológico”, “função molecular” e “componente celular”. Independente do grupo analisado (EBV-negativo<EBV-positivo ou EBV-negativo>EBV-positivo), numerosas categorias foram consideradas relevantes, com um mínimo de 5 genes relacionados e p-valor de 0,01.

1) **Conjunto de genes menos expressos na linhagem EBV-positiva (L428/L1236/KM-H2>L591):** numerosas categorias foram consideradas relevantes, sendo selecionados os seguintes grupos para estudo (Figura 12):

a) Genes relacionados à sinalização célula-célula (“genes in cell-cell signaling”, processo biológico nível 4): neste grupo estão relacionadas citocinas envolvidas em processos inflamatórios como o Fator de

Necrose Tumoral (TNF, do inglês *Tumor Necrosis Factor*), CCL2 (do inglês *chemokine [c-c motif] ligand 2*), CCL5 e IL-13 (interleucina 13).

- b) Genes relacionados ao desenvolvimento do sistema imune (“genes in immune system development”, processo biológico nível 5): neste grupo estão relacionadas a citocina IL-4 (interleucina 4) e MMP-9 (metaloproteinase-9), uma proteína envolvida na quebra da matriz extracelular.

2) **Conjunto de genes mais expressos na linhagem EBV-positiva (L428/L1236/KM-H2<L591)**: como observado anteriormente, numerosas categorias foram consideradas relevantes, sendo selecionados os seguintes grupos para estudo (figura 13):

- a) Genes relacionados à regulação da via de NF-kappa B (“genes in positive regulation of I-kappa-B-kinase/NF-kappa B cascade”, processo biológico nível 9): neste grupo estão relacionados genes como CASP1 e CD40.
- b) Genes relacionados à quimiotaxia (“genes in chemotaxis”, processo biológico nível 6): neste grupo estão relacionados genes como CXCL3, CXCL9, CXCL12, CXCL13 e CCL20.

Posteriormente, os grupos de genes diferencialmente expressos foram analisados segundo sua participação em vias metabólicas relacionadas na KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

Ao analisar o **conjunto de genes menos expressos na linhagem EBV-positiva (L428/L1236/KM-H2>L591)**, as seguintes vias metabólicas foram consideradas para estudo (tabela 7): interação citocina-receptor de citocina (17 genes), via de sinalização MAPK (10 genes), via de sinalização JAK/STAT (10 genes), adesão focal (5 genes) e via de sinalização “Toll-like receptor” (5 genes).

Ao analisar o **conjunto de genes mais expressos na linhagem EBV-positiva (L428/L1236/KM-H2<L591)**, as seguintes vias metabólicas foram consideradas para estudo (tabela 8): interação citocina-receptor de citocina (22 genes), via de sinalização MAPK (12 genes), via de sinalização JAK/STAT (9 genes) e via de sinalização “Toll-like receptor” (8 genes).

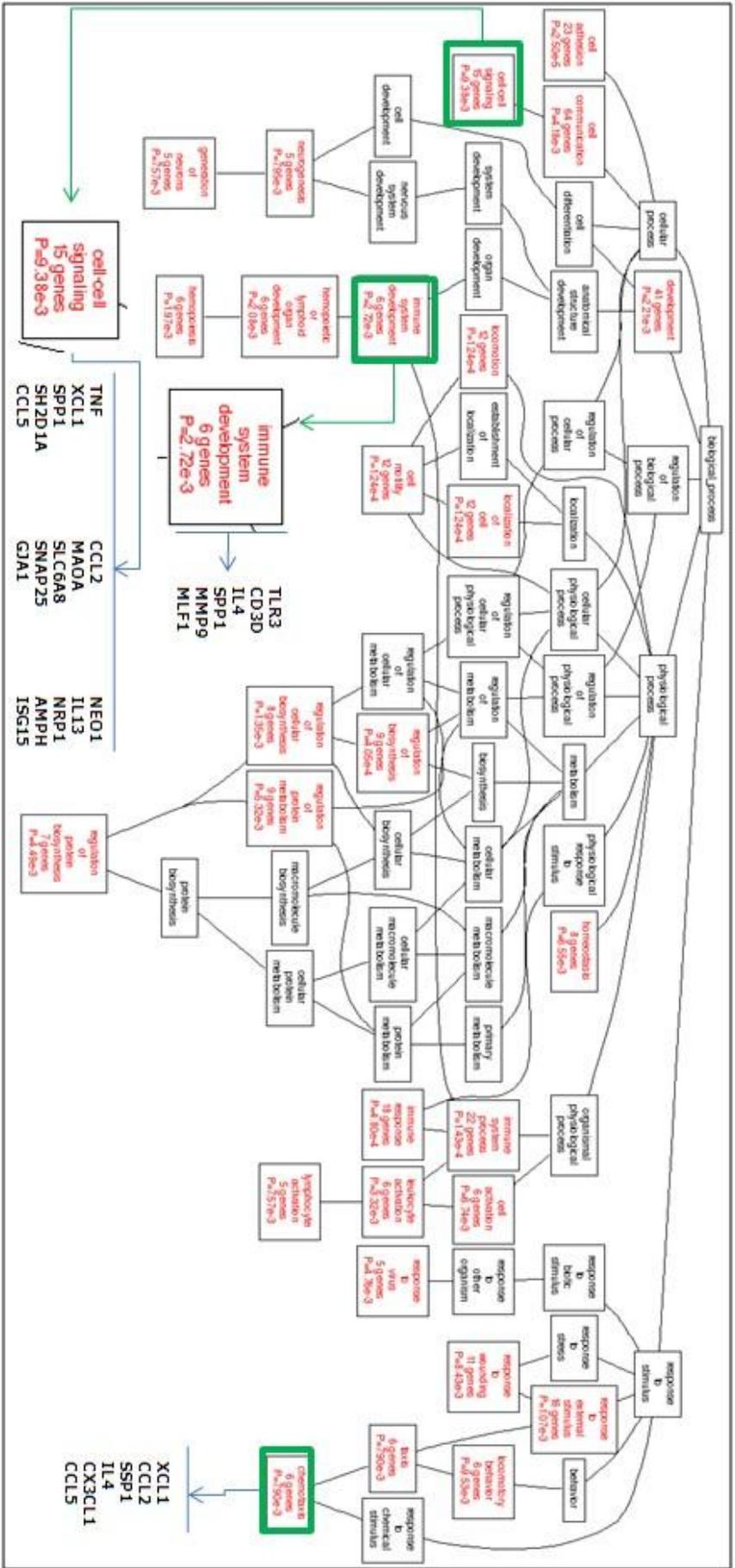


Figura 12: Gráfico “enriched DAG” (*Directed Acyclic Graph*) exibindo, segundo processo biológico, grupo de genes menos expressos na linhagem celular EBV-positiva em relação às linhagens EBV-negativas (L428/L1236/KM-H2>L591). Em cada quadro estão apresentadas as categorias segundo a classificação “GO” (*Gene Ontology*). As categorias destacadas em vermelho exibem o número de genes participantes de cada processo biológico. O valor de p indica o nível de significância da análise de enriquecimento (critérios utilizados na análise: mínimo de 5 genes e p -valor de 0,01). As categorias destacadas em verde (“cell-cell signaling” e “immune system development”) foram selecionadas para estudo. Figura adaptada de <http://bioinfo.vanderbilt.edu/gotm/>.

Tabela 7 : Vias metabólicas relevantes em relação ao conjunto de genes menos expressos na linhagem EBV-positiva (L428/L1236/KM-H2>L591)

Via KEGG ("KEGG pathway")	Número de genes	Genes (símbolo)	Enriquecimento
Interação citocina-receptor de citocina	17	IL4; IL5; IL5RA; IL10RA; IL12A; IL13; IL13RA1; MET; TNFRSF12A; IL22RA1; CCL2; CCL5; XCL1; CX3CL1; TNF; TPO; TNFSF14	O=17;E=1.9552;R=8.6948;P=1.67e-11
Via de sinalização MAPK	10	AKT3; DDIT3; DUSP6; FGFR1; HSPB1; TAU; PLA2G4A; PRKCA; BDNF; TNF	O=10;E=2.1491;R=4.6531;P=6.76e-5
Via de sinalização Jak-STAT	10	AKT3; IL4; IL5; IL5RA; IL10RA; IL12A; IL13; IL13RA1; IL22RA1; TPO	O=10;E=1.1554;R=8.655;P=2.79e-7
Adesão focal	6	AKT3; MET; PRKCA; SPP1; TNXB; CAV1	O=6;E=1.5351;R=3.9085;P=4.61e-3
Via de sinalização "Toll-like receptor"	5	AKT3; IL12A; CCL5; TLR3; TNF	O=5;E=0.6948;R=7.1963;P=6.78e-4

Observações:

- 1) KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.
- 2) O - Observado.
- 3) E - Esperado (total de genes em uma via KEGG para o "set" de referência X total de genes no "set" de referência)
- 4) R - razão O/E
- 5) P - p valor

Tabela 8 : Vias metabólicas relevantes em relação ao conjunto de genes mais expressos na linhagem EBV-positiva (L428/L1236/KM-H2<L591)

Via KEGG ("KEGG pathway")	Número de genes	Genes (símbolo)	Enriquecimento
Interação citocina-receptor de citocina	22	CXCL13; CSF2RA; FLT1; TNFRSF13B; GHR; CXCL3; IL1A; IL6R; IL7; IL12B; CXCL10; CXCL9; TNFRSF11B; PRL; TNFRSF17; CCL20; CCL22; CXCL12; BMP7; BMPR2; TNFRSF14; CD40	O=22;E=3.5663;R=6.1689;p=1.47e-11
Via de sinalização MAPK	12	DUSP2; DUSP5; HSPA1A; IL1A; MEF2C; PAK1; PRKCB; MAPK8; RAC2; CASP1; CASP4; CASP5	O=12;E=3.9199;R=3.0613;p=6.45e-4
Via de sinalização Jak-STAT	9	CSF2RA; PIK3R5; GHR; IL6R; IL7; IL12B; PRL; CBLB; SOCS3	O=9;E=2.1073;R=4.2709;p=2.84e-4
Via de sinalização "Toll-like receptor"	8	TIRAP; PIK3R5; IL12B; CXCL10; CXCL9; MAPK8; CD80; CD40	O=8;E=1.2673;R=6.3126;p=4.08e-5

Observações:

- 1) KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.
- 2) O - Observado.
- 3) E - Esperado (total de genes em uma via KEGG para o "set" de referência X total de genes no "set" de teste / total de genes no "set" de referência)
- 4) R - razão O/E
- 5) P - p valor

4.1.2 Amostras de tecido fresco congelado

4.1.2.1 Assinatura gênica de distinção em relação ao status EBV

Embora casos de LHC EBV-positivos sejam facilmente identificados através de imunistoquímica com anticorpo anti-LMP-1 e ISH com sonda contra transcritos EBER, realizamos uma análise de “clusterização” hierárquica (“hierarchical clustering”), que revelou 38 elementos representando 26 genes anotados que mais fortemente discriminaram entre LHC EBV-positivo e LHC EBV-negativo. Procuramos com esta análise, assim como na abordagem anterior, identificar genes que explicassem aspectos da patogênese do LHC em casos EBV-positivos e EBV-negativos, e que pudessem estar expressos não apenas nas CHRS, mas também no infiltrado inflamatório circundante. Estes genes se agregam em 3 grupos principais (figura 14). No primeiro grupo (ou “cluster A”) estão relacionados genes mais expressos em ambos os grupos em relação ao RNA de referência, mas que apresentam maior expressão no grupo de amostras positivas em relação ao grupo de amostras negativas. No segundo grupo (ou “cluster B”) estão relacionados genes menos expressos em ambos os grupos em relação ao RNA de referência, mas que apresentam menor expressão no grupo de amostras positivas em relação ao grupo de amostras negativas. O terceiro grupo (ou “cluster C”) é representado apenas por um gene anotado (KLRC2), que apresenta aumento de expressão nas amostras positivas para EBV, e diminuição da expressão em amostras negativas, em relação ao RNA de referência.

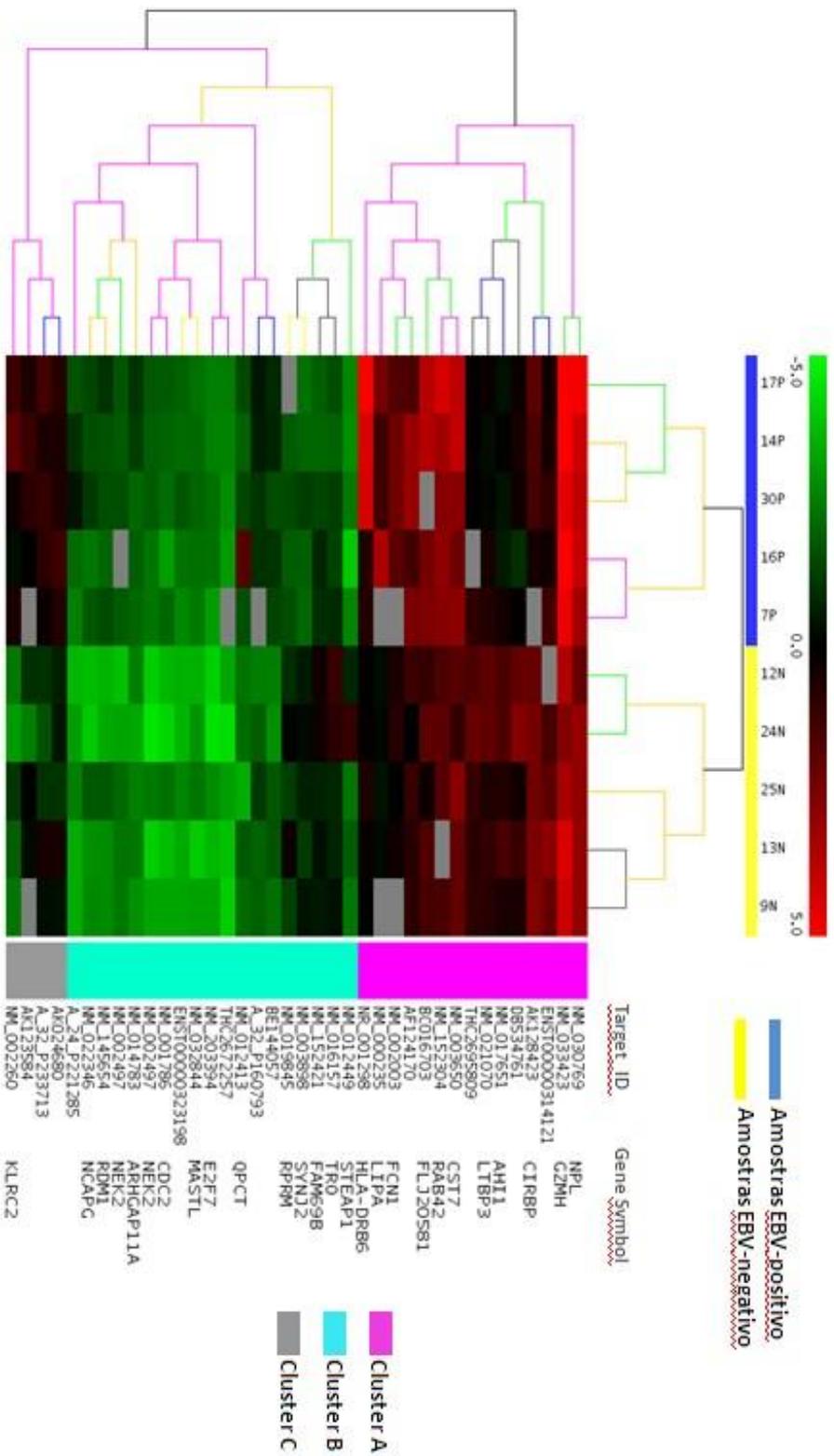


Figura 14: Clusterização hierárquica mostrando assinaturas de expressão gênica associadas à positividade ou negatividade para o vírus EBV. São identificadas 3 assinaturas (ou "clusters") distintas. No primeiro grupo (ou "cluster A") estão relacionados genes mais expressos em ambos os grupos em relação ao RNA de referência, mas que apresentam maior expressão no grupo de amostras positivas em relação ao grupo de amostras negativas. No segundo grupo (ou "cluster B") estão relacionados genes menos expressos em ambos os grupos em relação ao RNA de referência, mas que apresentam menor expressão no grupo de amostras positivas em relação ao grupo de amostras negativas. O terceiro grupo (ou "cluster C") é representado apenas por um gene anotado (KLRC2), que apresenta aumento de expressão nas amostras positivas, e diminuição da expressão em amostras negativas, em relação ao RNA de referência. Amostras de tecido fresco congelado, Banco de Tumores do Hospital A C Camargo.

4.1.2.2 Análise funcional

Devido ao baixo número de genes diferencialmente expressos (26 genes anotados) obtidos na análise anterior (ao se aplicar o critério de “fold” maior que +2 ou -2), foram utilizados na análise funcional todos os genes diferencialmente expressos com $p < 0,01$, independente do “fold” observado (relacionados no Anexo 3).

A diferença de expressão variou de -3.166103636 para o gene STEAP1 (“six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1”) até + 7.394808915 para o gene KLRC2 (“killer cell lectin-like receptor subfamily C. member 2”). Os genes diferencialmente expressos foram separados em grupos (grupo EBV-positivo>grupo EBV-negativo e grupo EBV-positivo<grupo EBV-negativo) e submetidos às análises descritas no item 4.1.1.2. Nesta etapa, foram consideradas relevantes as categorias com um mínimo de 3 genes relacionados e p-valor de 0,01.

1) **EBV-positivo>EBV-negativo:**

Após classificação segundo o *Gene Ontology Tree*, e geração do gráfico “Enriched DAG” (“Enriched Directed Acyclic Graph”), foram selecionados os seguintes grupos para o estudo (Figura 15).

- a) Genes relacionados à modificação de proteínas (“genes in protein modification”, processo biológico nível 7): neste grupo estão relacionados 19 genes, entre os quais MAPK14 (ou p38), kinase ativada por numerosas citocinas pró-inflamatórias e stress celular, CDC2 (membro da família de Ser/Thr kinases), TEC (uma kinase envolvida na regulação de funções imunes, particularmente ativação de células T) e

AURKB (aurora kinase B ou aurora B), envolvida na segregação dos cromossomos durante o processo de mitose.

- b) Genes envolvidos em mitose (“genes in mitosis”, processo biológico nível 7), subgrupo de Genes envolvidos na regulação do ciclo celular (“genes in cell cycle”, processo biológico nível 4): os 5 genes relacionados ao processo mitótico fazem parte do grupo de genes envolvidos na regulação do ciclo celular, compreendendo os já mencionados CDC2 e AURKB.

2) **EBV-positivo<EBV-negativo:**

Após classificação segundo o *Gene Ontology Tree*, e geração do gráfico “Enriched DAG” (“Enriched Directed Acyclic Graph”), foi selecionado o seguinte grupo para estudo (figura 16):

- a) Genes envolvidos em regulação de transcrição DNA-dependente (“genes in regulation of transcription, DNA dependent”, processo biológico nível 8): neste grupo estão relacionados 24 genes, entre os quais HDAC4 (“histone deacetylase 4”), CDK9 (“cyclin-dependent kinase 9” ou “CDC2-related kinase”, ZBTB7A (“Pokemon”), PURA (“Purine-rich element binding Protein A”), FOXP1 (“Forkhead box P1”) e TSC22D3 (“TSC22 domain family, member 3”).

A análise de grupos de genes relevantes com base em vias KEGG não mostrou resultados estatisticamente significativos.

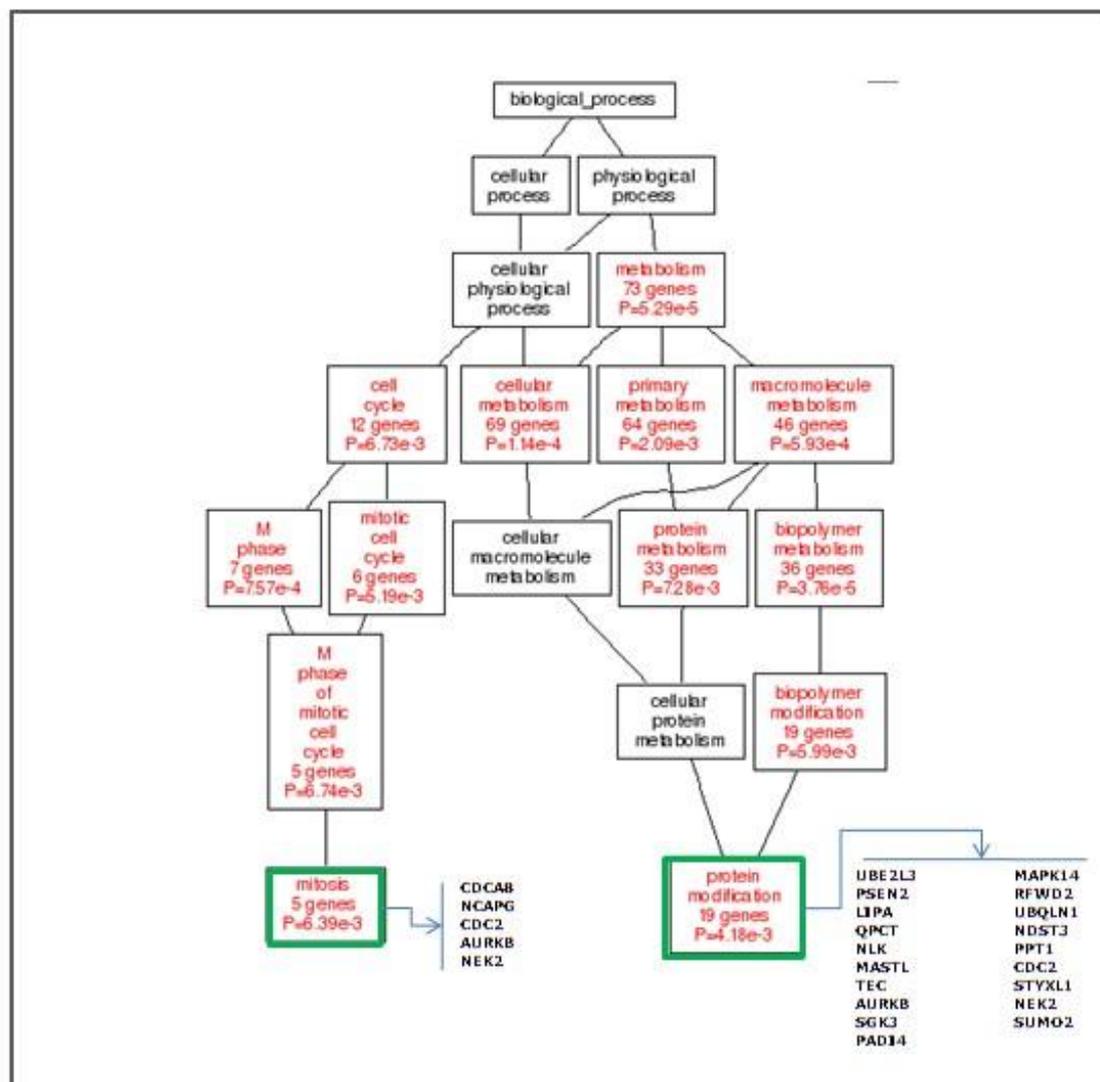


Figura 15: Gráfico “enriched DAG” (*Directed Acyclic Graph*) exibindo, segundo processo biológico, grupo de genes mais expressos no conjunto de amostras de tecido congelado EBV-positivas em relação ao conjunto de amostras de tecido congelado EBV-negativas. Em cada quadro estão apresentadas as categorias segundo a classificação “GO” (*Gene Ontology*). As categorias destacadas em vermelho exibem o número de genes participantes de cada processo biológico. O valor de p indica o nível de significância da análise de enriquecimento (critérios utilizados na análise: mínimo de 3 genes e p -valor de 0,01). As categorias destacadas em verde (“protein modification” e “mitosis”) foram selecionadas para estudo. Figura adaptada de <http://bioinfo.vanderbilt.edu/gotrv>.

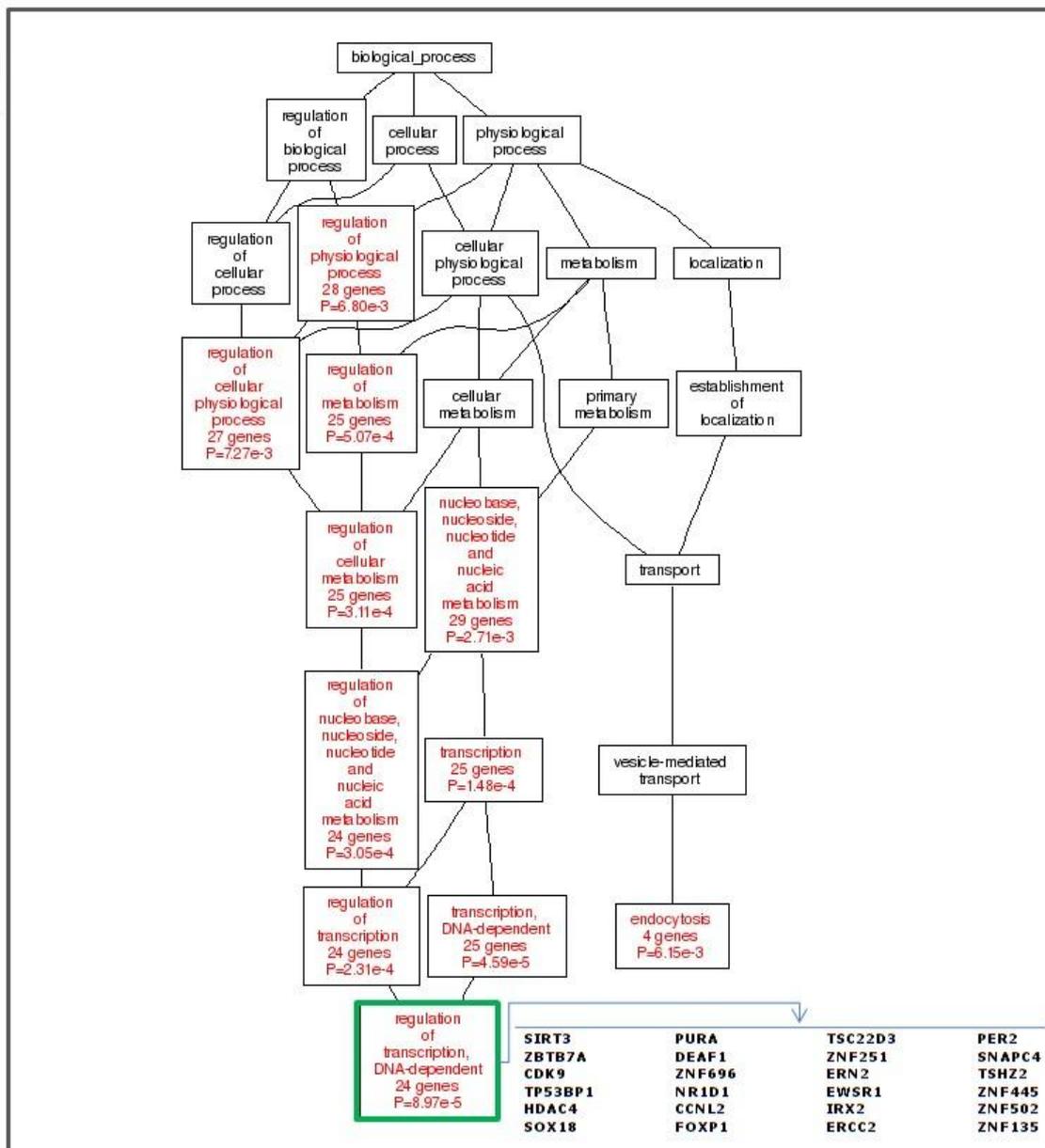


Figura 16: Gráfico “enriched DAG” (*Directed Acyclic Graph*) exibindo, segundo processo biológico, grupo de genes menos expressos no conjunto de amostras de tecido congelado EBV-positivas em relação ao conjunto de amostras de tecido congelado EBV-negativas. Em cada quadro estão apresentadas as categorias segundo a classificação “GO” (*Gene Ontology*). As categorias destacadas em vermelho exibem o número de genes participantes de cada processo biológico. O valor de p indica o nível de significância da análise de enriquecimento (critérios utilizados na análise: mínimo de 3 genes e p -valor de 0,01). A categoria destacada em verde (“regulation of transcription, DNA dependent”) foram selecionadas para estudo. Figura adaptada de <http://bioinfo.vanderbilt.edu/gotm/>.

4.2 VALIDAÇÃO DE MARCADORES SELECIONADOS EM TMA DE LHC (“SET” DE VALIDAÇÃO)

Foram selecionados para validação 6 marcadores, representando produtos de expressão protéica de genes participantes dos grupos selecionados para estudo na etapa de análise de expressão gênica, e com anticorpos disponíveis para utilização, à semelhança do realizado por CHETAILLE e colaboradores (2009). Dentre os genes estudados no grupo menos expresso na linhagem EBV-positiva (figura 12 e tabela 7), foram selecionados *MMP9* e *CAV1*. Dentre os genes estudados no grupo mais expresso na linhagem EBV-positiva (figura 13 e tabela 8) foram selecionados *CASP1* e *CCL20*. Dentre os genes mais expressos em amostras de tecido congelado associado à infecção por EBV, foram selecionados *AURKB* e *CDC2*.

O resultado geral da análise dos marcadores e sua associação com o EBV no “set” de validação estão sumarizados, respectivamente, nas tabelas 9 e 10. A Figura 17 exhibe a lâmina de TMA construída para esta etapa de validação, assim como fotomicrografia de um *spot* correspondendo a um dos casos incluídos para estudo. As Figuras 18 e 19 exibem fotomicrografias de exemplos de casos positivos para cada um dos marcadores analisados. A figura 20 exhibe as curvas de sobrevida doença-específica para cada um dos marcadores pesquisados, assim como a sobrevida específica segundo IPS, para efeito de comparação (em pacientes na faixa etária de 15 a 45 anos). O sumário dos resultados está descrito a seguir:

4.2.1 Resultado por marcadores pesquisados:

Aurora B: observou-se fraca marcação nuclear, em células isoladas, em 87 casos (58,78%). A avaliação foi impossibilitada em 33 casos (22,30%), devido à ausência de representatividade da área analisada ou artefato pré-analítico (perda do “spot” selecionado no momento de confecção da lâmina para TMA).

Caspase-1: observou-se marcação citoplasmática de forte intensidade em 57 casos (38,51%). A avaliação foi impossibilitada em 26 casos (17,57%), devido à ausência de representatividade da área analisada ou artefato pré-analítico (perda do “spot” selecionado no momento de confecção da lâmina para TMA).

Caveolina-1: observou-se marcação de membrana e/ou citoplasmática, com ocasional marcação na região do complexo de Golgi, em 38 casos (25,68%), em células neoplásicas isoladas. A avaliação foi impossibilitada em 25 casos (16,89%), devido à ausência de representatividade da área analisada ou artefato pré-analítico (perda do “spot” selecionado no momento de confecção da lâmina para TMA).

CCL20: observou-se marcação citoplasmática em 73 casos (49,32%). A avaliação foi impossibilitada em 13 casos (8,78%), devido à ausência de representatividade da área analisada ou artefato pré-analítico (perda do “spot” selecionado no momento de confecção da lâmina para TMA).

CDC2: observou-se marcação citoplasmática em 112 casos (75,68%). A avaliação foi impossibilitada em 13 casos (8,78%), devido à ausência de representatividade da área analisada ou artefato pré-analítico (perda do “spot” selecionado no momento de confecção da lâmina para TMA).

MMP9: observou-se marcação citoplasmática em 77 casos (52,03%). A avaliação foi impossibilitada em 30 casos (20,27%), devido à ausência de representatividade da área analisada ou artefato pré-analítico (perda do “spot” selecionado no momento de confecção da lâmina para TMA).

4.2.2 Correlação entre os marcadores pesquisados e EBV:

Dos 6 marcadores utilizados na validação imunoistoquímica, apenas CCL20 apresentou uma associação positiva com a presença de EBV ($p < 0,0001$).

4.2.3 Análise de sobrevida doença-específica em relação aos marcadores pesquisados:

Foi observada alteração significativa na taxa de sobrevida doença-específica de acordo com a expressão de Caspase-1 ($p = 0,0302$), MMP9 ($p = 0,0370$) e em pacientes com IPS maior do que 2, na faixa etária de 15 a 45 anos. A análise de sobrevida nos pacientes da faixa etária pediátrica (abaixo de 15 anos), e em pacientes acima de 46 anos não foi realizada, devido ao baixo número de indivíduos disponíveis para avaliação quando divididos em categorias “marcador-positivo” e “marcador-negativo”. Na análise multivariada entre IPS, MMP9 e CASP1 pelo Modelo de Regressão de Cox, a expressão de MMP9 por CHRS manteve-se como fator prognóstico independente em pacientes com LHC na faixa etária de 15 a 45 anos (Figura 21).

Tabela 9: Resultado da avaliação dos marcadores no "set" de validação (TMA)

Marçador	Resultado	No.	%
Aurora B	Positivo	87	58,78
	Negativo	28	18,92
	N/A	33	22,30
Caspase-1	Positivo	57	38,51
	Negativo	65	43,92
	N/A	26	17,57
Caveolina-1	Positivo	38	25,68
	Negativo	85	57,43
	N/A	25	16,89
CCL20	Positivo	73	49,32
	Negativo	62	41,89
	N/A	13	8,78
CDC2	Positivo	112	75,68
	Negativo	23	15,54
	N/A	13	8,78
MMP9	Positivo	77	52,03
	Negativo	41	27,70
	N/A	30	20,27
Total		148	100

Obs: N/A: Casos não avaliáveis.

Tabela 10: Correlação entre os marcadores analisados e presença de EBV

	EBV POS	EBV NEG	p
Aurora B POS	41	46	1,0000
Aurora B NEG	13	15	
Caspase-1 POS	34	36	0,7147
Caspase-1 NEG	23	29	
Caveolina-1 POS	19	19	0,6961
Caveolina-1 NEG	38	47	
CCL-20 POS	46	27	<0,0001
CCL-20 NEG	16	46	
CDC2 POS	47	65	0,1116
CDC2 NEG	14	9	
MMP-9 POS	42	35	0,0523
MMP-9 NEG	14	27	

Obs: POS - positivo; NEG - negativo. Teste exato de Fisher

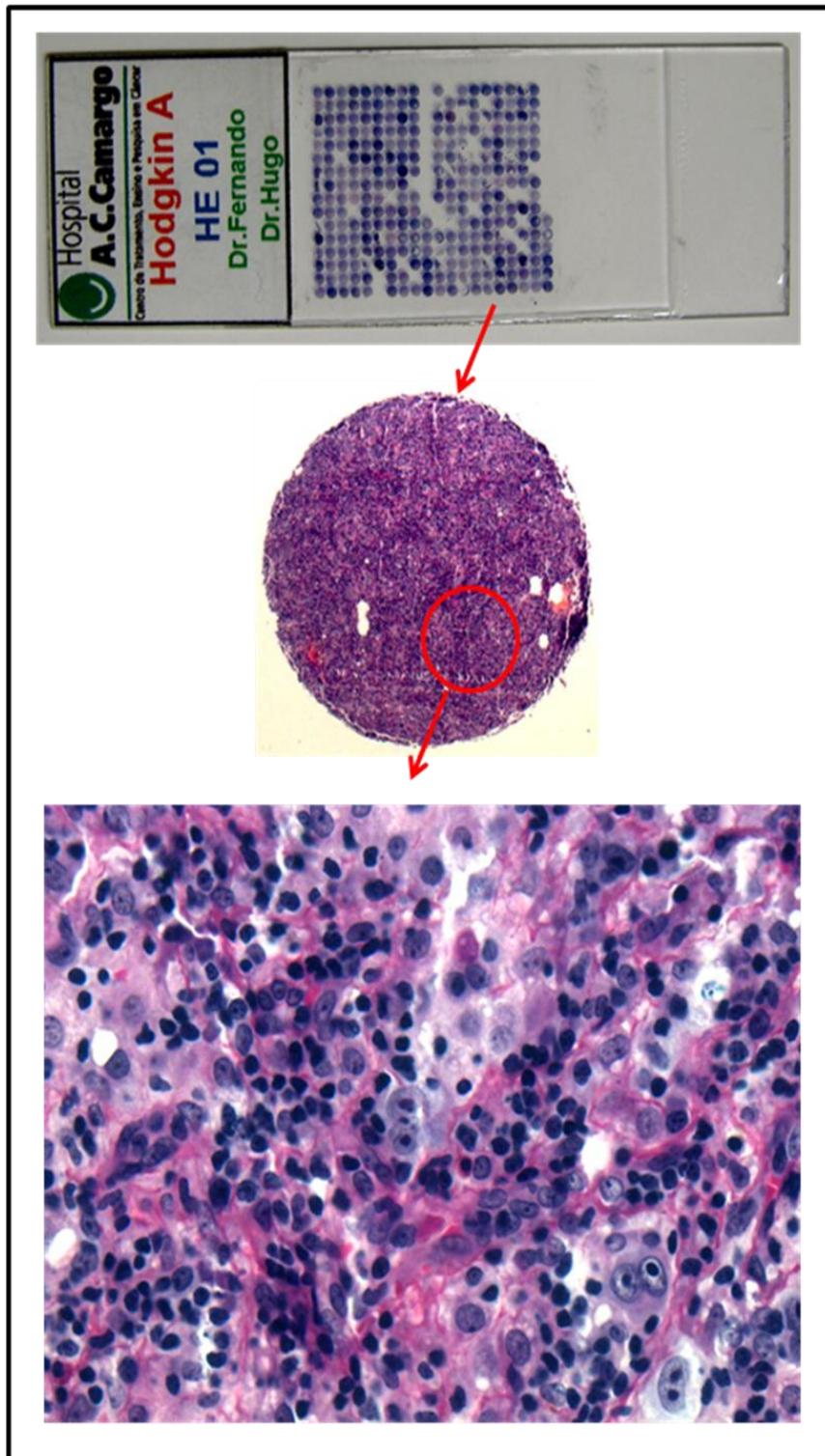


Figura 17: Figura de TMA de LHC – Lâmina corada por H&E, com casos amostrados em duplicata, e fotomicrografias de um dos sopts (40x) e de área exibindo células de Reed-Sternberg em meio a infiltrado inflamatório característico do linfoma de Hodgkin clássico (400x).

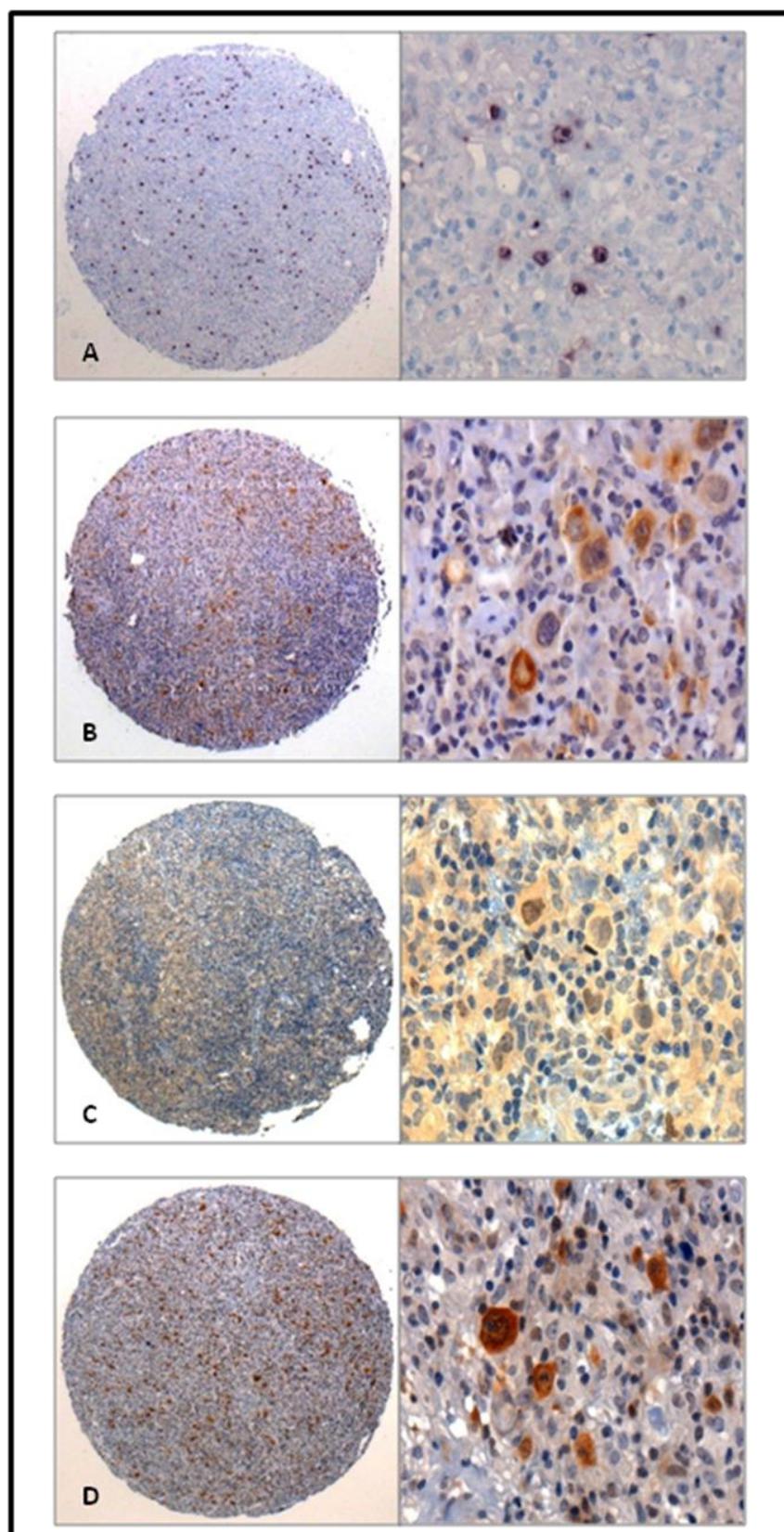


Figura 18: Fotomicrografias de TMA de LHC – Hibridização “in situ” com sonda EBER (A). Imunoistoquímica para LMP-1 (B), Aurora B (C), Caspase-1 (D). 40x e 400x.

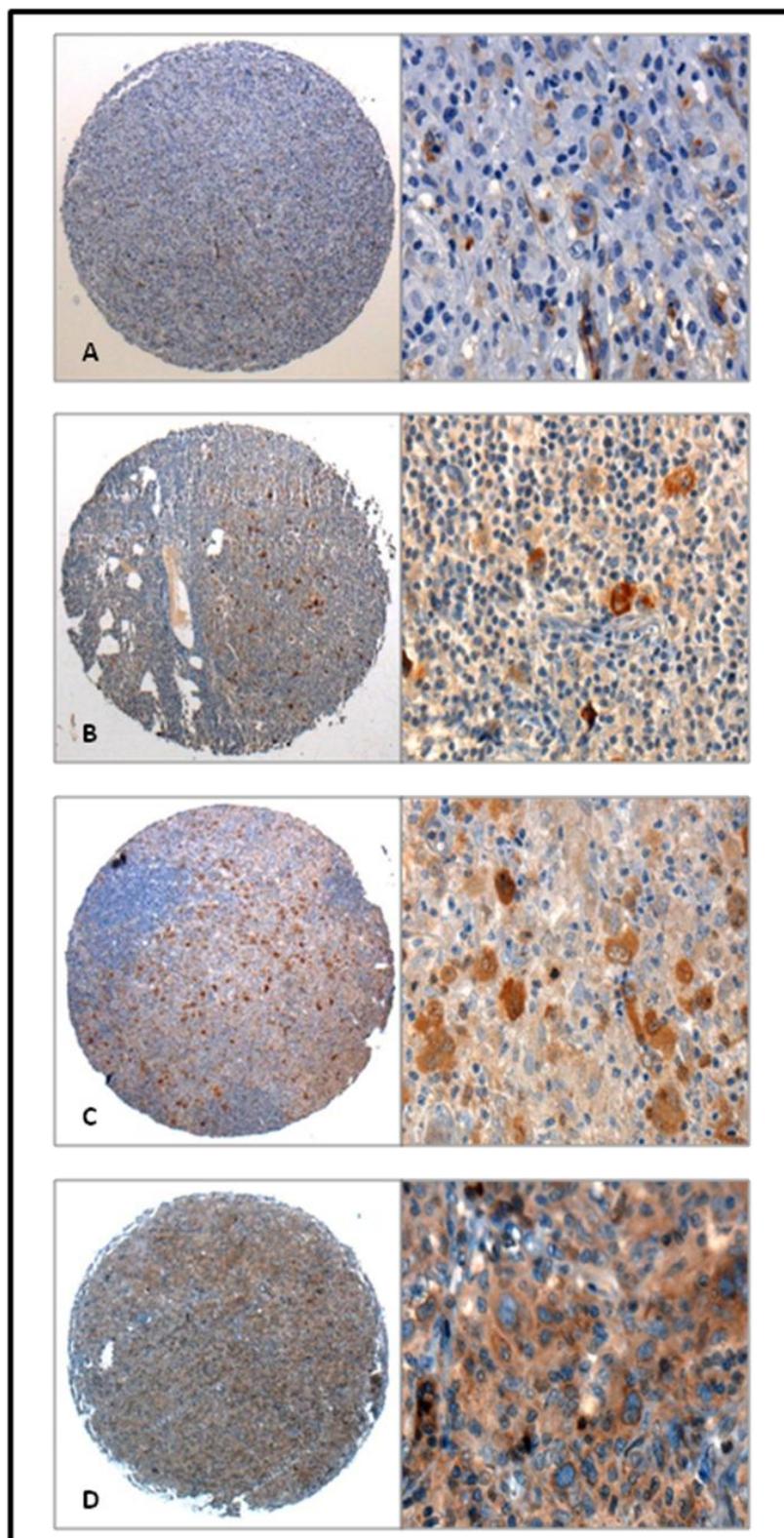


Figura 19: Fotomicrografias de TMA de LHC – Imunoistoquímica para Caveolina -1 (A), CCL20 (B), CDC2 (C) e MMP9 (D). 40x e 400x.

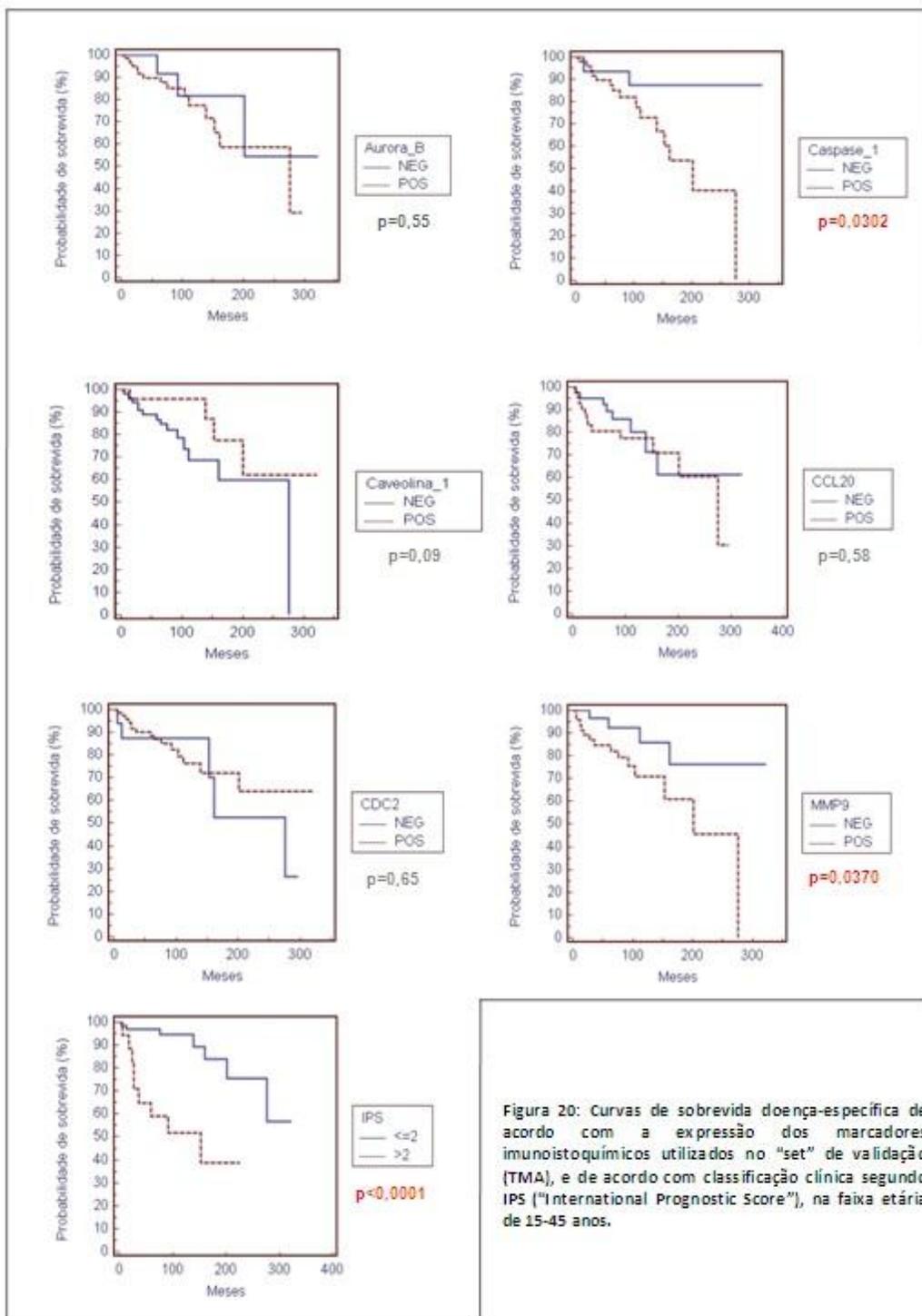


Figura 20: Curvas de sobrevivência doença-específica de acordo com a expressão dos marcadores imunohistoquímicos utilizados no "set" de validação (TMA), e de acordo com classificação clínica segundo IPS ("International Prognostic Score"), na faixa etária de 15-45 anos.

CoVar	B	SE	Wald	df	Sig	Exp(B)
IPS	2,316	0,648	12,755	1	0,0001	10,133
MMP9	1,347	0,680	3,928	1	0,047	3,847
CASP1	-	-	-	1	0,405	-

Figura 21: Análise multivariada de mortes relacionadas à doença (Modelo de Regressão de Cox).

5 DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE FUNCIONAL DO PADRÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA EBV-POSITIVO E EBV-NEGATIVO, E SUAS IMPLICAÇÕES NA PATOGENIA DO LHC

5.1.1 Análise em linhagens celulares

A análise em linhagens celulares realizada neste estudo (figuras 12 e 13, e tabelas 7 e 8) aponta para a expressão de numerosos genes envolvidos em uma miríade de processos biológicos, que refletem diversos mecanismos utilizados pela célula transformada para garantir sua sobrevivência.

Estes mecanismos incluem a expressão de genes envolvidos na comunicação entre as CHRS e o meio que as cercam, representados na análise de expressão gênica, entre outros, pela via de interação citocina-receptor de citocina e o processo biológico de quimiotaxia. Ambas as abordagens de análise (análise “DAG” representada nas figuras 12 e 13 e análise de vias “KEGG” nas tabelas 7 e 8) exibem grupos de genes aparentemente mais expressos em casos EBV-negativos ou positivos. Não há, em nenhum dos grupos, um gene comum que tenha sido identificado, sugerindo que, dentro de uma via ou processo biológico a célula neoplásica EBV-positiva utiliza estratégias distintas da célula EBV-negativa para atingir o mesmo objetivo de regulação. Numerosas destas citocinas e quimiocinas já foram identificadas nas CHRS, como IL-4, IL-13, CCL5 (RANTES) e CCL22, que atraem células T CD4+ do tipo TH2 para o infiltrado inflamatório. A manutenção de um ambiente do tipo TH2 (humoral) sobre o tipo TH1 (anti-

celular) tem como finalidade favorecer a promoção do crescimento tumoral. Embora citocinas relacionadas a resposta do tipo TH1 tenham sido identificadas em nossa análise (IL12A e IL12B), assim como em outros estudos (SKINNIDER e MAK 2002; CHETAILE et al. 2009) é provável que a predominância de citocinas do tipo TH2 no ambiente inflamatório possa prevenir o desenvolvimento de uma resposta imune mediada por células (TH1) efetiva.

O recrutamento de células Treg é realizado por CCL5 (RANTES), CCL17 (TARC), CCL20 e CCL22 (KÜPPERS 2009), sendo que em nossa análise houve uma expressão gênica preferencial de CCL5 nas linhagens EBV-negativas e de CCL20 e CCL22 na linhagem EBV-positiva. O interesse no papel das células Treg como componentes do infiltrado inflamatório do LHC deve-se ao seu papel na inibição da atração de células T CD8+ citotóxicas para a proximidade da célula neoplásica, constituindo um mecanismo de evasão ao sistema de vigilância imunológica do organismo (KÜPPERS 2009). Embora não haja relato anterior de sua expressão em LHC, XCL1 (“linfotactina”), uma quimiocina com estrutura relativamente semelhante à das quimiocinas do tipo CC e CXC, pode inibir a atividade de células T citotóxicas e células NK através do recrutamento de células Treg, podendo constituir-se em uma estratégia adicional das CHRS EBV-negativas para atrair células Treg para o infiltrado inflamatório do LHC (NGUYEN et al. 2008).

Estes achados sugerem que mecanismos alternativos estão implicados na atração de células inflamatórias, particularmente células TH2 e Treg, para o ambiente que envolve as células neoplásicas em casos EBV-positivos e negativos (Figura 22).

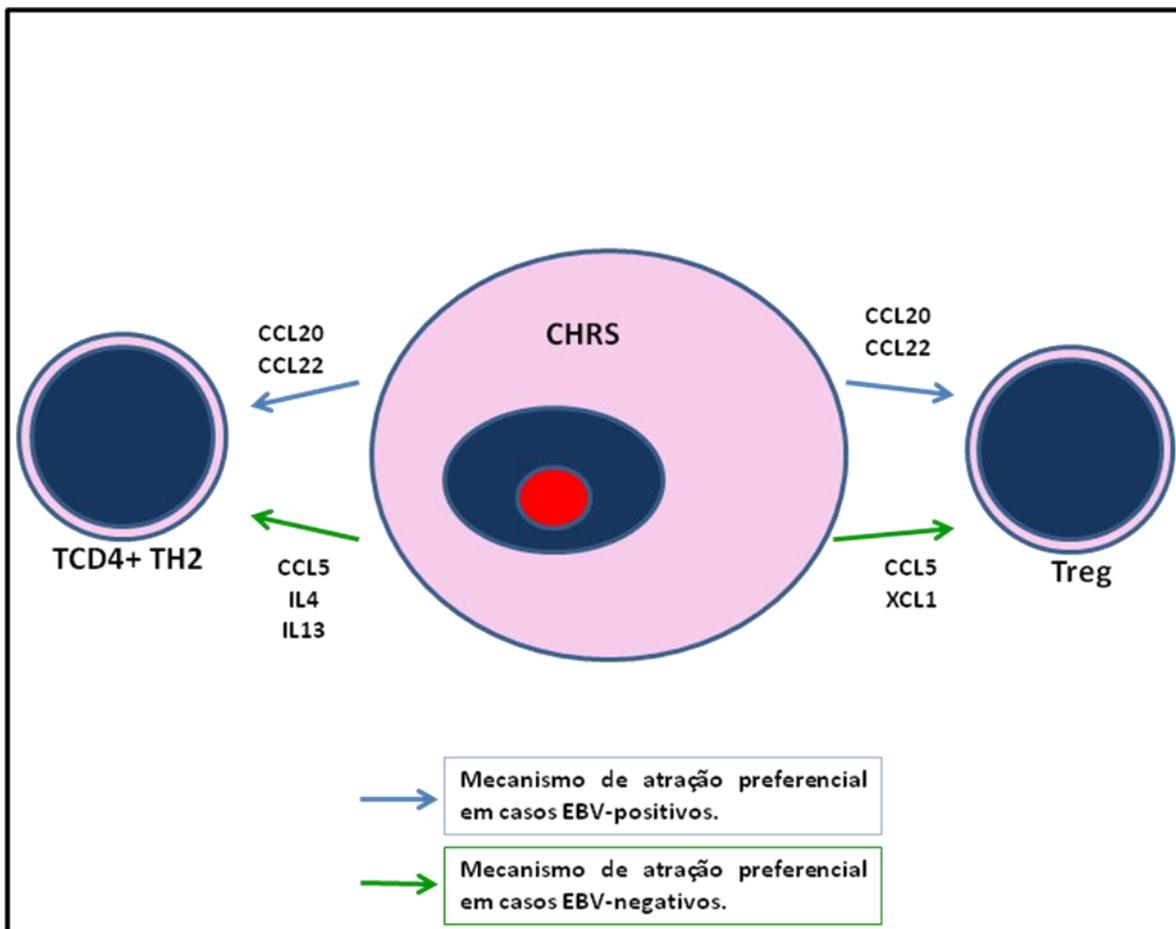


Figura 22: Interação entre a célula de Hodgkin-Reed-Sternberg. Células T regulatórias (Treg) e células TCD4+ do tipo TH2: Células Treg estão presentes no ambiente inflamatório do LHC tanto em casos EBV-positivos quanto EBV-negativos, sendo responsáveis, através da secreção de IL-10, pela inibição da atração de células T CD8+ citotóxicas para o ambiente inflamatório tumoral. Os dados de análise de expressão gênica e imunistoquímica sugerem que atração destas células ocorre por vias distintas em casos EBV-positivos e EBV-negativos. Células TCD4 do tipo TH2 (humoral) predominam no ambiente inflamatório do LHC em relação a células do tipo TH1 (imunidade celular). A manutenção, pela célula tumoral, de um ambiente rico em células do tipo TH2 e células Treg tem por finalidade evadir o sistema de vigilância imune do organismo.

Um fenômeno a ser considerado na patogenia do LHC é a influência de uma via de sinalização na atividade de outras vias e processos biológicos. Várias das citocinas produzidas pelas CHRS sinalizam pela via JAK/STAT. Receptores de citocina presentes na superfície celular ativam membros da família JAK, que fosforilam fatores STAT, os quais translocam-se para o núcleo da célula, onde funcionam como fatores de transcrição de genes envolvidos proliferação celular e apoptose. Alterações na via de sinalização JAK/STAT já foram identificadas no LHC, tanto através da amplificação do gene JAK2, o qual apresenta sua atividade de tirosino-quinase permanentemente ativada (JOOS et al. 2000), quanto através da mutação de SOCS1, inativando o mecanismo de regulação negativa desta via e permitindo a acumulação de STAT5 (WENIGER et al. 2006). Entretanto, na análise de expressão gênica realizada neste estudo, observa-se também um aumento da expressão de diferentes receptores de citocina envolvidos na ativação de JAK em linhagens EBV-negativas (IL5RA, IL13RA1, IL10RA e IL22RA1) e EBV-positivas (GHR, IL6R, CSF2RA), o que sugere mecanismos adicionais de ativação desta via além dos acima descritos.

Além disso, SOCS3 e CBLB, que na via JAK-STAT tem a finalidade de inibir a atividade tirosino-quinase de JAK, possuem também capacidade de modular o sistema imune, o que os torna candidatos adicionais ao papel de moduladores do ambiente inflamatório encontrado no LHC. A expressão aumentada de SOCS3 favorece uma resposta TH2 sobre TH1 ao inibir IL-12 (ANSEL et al. 2006). CBLB, uma E3-ubiquitina-ligase, é capaz de regular a atividade de linfócitos TCD8 vírus-específicos de maneira a impedir uma atividade citotóxica exacerbada, que levaria a dano tissular na tentativa de

impedir uma infecção viral crônica (OU et al. 2008). Na análise de expressão gênica realizada neste estudo, observa-se um aumento da expressão CBLB na linhagem EBV-positiva, o que pode explicar a ausência de células T CD8+ citotóxicas vírus-específicas no ambiente inflamatório do LHC. Esta hipótese é reforçada pela observação de que linfócitos TCD8 EBV-específicos não são encontrados em casos de LHC EBV-positivos. Os linfócitos T CD8+ citotóxicos observados são raros, não estão em contato com as CHRS e não parecem estar direcionados à presença do EBV nestas células (SKINNIDER e MAK 2002). Desta forma, a expressão aumentada de SOCS3 e CBLB observada na linhagem EBV-positiva não teria a função de contrabalançar a ativação constitutiva da via JAK/STAT e sim de modular o sistema imune do organismo para permitir a evasão das CHRS. Um modelo para esta hipótese está exemplificado na Figura 23.

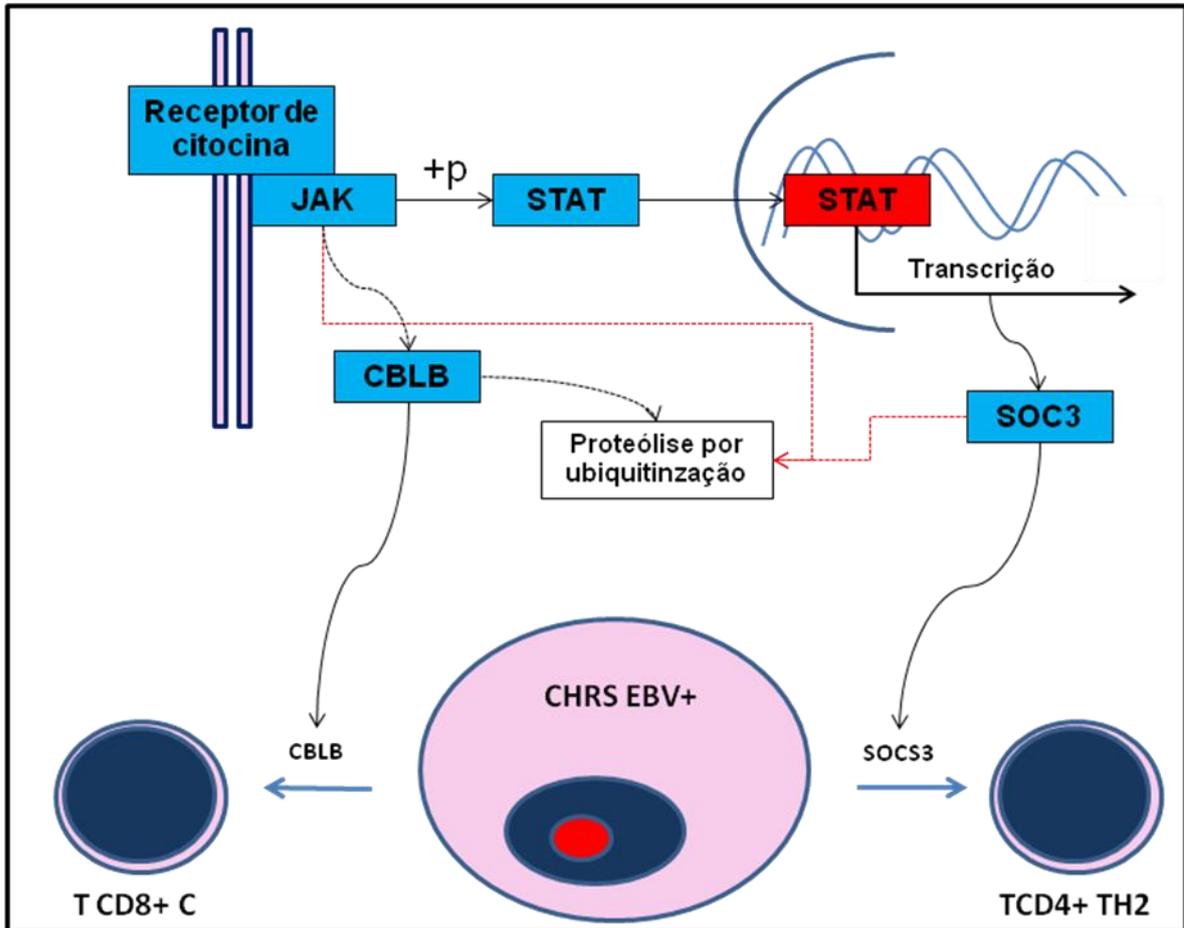


Figura 23: Papel alternativo para SOCS3 e CBLB na patogênese do LHC: SOCS3 e CBLB estão relacionados à degradação de JAK via ubiquitinação. A via JAK-STAT encontra-se constitutivamente ativada no LHC, seja por amplificação do gene JAK2, seja por mutação inativadora de SOCS1, também responsável pela ubiquitinação de JAK2. O papel alternativo de SOCS3 envolveria o recrutamento de linfócitos TCD4+ do tipo TH2 para o ambiente inflamatório que circunda as células de Hodgkin-Reed-Sternberg (CHRS) associadas ao vírus de Epstein-Barr (EBV). Já o aumento da expressão de CBLB envolveria o recrutamento de linfócitos TCD8+ citotóxicos inespecíficos, inibindo a formação de resposta imune EBV-específica.

A família de receptores “Toll-like” (“Toll-like receptors” ou TLR) está envolvida no reconhecimento de numerosos agentes patogênicos como vírus, bactérias e fungos. Além disso, parece participar na resposta imune a auto-antígenos e alo-antígenos (LIU e ZAO 2007). O encontro de genes diferencialmente expressos relacionados a esta via em linhagens de LHC sugere a utilização da mesma pelas CHRS em processos como sinalização cruzada de múltiplas vias como NFkB, JAK/STAT e MAPK/AP-1, e regulação do sistema imune.

É sabido que a sinalização via TLR resulta na ativação das vias envolvidas na ativação de genes relacionados à resposta inflamatória, como NFkB e MAPK (HU et al. 2007). Como a patogênese do LHC está intimamente associada a alterações na via de NFkB, a estimulação da mesma via TLR pode constituir-se em um mecanismo alternativo aos já conhecidos, particularmente nos casos de LHC não-associados à infecção pelo EBV, em que mutações no gene NFKBIA (que codifica a proteína IκB-alfa) parecem ocorrer em apenas 10 a 15% das vezes (LAKE et al. 2009). De acordo com a análise de expressão gênica conduzida neste estudo, a ativação de NFkB em casos de LHC EBV negativos poderia envolver o aumento da expressão do gene TLR3. A proteína codificada por este gene é do tipo transmembrana, contendo um domínio citoplasmático TIR (“Toll/interleukin receptor”) que liga-se ao domínio correspondente da proteína adaptadora TRIF (“TIR-domain-containing adaptor-inducing Interferon-beta”). Esta interação leva à ativação de NFkB pelo recrutamento de RIP1 (“receptor-interacting protein 1”) e TRAF6 (“TNF-receptor-associated factor 6”), seguida pelo recrutamento de TAK1 (“TGF-beta activated kinase 1”). TAK1 fosforila IKKB-alfa e IKKB-beta, que por sua vez

fosforilam I κ B-alfa, inibidor de NF κ B. A fosforilação de I κ B-alfa leva à sua degradação, permitindo a translocação de NF κ B para o núcleo da célula. Além disso, TAK1 também é capaz de ativar p38, levando à ativação de membros de transcrição da família AP-1. Curiosamente, a análise funcional de genes diferencialmente expressos em amostras de tecido fresco congelado de LHC apontou p38 como um gene mais expresso em amostras EBV-positivas que EBV-negativas. De fato, TLR3 é descrito como um receptor ativado por RNA de fita dupla de origem viral, o que explicaria a ativação de TLR3 em casos EBV-positivos e não em casos EBV-negativos. Entretanto, há indícios de que outras moléculas endógenas não-virais ainda não conhecidas ou RNA celular poderiam agir como ligantes endógenos de TLR3 (VERCAMMEN et al. 2008), o que explicaria sua maior expressão nas linhagens celulares EBV-negativas. Um esquema do possível papel de TLR3 na ativação de NF κ B e AP-1 em LHC está ilustrado na Figura 24.

A ativação de NF κ B em alguns casos de LHC poderia também ser explicada por sinalização via PI3K ("Phosphatidylinositol 3-kinase") e AKT. A proteína AKT é uma serina/treonina tirosino quinase que, quando ativada por PI3K, promove proliferação celular através da ativação de fatores que regulam o ciclo celular e apoptose. Tanto PI3K quanto AKT são expressos pelas CHRS (GEORGAKIS et al. 2006). Os achados de expressão gênica deste estudo sugerem a ativação da mesma via em diferentes pontos pelas CHRS EBV-negativas (através do aumento de expressão de PI3K) e EBV-positivas (através do aumento de AKT3). Entretanto, estudos anteriores não observaram uma diferença de expressão de AKT fosforilada em casos de LHC EBV-positivos e EBV-negativos (MORRISON et al. 2004; DUTTON et al. 2005).

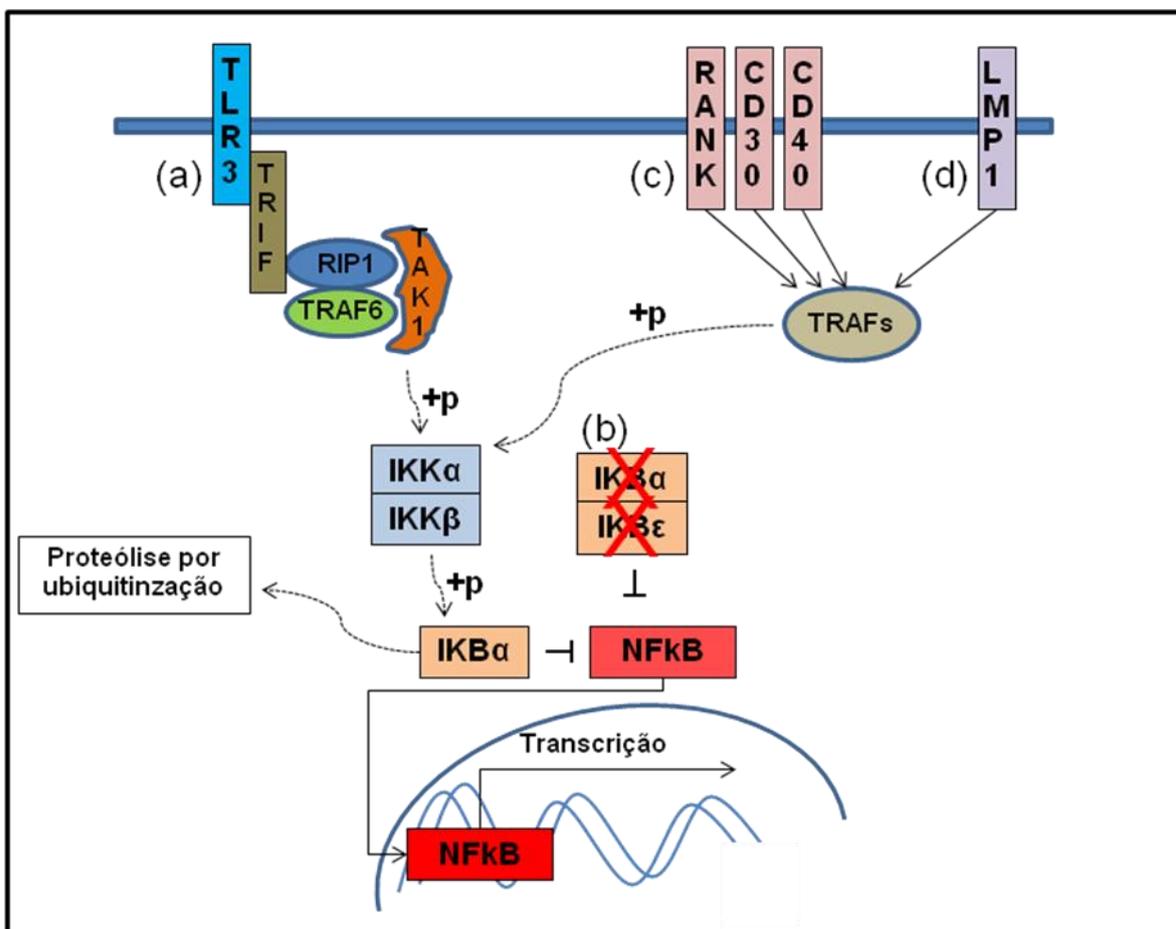


Figura 24: Papel alternativo de TLR3 na ativação de NFκB em LHC. (a) A ativação de TLR3 e interação com TRIF leva ao recrutamento de RIP1, TRAF6 e TAK1, com conseqüente fosforilação de IKK-alfa e IKK-beta e posterior fosforilação de IKB-alfa. A conseqüente degradação de IKB-alfa permite a translocação de NFκB ao núcleo da célula e ativação da transcrição. Em (b) está demonstrado o mecanismo de inativação por mutação de IKB-alfa e IKB-epsilon, encontrado em 10-15% dos casos de LHC EBV-negativos. Em (c) está representada a ativação da via canônica de NFκB através de sinais emitidos por RANK, CD30 e CD40, que ativam IKKs via TRAFs. Em (d) está representado o mecanismo de mimetização da sinalização via CD40 feito por LMP1 em casos EBV-positivos.

5.1.2 Análise em amostras de tecido fresco congelado:

A grande porcentagem de células inflamatórias encontrada no LHC e a influência do padrão de resposta imune em sua progressão e prognóstico (ALVARO et al. 2005; ENBLAD et al. 2007; KELLEY et al. 2007; SCHRECK et al. 2009) demonstram a necessidade da utilização, em estudos de expressão gênica, de RNA extraído não apenas de linhagens celulares ou CHRS microdissecadas, mas também de amostras de tecido total (SÁNCHEZ-AGUILERA et al. 2006; CHETAILLE et al. 2009).

A importância da participação de genes envolvidos na regulação do ciclo-celular na patogênese de casos de LHC foi demonstrada quando o padrão de expressão gênica em ambos os grupos foi analisado do ponto de vista funcional (vide item 4.1.2.2).

Em amostras EBV-positivas, foram considerados relevantes genes relacionados à modificação de proteínas e envolvidos na regulação do ciclo celular e processo de mitose, como os genes CDC2 e AURKB (cuja validação por imunistoquímica será discutida no item 5.3).

O gene CDC2 ("Cell Division Cycle 2") codifica uma proteína serina/treonina quinase essencial na regulação da transição da fase G1/S e G2/M do ciclo celular em células eucariotas, sendo sua expressão aumentada tanto em linhagens de LHC quanto em amostras de tecido fresco congelado de pacientes refratários a tratamento (SÁNCHEZ-AGUILERA et al. 2006; CHETAILLE et al. 2009). Os mecanismos pelos quais a expressão de CDC2 é regulada nas CHRS ainda são desconhecidos. Em casos associados a infecção pelo EBV, a regulação de CDC2 poderia ser regulada por LMP-1, através da ativação das via de sinalização de NFkB e AP1 (DENG et al. 2003).

AURKB (“Aurora Kinase B” ou “Aurora B”) é uma quinase envolvida na segregação dos cromossomos durante os processos de mitose e meiose, cuja expressão encontra-se desregulada em vários tipos de neoplasias (LAMPSON et al. 2004). A hipótese para o padrão de marcação nuclear de fraca intensidade observado em CHRS isolada é descrito adiante, no item 5.3.

A importância de alterações na regulação do ciclo celular na patogênese do LHC também é demonstrada pelo achado, em amostras EBV-negativas, de hiperrrepresentação de genes como HDAC4, CDK9 e ZBTB7A.

HDAC4 (“Histone Deacetylase 4”) pertence a uma classe de histonas envolvidas no controle da progressão do ciclo celular por alterar a estrutura cromossômica. HDAC4 possui a habilidade de restringir a transcrição de um determinado gene quando ligada à sua região promotora (WADE 2001; VERDIN et al. 2003).

CDK9 (“Ciclin-dependente kinase 9”) codifica uma proteína pertencente a uma família de quinases com importante função na regulação do ciclo celular. A expressão de CDK9 é freqüente e encontrada em altos níveis em diversos tipos celulares, particularmente em tecidos diferenciados, sugerindo um papel em funções especializadas dentro das células. Recentemente foi observado que a interação entre CDK9 e ciclina T parece ter um papel importante no processo de diferenciação de linfócitos B dentro do centro germinativo e que sua desregulação poderia ter um papel no processo de linfomagenese (BELLAN et al. 2004; DE FALCO et al. 2008).

ZBTB7A (“Zinc finger and BTB domain containing 7A” ou “Pokemon”) é um proto-oncogene cuja superexpressão já foi identificada em linfomas não-Hodgkin, onde parece exercer um efeito cooperativo com BCL6 no processo de

imortalização de linfócitos B (MAEDA et al. 2005). Não há, na literatura, descrição de sua expressão e papel na patogênese do LHC.

O encontro de expressão aumentada do gene TSC22D3 (GILZ, do inglês “Glucocorticoid-induced leucine zipper”) em amostras EBV-negativas em relação a amostras EBV-positivas levanta a hipótese da participação deste gene na desregulação do sistema imune e conseqüente falha na imunovigilância observado no LHC. Macrófagos (que participam do infiltrado inflamatório no LHC) e células dendríticas são a maior fonte de TSC22D3/GILZ em humanos, onde a expressão deste gene é desencadeada por glucocorticóides e IL-10. Além disso, células dendríticas que expressam TSC22D3/GILZ induzem a produção de células Treg (BERREBI et al. 2003; HAMDÍ et al. 2007). No LHC, a produção de IL-10 tanto por CHRS quanto por células Treg inibe o recrutamento de células TCD8+ citotóxicas para o ambiente inflamatório do LHC, favorecendo a sobrevivência das células neoplásicas (KÜPPERS 2009). Desta forma, seria interessante a investigação da expressão de TSCD3/GILZ por CHRS, por macrófagos ou por células dendríticas do ambiente inflamatório como um mecanismo adicional de recrutamento de células Treg no LHC EBV-negativo. Esta hipótese está representada na Figura 25.

As hipóteses acima apresentadas, embora sugiram a existência de mecanismos de regulação distintos de acordo com a presença ou ausência de infecção por EBV, ao envolverem as mesmas vias de sinalização, apontam para o fato de que, independentemente desta associação, o LHC parece ser uma entidade única, fato abordado no item a seguir.

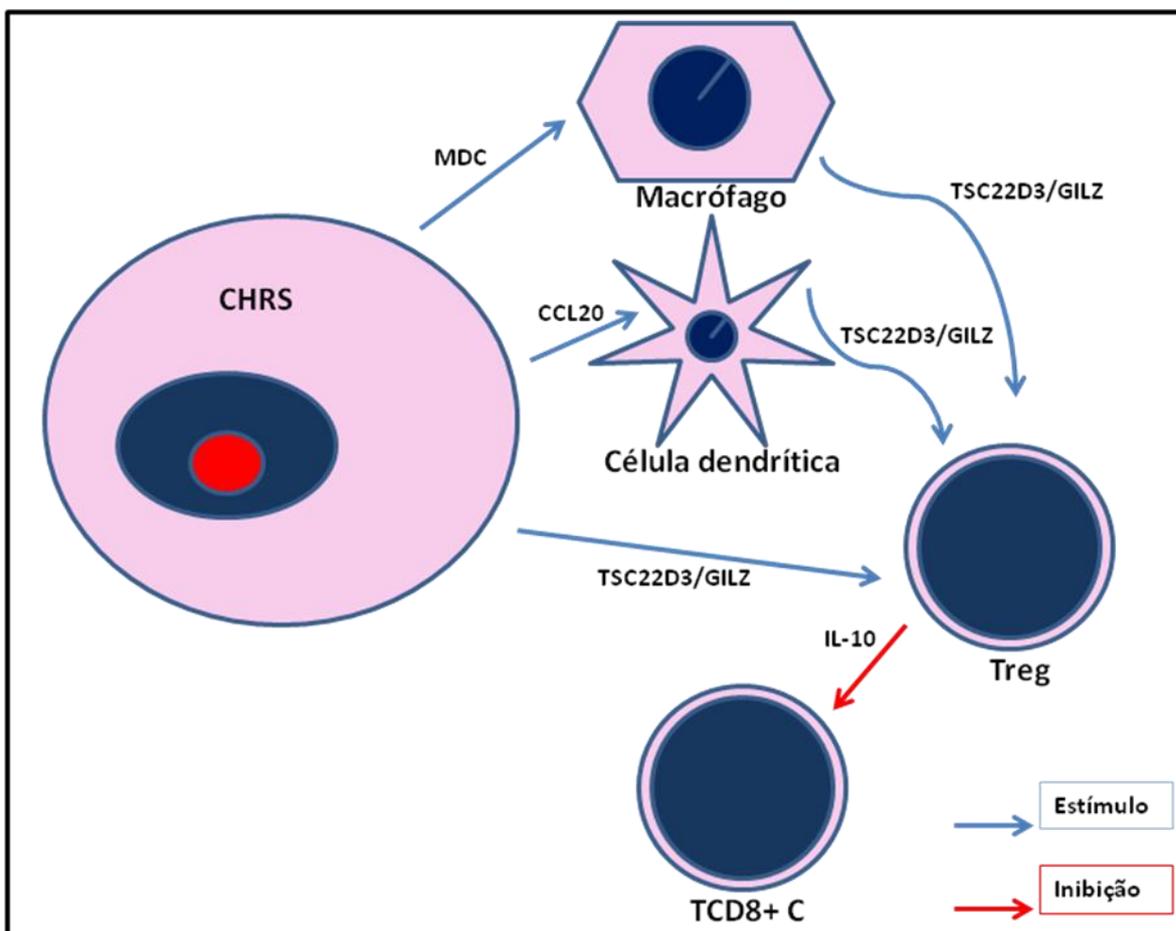


Figura 25: Hipóteses para o papel de TSC22D3/GILZ na ativação de linfócitos T regulatórios (Treg) em LHC. A ativação de linfócitos T regulatórios no LHC, com conseqüente inibição da atividade de linfócitos TCD8+ citotóxicos (TCD8+ C) e evasão imune das células de Hodgkin-Reed-Sternberg (CHRS) poderia ocorrer por via indireta, através de ativação, pelas células neoplásicas, de macrófagos e células dendríticas (respectivamente, pela produção de MDC e CCL20), com conseqüente produção por estas células de TSC22D3/GILZ e atração de linfócitos T regulatórios; por via direta, pela produção de TSCDD23/GILZ pelas próprias células neoplásicas. Os linfócitos T regulatórios presentes no ambiente inflamatório, através da produção de IL-10, inibem a atividade de células TCD8+ citotóxicas responsáveis pelo mecanismo de vigilância imune, permitindo então a evasão das CHRS.

5.2 O LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO COMO ENTIDADE ÚNICA - SEPARAÇÃO ENTRE CASOS PRIMÁRIOS EBV-POSITIVOS E EBV- NEGATIVOS POR CLUSTERIZAÇÃO HIERÁRQUICA

A maioria das publicações acerca do padrão de expressão gênica em LHC utiliza linhagens celulares de CHRS (SCHWERING et al. 2003; KÜPPERS et al. 2003), havendo na literatura poucos estudos que utilizaram a mesma abordagem com amostras de tecido a fresco congelado. DEVILARD et al. (2002) estudaram os níveis de expressão de mRNA de aproximadamente 1000 genes em 21 amostras de LHC, além de 13 amostras adicionais de condições linfóides benignas, outros linfomas não-Hodgkin (LNH), e linhagens celulares, tendo observado a existência de uma assinatura gênica específica para os casos de LHC, dividida em um grupo contendo 6 casos do tipo esclerose nodular associados a bom prognóstico, um grupo contendo 8 casos do tipo celularidade mista, também associados a bom prognóstico, e um grupo contendo 7 casos do tipo esclerose nodular que foram associados a pior prognóstico e doença progressiva. Em conjunto, os casos associados a pior prognóstico apresentaram uma assinatura distinta dos casos associados a bom prognóstico, caracterizada principalmente pela diminuição da regulação de genes supressores de tumor como PTEN e DCC e aumento da regulação de genes como MMP2, MMP3, TIMP1 e PDGFRB. Não houve comparação em relação à associação com infecção pelo EBV.

Em 2005, KARUBE et al. utilizaram a metodologia de microarranjos de cDNA para o estudo do padrão de expressão de 140 genes relacionados à produção de citocinas/quimiocinas em 14 casos de LHC, utilizando mRNA

proveniente de CHRS isoladas por microdissecção a laser. Embora tenham identificado um aumento da expressão de numerosas citocinas em CHRS quando comparadas a células obtidas de centros germinativos, a clusterização hierárquica não distinguiu os subtipos de LHC incluídos no estudo (esclerose nodular e celularidade mista) ou mesmo casos EBV-positivos de EBV-negativos.

Em 2006, SÁNCHEZ-AGUILERA et al. analisaram novamente o padrão de expressão gênica em 29 amostras de LHC, intencionalmente divididas em 2 grupos pré-selecionados (um grupo contendo 14 casos com prognóstico favorável e outro grupo contendo 15 casos com prognóstico desfavorável). A expressão de alguns genes identificados na análise foi pesquisada por imunohistoquímica em um TMA com amostras de 235 pacientes, entre eles um gene também identificado na análise de casos de LHC no presente projeto (CDC2). A relação entre expressão gênica e “status” de infecção pelo EBV não foi abordada.

Em 2009, o primeiro estudo utilizando um número maior de casos de LHC (n=63) estudou o padrão de expressão gênica em relação ao prognóstico e presença de infecção por EBV, tendo identificado um padrão de expressão gênica típico de casos EBV-positivos, caracterizado por resposta imune do tipo TH1 e resposta a vírus. Além disso, foi possível também separar os casos estudados segundo subtipo histológico (celularidade mista *versus* esclerose nodular) e segundo prognóstico clínico (CHETAILLE et al. 2009).

No presente estudo, os casos de LHC EBV-positivos foram discriminados dos casos EBV-negativos por 26 genes (vide item 4.1.2.1 e figura 14), subdivididos em 2 grupos contendo genes mais expressos em

amostras EBV-positivas, a maioria sem função celular bem caracterizada (NPL, GZMH, CIRBP, AHI1, LTBP3, CST7, RAB42, FLJ20581, FCN1, LIPA e HLA-DRB6, todos presentes no “Cluster A”) e um gene (KLCR2, pertencente ao “Cluster C”) que codifica uma lecitina implicada na regulação da função de células NK. Além disso, KLCR2 (também conhecida como NKG2C) parece estar envolvida na regulação da ativação de subtipos específicos de células T citotóxicas. Esta assinatura não apresenta semelhanças com a observada por CHETAILLE et al. (2009), que observaram um padrão de expressão gênica em casos EBV-positivos característico de resposta imune do tipo TH1 e antiviral, com a exceção de KLCR2 (NKG2C), que poderia estar associado à regulação imune em pacientes EBV-positivos.

O segundo grupo (“Cluster B”) contém genes menos expressos em casos EBV-positivos que em casos EBV-negativos. Neste grupo estão genes envolvidos na regulação do ciclo celular (CDC2, E2F7, NEK2, RPRM e NCAPG), além de genes envolvidos na resposta celular a drogas quimioterápicas (TRO e RDM1, ambos relacionados à sensibilidade celular a cisplatina). Curiosamente, no estudo de SÁNCHEZ-AGUILERA et al. (2006) foi também identificado um “cluster” de assinatura gênica contendo genes envolvidos na regulação do ciclo celular (incluindo CDC2) e resposta à quimioterapia, embora não tenha havido associação deste tipo de assinatura ao “status” de infecção pelo EBV. Como a cisplatina é um componente de regimes de quimioterapia de resgate (por exemplo, ESHAP) adotados nos 10 a 20% dos casos que não respondem ao tratamento de primeira linha com ABVD ou BEACOPP (TODD et al. 2009), podem ser interessantes estudos que investiguem a influência da expressão de TRO e/ou RDM1 em casos de LHC

selecionados para tratamento de resgate com regimes que possuem a cisplatina como um dos seu componentes.

Em resumo, no presente estudo identificamos um padrão de assinatura gênica capaz de separar casos EBV-positivos de casos EBV-negativos. Entretanto, a observação de que em 2 dos grupos de genes o nível de expressão está aumentado (“Cluster A”) ou diminuído (“Cluster B”) em ambos os grupos em relação ao “pool” de referência sugere que, tanto em casos EBV-positivos quanto EBV-negativos, processos-chave encontram-se alterados, particularmente aqueles relacionados à regulação do ciclo-celular e quimioresistência. O encontro de alterações semelhantes em estudos paralelos (SÁNCHEZ-AGUILERA et al. 2006) aponta a necessidade de estudos aprofundados que investiguem o potencial do desenvolvimento de tratamentos direcionados à abordagem destes processos.

5.3 VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES POR IMUNOISTOQUÍMICA ATRAVÉS DO MÉTODO DE *TISSUE MICROARRAY*

Esta etapa do projeto tem a importância de validar a utilização da plataforma de TMA no estudo de LHC, apesar da heterogeneidade celular e escassez de células neoplásicas características desta neoplasia. A perda máxima de casos avaliáveis por esta técnica foi de 22,30%, que pode ser minimizada através da utilização de um número maior de lâminas para avaliação de cada anticorpo testado, ou a adoção da amostragem em triplicata.

A validação dos resultados obtidos na análise de expressão gênica utilizou marcadores representativos de vias envolvidas na regulação do ciclo-celular (CDC2 e Aurora B), regulação da via de NFkB e MAPK (Caspase-1), desenvolvimento do sistema imune (MMP9), interação citocina-receptor de citocina/quimiotaxia (CCL20) e adesão focal (Caveolina-1). Conforme pode ser observado nas Figuras 18 e 19, todos os anticorpos (à exceção de MMP9) apresentaram marcação predominante nas células neoplásicas.

A freqüente positividade para CDC2 (75,68% dos casos) e Aurora B (58,78% dos casos) demonstra a importância de alterações no ciclo-celular e regulação do processo mitótico na biologia das CHRS. SÁNCHEZ-AGUILERA et al. (2009) também estudaram o padrão de expressão imunoistoquímica de CDC2 em um TMA com 235 amostras, não relatando entretanto a frequência de marcação na série estudada. Embora os métodos de avaliação da positividade de CDC2 tenham sido diferentes (no presente estudo foram considerados positivos os “scores” 2 e 3 de marcação das CHRS, ao passo que no artigo de SÁNCHEZ-AGUILERA et al. (2009) foi utilizada uma metodologia automatizada de avaliação, com divisão da intensidade de marcação em quartis) não houve alteração no prognóstico dos pacientes em relação à expressão imunoistoquímica deste marcador.

Não há relatos na literatura da avaliação imunoistoquímica de Aurora B em LHC. Neste estudo observou-se um padrão de marcação nuclear predominante nas CHRS, além de raras células do infiltrado inflamatório. Conforme relatado no item 5.1.2, Aurora B (ou Aurora Kinase B) é uma quinase envolvida na segregação dos cromossomos durante os processos de mitose e meiose. A desregulação da função desta kinase pode estar envolvida nas

alterações morfológicas (multinucleação) e cromossômicas (instabilidade, alterações centrossômicas) características das células de Reed-Sternberg (MARTÍN-SUBERO et al. 2003; HONTZ et al. 2007). À semelhança de CDC2, não foi observada relação entre a expressão de Aurora-B e “status” de infecção pelo EBV, assim como influência prognóstica.

Não há relatos acerca da expressão imunohistoquímica de Caspase-1 em LHC. Esta enzima está presente no citosol celular como um zimógeno inativo (ou pró-enzima), o qual, após estimulação por sinais endógenos ou externos (por exemplo, infecção), se transforma em Caspase-1 enzimaticamente ativa. A ativação de Caspase-1 leva a ativação de IL-1-beta e IL-18, com conseqüente recrutamento de células inflamatórias (FRANCHI et al. 2009). No presente estudo, a expressão desta proteína foi observada em 38,51% dos casos analisados, predominantemente nas CHRS. Não houve associação entre a expressão de Caspase-1 e infecção pelo EBV. Entretanto, em pacientes na faixa etária de 15 a 45 anos, a expressão de Caspase-1 associou-se a pior prognóstico ($p=0,0302$). Esta proteína possui papel na ativação de *NFkB* e *MAPK*, com conseqüente produção de citocinas pro-inflamatórias e ativação de genes anti-apoptóticos (LAMKANFI et al. 2007), o que levanta a hipótese de sua participação nos processos de proliferação sustentada das CHRS. O aumento de sua expressão foi reportado em linfomas não-Hodgkin, entre os quais o linfoma cutâneo de células T, uma neoplasia que, à semelhança do LHC, apresenta um padrão de resposta imune predominantemente TH2, o que faz supor que o aumento de CASP1, nestas duas neoplasias, também está associado a um estado de imunidade celular não-efetiva (ALIZADEH et al. 2000; YAMANAKA et al. 2006). Além disso, há evidências de que

polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphisms* ou SNPs) no gene *CASP1* estão associados a aumento de risco de desenvolvimento de linfomas não-Hodgkin (LAN et al. 2009). Por outro lado, estudos em tumores de origem mesenquimal e epitelial (SOUNG et al., 2008; KYM et al., 2009) encontraram raras mutações no gene *CASP1*. Portanto, ainda que tenhamos identificado a expressão desta proteína em CHRS, são necessários estudos adicionais para elucidar o estímulo responsável pela sua ativação, incluindo a possibilidade de que alterações gene *CASP1* estejam associadas à patogênese do LHC.

A expressão de metaloproteases é freqüente em tumores malignos, sendo comumente associada a fenômenos de invasão e metástase. Além disso, em tumores associados à infecção pelo EBV, a expressão de MMP9 parece ser mediada por LMP-1, através da ativação das vias de NFkB e AP-1 (YOSHIZAKI et al. 1998). Em linfomas não-Hodgkin, a expressão de MMP9 tem sido associada a uma maior agressividade e pior prognóstico (SAKATA et al. 2004). Em nosso estudo, é interessante encontrar a expressão deste gene (preferencialmente nas linhagens celulares EBV-negativas) agrupada sob o processo biológico “desenvolvimento do sistema imune”, sugerindo um papel preferencial desta metaloprotease em fenômenos associados à migração de leucócitos e modulação de citocinas, uma hipótese levantada primeiramente por CREIGHTON e HANASH (2003). Estes autores analisaram os dados de expressão diferencial de mRNA de adenocarcinomas de pulmão, cólon e ovário publicados por outros autores, discutindo a possibilidade de MMP9 não possuir o papel tradicionalmente associado ao grupo de metaloproteases em cancer (modificar a matriz extracelular, permitindo o processo de invasão pelas células

neoplásicas). A hipótese apresentada, que acreditamos ser plausível e merecedora de maiores investigações, é a produção de MMP9 por células tumorais regular o sistema imune, permitindo o não reconhecimento das células neoplásicas pelo organismo. Na etapa de validação por imunohistoquímica, a expressão de MMP9 foi observada em 52,03% dos casos de LHC estudados, não havendo associação com infecção pelo EBV. Entretanto, a expressão desta metaloprotease associou-se a pior prognóstico em pacientes na faixa etária de 15 a 45 anos, em discordância com os achados observados por FLAVELL e colaboradores (2000). Além disso, na análise multivariada por nós realizada, a expressão de MMP9 por CHRS manteve-se como fator prognóstico independente de IPS. À semelhança do que foi referido por este autor, observamos uma marcação intensa não apenas nas CHRS, mas também em várias células do infiltrado inflamatório circundante. Como a ativação constitutiva de *NFkB* é um evento comum no LHC, independente da presença ou ausência de infecção pelo EBV, a expressão de MMP9 em CHRS pode ser derivada da atuação da proteína NFkB na região promotora do gene *MMP9*. A nosso ver, o uso potencial de inibidores de MMP9 em LHC necessita de um melhor entendimento da participação desta metaloprotease na patogênese do LHC, principalmente o seu provável papel no escape imunológico das células neoplásicas.

Não há relatos da expressão de Caveolina-1 em linfomas. Caveolina-1 pertence a uma família de proteínas responsáveis pela formação de “caveolas”, invaginações da membrana plasmática encontradas em diversos tipos celulares, com importante função no transporte vesicular, homeostase de colesterol e regulação na transdução de sinais. Embora seja uma proteína

geralmente encontrada na membrana celular, Caveolina-1 também é encontrada em outros compartimentos celulares, como o citoplasma, mitocôndrias e mesmo no núcleo (QUEST et al. 2008). O papel da Caveolina-1 na biologia tumoral tem sido extensivamente estudado, parecendo exercer atividades supressoras ou promotoras de tumorigênese, de acordo com o tipo celular estudado. Nós observamos tanto marcação de padrão membranáceo quanto citoplasmática nas células neoplásicas, com reforço na região do complexo de Golgi. Este padrão está de acordo com a síntese de Caveolina-1, que é inserida no retículo endoplasmático e enviada ao complexo de Golgi, onde após oligomerização, é enviada à superfície celular para formação das cavéolas. Entretanto, mesmo nos casos positivos a expressão não é freqüente, o que levanta a hipótese de que, em CHRS, atividade de Caveolina-1 poderia estar diminuída. Embora não tenhamos observado associação entre expressão de Caveolina-1 pelas CHRS e infecção pelo EBV, ou influência da expressão de Caveolina-1 na sobrevida dos pacientes estudados, as implicações desta hipótese (perda de expressão de caveolina-1 pelas CHRS) são as seguintes:

- a) A perda de expressão de Caveolina-1 pelas CHRS levaria a um aumento de estímulo proliferativo por ativação da via de sinalização *JAK2/STAT5a*, devido à redução da inibição da inibição de *JAK2* pela sua interação com Caveolina-1 (PARK et al. 2002). Como se sabe, a via de sinalização *JAK2/STAT5a* está constitutivamente ativada nas CHRS (KÜPPERS 2009). Além dos mecanismos já conhecidos de amplificação de *JAK2* e inativação de *SOCS1* (um inibidor desta via), a perda da expressão de Caveolina-1 poderia se constituir em um mecanismo adicional.

- b) A perda da expressão de Caveolina-1 pelas CHRS poderia colaborar para evasão imune destas células, à semelhança do observado em células endoteliais, nas quais a perda da expressão de caveolina-1 levou a uma diminuição da adesão de leucócitos TCD8 (BOUZIN et al. 2007).

Dos marcadores estudados no set de validação, apenas a expressão de CCL20 pelas CHRS correlacionou-se positivamente com a presença de infecção pelo EBV ($p < 0,0001$). Este achado valida a observação de que o gene que codifica CCL20 encontra-se superexpresso na linhagem celular EBV-positiva em relação às linhagens EBV-negativas (figura 13 e tabela 8) e suporta o achado de BAUMFORTH et al. (2008), de que a superexpressão de CCL20 e consequente atração de linfócitos Treg para o ambiente inflamatório no LHC é mediada por um produto da transcrição do DNA viral (EBNA1), prevenindo o reconhecimento das CHRS EBV-positivas por linfócitos TCD8 (KÜPPERS 2009). A observação de que a expressão imunoistoquímica de CCL20 pelas CHRS não teve impacto na sobrevida dos pacientes não invalida a necessidade de se entender melhor os mecanismos de recrutamento de células Treg pelas CHRS, com consequente modificação do padrão da resposta imune, e a busca de estratégias de tratamento destinadas a manipular a atividade de células Treg.

Para os genes testados e aqueles cuja expressão protéica não pôde ser estudada por imunoistoquímica, conforme proposto neste projeto, estudos adicionais são necessários para confirmação das hipóteses aventadas sobre a participação dos mesmos nos mecanismos envolvidos na patogênese do LHC.

5.3 ANÁLISE CRÍTICA

Este estudo sofreu duas grandes modificações ao longo de seu desenvolvimento (Figura 26), que afetaram diretamente os objetivos inicialmente pretendidos e os dados posteriormente obtidos.

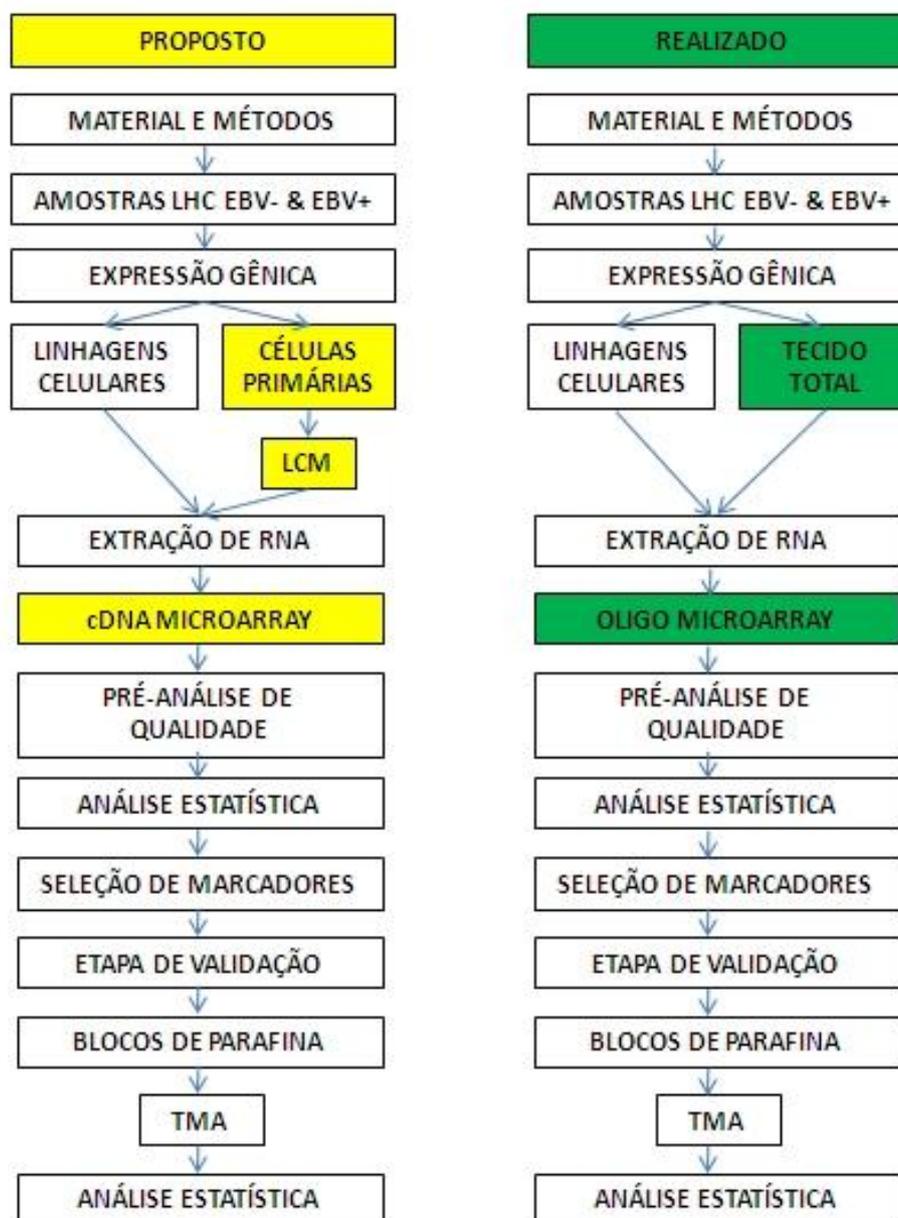


Figura 26: Organograma exibindo a proposta inicial de estudo (à esquerda) e as modificações realizadas no projeto (à direita).

Em primeiro lugar, a incapacidade de se obter CHRS primárias a partir de microdissecção a laser impediu a realização de comparações entre os padrões de expressão gênica de células primárias isoladas e de linhagens celulares. As dificuldades, de natureza técnica (mudança do modelo de equipamento utilizado, com conseqüente necessidade de mudança dos tipos de lâminas utilizados e reagentes necessários à extração de RNA imediatamente após o processo de microdissecção; incapacidade de se obter um número mínimo de CHRS microdissecadas no tempo disponível que não afetasse a qualidade do RNA a ser extraído) nos levaram a decidir pela extração do RNA do tecido total (células neoplásicas e células inflamatórias do infiltrado circundante), o que, por sua vez, determinou a realização de análises separadas.

Por um lado, a mudança na metodologia não nos permitiu comparar as diferenças nos padrões de expressão gênica de linhagens celulares e de células microdissecadas. Este é um debate recorrente no campo da genômica, uma vez que linhagens celulares estão fora de um contexto biológico e podem sofrer alterações sucessivas em seu patrimônio genético, ainda que sejam vantajosas por permitir a repetição de experimentos, mantendo ou variando as condições iniciais (BRENTANI et al., 2005). Todavia, a mudança de metodologia nos permitiu avaliar a expressão de RNA de o tumor como “um todo”, uma vez que o mesmo *é caracterizado pelas células neoplásicas e seu infiltrado inflamatório circundante*. Este tipo de abordagem é corroborado pelos trabalhos recentes de SÁNCHEZ-AGUILERA e colaboradores (2006) e de CHETAILLE e colaboradores (2009), que utilizaram amostras de RNA obtido de tecido total. Conforme discutido anteriormente, o único estudo a utilizar a

técnica de microdissecção a laser foi o realizado por KARUBE e colaboradores (2005), utilizando equipamento e material de consumo distintos dos adotados pelo Departamento de Anatomia Patológica.

Uma vez decidida a extração de RNA a partir de tecido total, verificou-se que, das 21 amostras selecionadas, 11 não apresentavam qualidade de RNA necessária à sua utilização na etapa seguinte, que envolveria a hibridização em lâminas de cDNA. O número restante de amostras com RNA de qualidade disponível (n=10) com certeza influenciou na capacidade de se obter resultados como os apresentados por SHÁNCHEZ-AGUILERA e colaboradores (2006) e CHETAILLE e colaboradores (2009) que utilizaram, respectivamente, 29 e 63 amostras. Por contar com um número maior de amostras, estes autores puderam correlacionar os dados obtidos dos estudos de expressão gênica com uma série de fatores, inclusive de resposta à terapia. Este tipo de análise não seria possível em nosso estudo, não só pelo número reduzido de amostras disponíveis, mas também pelo fato de que todos os pacientes apresentaram resposta favorável ao tratamento instituído, e seguiam livres de recidiva até a conclusão do estudo. Cabe ressaltar que os dois estudos citados foram conduzidos por grupos que tiveram acesso a amostras em âmbito nacional (respectivamente, Red de Bancos de Tumores de España e Groupe d'Etude des Lymphomas de l'Adulte – França), o que sublinha a necessidade do estímulo ao desenvolvimento de Bancos de Tumores em instituições brasileiras qualificadas, que possam contribuir para estudos como o que foi por nós conduzido. Para efeito de comparação, o Banco de Tumores do Hospital A C Camargo, que coletou aproximadamente 23000 amostras de tecido em 12 anos de atividade, possuía ao tempo da busca realizada para a realização do

projeto, apenas 23 amostras de linfoma de Hodgkin registradas em seu banco de dados.

Além disso, a utilização de um número reduzido de amostras de tecido fresco congelado influenciou no poder da análise estatística realizada, uma vez que diferenças individuais não puderam ser minimizadas. Da mesma forma, não pode ser utilizado o mesmo critério aplicado à análise de expressão gênica utilizando linhagens celulares (sendo considerados grupos relevantes aqueles com 3 genes identificados, e não 5 genes como no critério para linhagens celulares).

A segunda grande mudança ocorrida no presente projeto foi a substituição da plataforma inicialmente prevista na etapa de expressão gênica (utilização de lâminas de cDNA com aproximadamente 4800 elementos ORESTES, feita pela própria instituição) por uma nova plataforma (*oligoarrays* contendo 44000 oligos, representando todo o genoma humano). Embora tenha ampliado sobremaneira o repertório de genes estudados, esta mudança obrigou a uma nova padronização de todo o experimento com equipamento e reagentes com os quais não tínhamos experiência prévia. Um benefício advindo desta mudança é o fato de nosso estudo ter servido de base para a padronização da utilização desta nova metodologia para estudos futuros que venham a utilizá-la em nossa Instituição.

Finalmente, os percalços acima descritos influíram no tempo necessário à aquisição de outros marcadores que os utilizados na etapa de validação por imunistoquímica (o que nos permitiria investigar a expressão protéica de uma grande quantidade de genes dentro de um único processo biológico), assim como na possibilidade de se conduzir experimentos adicionais de validação

não previstos no projeto, uma vez que para muitos dos genes relacionados neste estudo não há anticorpos disponíveis para realização de imunistoquímica em material preservado em formol e embocado em parafina.

As hipóteses biológicas apresentadas aqui abrem novas perspectivas de estudos sobre a patogênese do LHC, particularmente dos mecanismos utilizados pela célula neoplásica para modular o sistema imune, embora não modifiquem o estado atual do diagnóstico e tratamento desta neoplasia, e necessitem de estudos adicionais para sua confirmação. Entretanto, por contarmos agora com linhagens de CHRS cedidas pelos Profs. Drs. Harald Stein e Dido Lenze em nosso banco de linhagens celulares, temos a possibilidade de testá-las em futuros experimentos.

Da mesma forma, os achados de um pior prognóstico associado à expressão de MMP9 e CASP-1 em pacientes na faixa etária de 15 a 45 anos necessitam de estudos adicionais de validação, assim como a investigação da influência do padrão de expressão destes e outros marcadores na sobrevida de pacientes em faixa etária pediátrica e de idade avançada (sendo necessário aumentarmos a casuística de casos nas duas faixas etárias para a realização de uma análise com poder estatístico).

6 CONCLUSÕES

1 A comparação dos padrões de expressão gênica dos casos de LHC associados ou não associados à infecção pelo EBV, bem como das linhagens celulares nos permite concluir que:

a) O LHC parece ser uma entidade única, na qual a presença ou ausência de associação de infecção pelo EBV determina alterações em pontos distintos das mesmas vias de regulação que estão envolvidas na sua patogênese. Estas vias envolvem diversos processos relacionados à evasão do sistema imune pelas células neoplásicas, alterações na regulação do ciclo-celular/controlado mitótico, e regulação positiva da via de NFkB.

b) A associação entre a expressão de CCL20 por CHRS e infecção por EBV enfatiza a importância da produção desta proteína para a modulação do sistema imune pelas CHRS em casos de LHC EBV-positivos. A regulação deste mesmo sistema por outros fatores (CBLB, SOCS3), em casos EBV-positivos, necessita de estudos funcionais de validação.

c) Em casos de LHC EBV-negativos, estudos adicionais são necessários para determinar a influência de XCL1 e TSC22D3/GILZ na modulação do sistema imune pelas CHRS.

2 A validação de potenciais marcadores, comparando a sua expressão imunohistoquímica com a presença de EBV e o seu impacto na sobrevida dos pacientes permitiu concluir que:

a) CCL20 é diferencialmente expresso nas CHRS de tecidos acometidos por LHC associado a infecção por EBV, confirmando os achados da análise de expressão gênica.

b) Os outros marcadores pesquisados não apresentaram associação com casos de LHC EBV-positivos (Aurora B, Caspase-1, CDC2) ou EBV-negativos (Caveolina-1, MMP9), não confirmando os achados da análise de expressão gênica.

c) As CHRS expressam Caspase-1, que em pacientes na faixa etária de 15 a 45 anos está associada à menor sobrevida doença-específica.

d) A expressão de MMP9 por CHRS também está associada à menor sobrevida doença-específica de pacientes entre 15 e 45 anos e é fator prognóstico independente de IPS nesta faixa etária.

e) As CHRS expressam Caveolina-1. Estudos são necessários para determinar a sua influência nos mecanismos de proliferação (ativação da via JAK/STAT) e de evasão do sistema imune (inibição da atividade de células TCD8) que caracterizam o LHC.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu ES, Ferreira FVA, Rocha Filho FD, et al. Doença de Hodgkin infanto-juvenil no estado do Ceará e sua relação com o vírus de Epstein-Barr: parâmetros clínicos e análises morfológica, imuno-histoquímica e por hibridização “in situ”. **J Bras Patol** 1997; 33:178-84.

Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. **Nature** 2000; 403:503-11.

Alvaro T, Lejeune M, Salvadó MT, et al. Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. **Clin Cancer Res** 2005; 11:1467-73.

Anagnostopoulos I, Herbst H, Niedobitek G, Stein H. Demonstration of monoclonal EBV genomes in Hodgkin's disease and Ki-1-positive anaplastic large cell lymphoma by combined Southern blot and “in situ” hybridization. **Blood** 1989; 74:810-6.

Ansel KM, Djuretic I, Tanasa B, Rao A. Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. **Annu Rev Immunol** 2006; 24:607-56.

Baumforth KR, Birgersdotter A, Reynolds GM, et al. Expression of the Epstein-Barr virus-encoded Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in Hodgkin's lymphoma cells mediates Up-regulation of CCL20 and the migration of regulatory T cells. **Am J Pathol** 2008; 173:195-204.

Bellan C, De Falco G, Lazzi S, Met al. CDK9/CYCLIN T1 expression during normal lymphoid differentiation and malignant transformation. **J Pathol** 2004; 203:946-52.

Bennett MH, MacLennan KA, Easterling MJ, Vaughan HB, Jelliffe AM, Vaughan HG. The prognostic significance of cellular subtypes in nodular sclerosing Hodgkin's disease: an analysis of 271 non-laparotomised cases (BNLI report no. 22). **Clin Radiol** 1983; 34:497-501.

Berrebi D, Bruscoli S, Cohen N, et al. Synthesis of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by macrophages: an anti-inflammatory and immunosuppressive mechanism shared by glucocorticoids and IL-10. **Blood** 2003; 101:729-38.

Brentani RR, Carraro DM, Verjovski-Almeida S, et al. Gene expression arrays in cancer research: methods and applications. **Crit Rev Oncol Hematol** 2005; 54:95-105.

Bollard CM, Aguilar L, Straathof KC, Get al. Cytotoxic T lymphocyte therapy for Epstein-Barr virus+ Hodgkin's disease. **J Exp Med** 2004; 200:1623-33.

Bouzin C, Brouet A, De Vriese J, et al. Effects of vascular endothelial growth factor on the lymphocyte-endothelium interactions: identification of caveolin-1 and nitric oxide as control points of endothelial anergy. **J Immunol** 2007; 178:1505-11.

Campos AH, Aldred VL, Ribeiro KC, Vassallo J, Soares FA. Role of immunoexpression of nitric oxide synthases by Hodgkin and Reed-Sternberg cells on apoptosis deregulation and on clinical outcome of classical Hodgkin lymphoma. **Mol Cell Biochem** 2009; 321:95-102.

Chetaille B, Bertucci F, Finetti P, et al. Molecular profiling of classical Hodgkin lymphoma tissues uncovers variations in the tumor microenvironment and correlations with EBV infection and outcome. **Blood** 2009; 113:2765-3775.

Creighton C, Hanash S. Expression of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9/gelatinase B) in adenocarcinomas strongly correlated with expression of immune response genes. **In Silico Biol** 2003;3:301-11.

de Falco G, Leucci E, Onnis A, et al. Cdk9/Cyclin T1 complex: a key player during the activation/differentiation process of normal lymphoid B cells. **J Cell Physiol** 2008; 215:276-82.

de Jong D, Enblad G. Inflammatory cells and immune microenvironment in malignant lymphoma. **J Intern Med** 2008; 264:528-36.

Deng L, Yang J, Zhao XR, et al. Cells in G2/M phase increased in human nasopharyngeal carcinoma cell line by EBV-LMP1 through activation of NF-kappaB and AP-1. **Cell Res** 2003; 13:187-94.

Devillard E, Bertucci F, Tremprat P, et al. Gene expression profiling defines molecular subtypes of classical Hodgkin's disease. **Oncogene** 2002; 21:3095-102.

Diehl V, Kirchner HH, Burcher H, et al. Characteristics of Hodgkin's disease-derived cell lines. **Cancer Treat Rep** 1982; 66:615-32.

Diehl V, Pfreundschuh M, Fonatsch C, et al. Phenotypic and genotypic analysis of Hodgkin's disease derived cell lines: histopathological and clinical implications. **Cancer Surv** 1985; 4:399-419.

Dutton A, Reynolds GM, Dawson CW, Young LS, Murray PG. Constitutive activation of phosphatidylinositol 3 kinase contributes to the survival of Hodgkin's lymphoma cells through a mechanism involving Akt kinase and mTOR. **J Pathol** 2005; 205:498-506.

Enblad G, Molin D, Glimelius I, Fischer M, Nilsson G. The potential role of innate immunity in the pathogenesis of Hodgkin's lymphoma. **Hematol Oncol Clin North Am** 2007; 21:805-23.

Epstein MA, Achong BG, Barr YM: Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. **Lancet** 1964; 1:702-3.

Flavell JR, Baumforth KRN, Williams DM, et al. Expression of the matrix metalloproteinase 9 in Hodgkin's disease is independent of EBV status. **Mol Pathol** 2000; 53:145-9.

Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, Nuñez G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. **Nat Immunol** 2009;10:241-7.

Georgakis GV, Li Y, Rassidakis GZ, Medeiros LJ, Mills GB, Younes A. Inhibition of the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt promotes G1 cell cycle arrest and apoptosis in Hodgkin lymphoma. **Br J Haematol** 2006; 132:503-11.

Gomes LI, Silva RL, Stolf BS, et al. Comparative analysis of amplified and nonamplified RNA for hybridization in cDNA microarray. **Anal Biochem** 2003; 321:244-51.

Hamdi H, Godot V, Maillot MC, et al. Induction of antigen-specific regulatory T lymphocytes by human dendritic cells expressing the glucocorticoid-induced leucine zipper. **Blood** 2007; 110:211-9.

Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. **Blood** 1994; 84:1361-92.

Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. **J Clin Oncol** 1999; 17:3835-49.

Hasenclever D, Diehl V. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. **N Engl J Med** 1998; 339:1506-4.

Henle G, Henle W, Diehl V. Relation of Burkitt tumor associated herpes-virus to infectious mononucleosis. **Proc Natl Acad Sci USA** 1968; 59:94-101.

Henle G, Henle W. Epstein-Barr virus and human malignancies. **Adv Viral Oncol** 1985; 5:201.

Herbst H, Niedobitek G, Kneba M, et al. High incidence of Epstein-Barr virus genomes in Hodgkin's disease. **Am J Pathol** 1990; 137:13-8.

Hess JL, Bodis S, Pinkus G, Silver B, Mauch P. Histopathologic grading of nodular sclerosing Hodgkin's disease. Lack of prognostic significance in 254 surgically staged patients. **Cancer** 1994; 74:708-14.

Hontz AE, Li SA, Lingle WL, et al. Aurora A and B overexpression and centrosome amplification in early estrogen-induced tumor foci in the Syrian hamster kidney: implications for chromosomal instability, aneuploidy, and neoplasia. **Cancer Res** 2007; 67:2957-63.

Huh J, Park C, Juhng S, Kim CE, Poppema S, Kim C. A pathologic study of Hodgkin's disease in Korea and its association with Epstein-Barr virus infection. **Cancer** 1997; 77:949-55.

Hu X, Chen J, Wang L, Ivashkiv LB. Crosstalk among Jak-STAT, Toll-like receptor, and ITAM-dependent pathways in macrophage activation. **J Leukoc Biol** 2007; 82:237-43.

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. **Pathology and genetics of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues**. IARC Press: Lyon; 2001. (WHO Classification of Tumours, Volume 3; IARC WHO Classification of Tumours, N° 3). p.237-53.

Joos S, Küpper M, Ohl S, et al. Genomic imbalances including amplification of the tyrosine kinase gene JAK2 in CD30+ Hodgkin cells. **Cancer Res** 2000; 60:549-52.

Jundt F, Kley K, Anagnostopoulos I, et al. Loss of PU.1 expression is associated with defective immunoglobulin transcription in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease. **Blood** 2002; 99:3060-2.

Kanzler H, Hansmann ML, Kapp U, et al. Molecular single cell analysis demonstrates the derivation of a peripheral blood-derived cell line (I1236) from the Hodgkin/Reed-Sternberg cells from a Hodgkin's lymphoma patient. **Blood** 1996a; 87:3429-36.

Kanzler H, Küppers R, Hansmann ML, Rajewsky K. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center cells. **J Exp Med** 1996b; 184:1495-505.

Kapatai G, Murray P. Contribution of the Epstein Barr virus to the molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. **J Clin Pathol** 2007; 60:1342-9.

Karube K, Ohshima K, Suzumiya J, Kawano R, Kikuchi M, Harada M. Gene expression profile of cytokines and chemokines in microdissected primary Hodgkin and Reed-Sternberg (HRS) cells: high expression of interleukin-11 receptor alpha. **Ann Oncol** 2006; 17:110-6.

Keegan TH, Glaser SL, Clarke CA, et al. Epstein-Barr virus as a marker of survival after Hodgkin's lymphoma: a population-based study. **J Clin Oncol** 2005; 23:7604-13.

Kelley TW, Pohlman B, Elson P, Hsi ED. The ratio of FOXP3+ regulatory T cells to granzyme B+ cytotoxic T/NK cells predicts prognosis in classical Hodgkin lymphoma and is independent of bcl-2 and MAL expression. **Am J Clin Pathol** 2007; 128:958-65.

Khan G, Gupta RK, Coates PJ, Slavin G. Epstein-Barr virus infection and Bcl-2 proto-oncogene expression: separate events in the pathogenesis of Hodgkin's disease? **Am J Pathol** 1993; 143:1270-4.

Kim L-H, Nadarajah VS, Peh S-C, Poppema S. Expression of Bcl-2 family members and presence of Epstein-Barr virus in the regulation of cell growth and death in classical Hodgkin's lymphoma. **Histopathology** 2004; 44:257-67.

Kim YR, Kim KM, Yoo NJ, Lee SH. Mutational analysis of CASP1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, and 14 genes in gastrointestinal stromal tumors. **Hum Pathol** 2009 Jun;40(6):868-71.

Klein U, Goossens T, Fischer M, et al. Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. **Immunol Rev** 1998; 162:261-80.

Küppers R, Rajewsky K, Zhao M, et al. Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. **Proc Natl Acad Sci USA** 1994; 91:10962-6.

Küppers R. Identifying the precursors of Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease: role of the germinal center B-cell lymphomagenesis. **J. Acquir Immune Defic Syndr** 1999; 21 Suppl 1:S74-9.

Küppers R, Klein U, Schwering I, et al. Identification of Hodgkin and Reed-Sternberg cell-specific genes by gene expression profiling. **J Clin Invest** 2003; 111:529-37.

Küppers R. The biology of Hodgkin's lymphoma. **Nat Rev Cancer** 2009; 9:15-27.

Lake A, Shield LA, Cordano P, et al. Mutations of NFKBIA, encoding I κ B α , are a recurrent finding in classical Hodgkin lymphoma but are not a unifying feature of non-EBV-associated cases. **Int J Cancer** 2009; 125:1334-42.

Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. **Cell Death Differ** 2007; 14:44-55.

Lampson MA, Renduchitala K, Khodjakov A, Kapoor TM. Correcting improper chromosome-spindle attachments during cell division. **Nat Cell Biol** 2004; 6:232-7.

Lan Q, Morton LM, Armstrong B, et al. Genetic variation in caspase genes and risk of non-Hodgkin lymphoma: a pooled analysis of 3 population-based case-control studies. **Blood** 2009; 114(2):264-7.

Latchman DS. The Oct-2 transcription factor. **Int J Biochem Cell Biol** 1996; 28:1081-3.

Lima VCC, Araújo BCAB, Teixeira HM, Moura JFP. Linfoma de Hodgkin. In: Kowalski LP, Guimarães GC, Salvajoli JV, Feher O, Antoneli CBG, editores. **Manual de condutas diagnósticas e terapêuticas em oncologia**. 3 ed. São Paulo: Âmbito Editores, 2006. p.233-7.

Liu G, Zhao Y. Toll-like receptors and immune regulation: their direct and indirect modulation on regulatory CD4+ CD25+ T cells. **Immunology** 2007; 122:149-56.

Lukes RJ. Relationship of histologic features to clinical stages in hodgkin's disease. **Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med** 1963; 90:944-55.

Lukes RJ, Butler JJ. The pathology and nomenclature of Hodgkin's disease. **Cancer Res** 1966; 26:1063-83.

Lukes Rj, Craver LF, Hall TC, Rappaport H, Ruben P. Report of the nomenclature committee. **Cancer Res** 1966; 26:1311.

MacLennan KA, Bennett MH, Vaughan HB, Vaughan HG. Diagnosis and grading of nodular sclerosing Hodgkin's disease: a study of 2190 patients. **Int Rev Exp Pathol** 1992; 33:27-51.

Maeda T, Hobbs RM, Merghoub T, et al. Role of the proto-oncogene Pokemon in cellular transformation and ARF repression. **Nature** 2005; 433:278-85.

Maggio EM, Van Den Berg A, Visser L, et al. Common and differential chemokine expression patterns in rs cells of NLP, EBV positive and negative classical Hodgkin lymphomas. **Int J Cancer** 2002; 99:665-72.

Martín-Subero JI, Knippschild U, Harder L, et al. Segmental chromosomal aberrations and centrosome amplifications: pathogenetic mechanisms in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's lymphoma? **Leukemia** 2003; 17:2214-9.

Mauch PM, Armitage JO, Diehl V, Hoppe RT, Weiss LM, editors. **Hodgkin's disease**. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins; 1999.

Middeldorp JM, Brink AA, van den Brule AJ, Meijer CJ. Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. **Crit Rev Oncol Hematol** 2003; 45:1-36.

Morrison JA, Gulley ML, Pathmanathan R, Raab-Traub N. Differential signaling pathways are activated in the Epstein-Barr virus-associated malignancies nasopharyngeal carcinoma and Hodgkin lymphoma. **Cancer Res** 2004; 64:5251-60.

Nguyen KD, Fohner A, Booker JD, et al. XCL1 enhancer regulatory activities of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low/-} T cells in human allergic asthma. **J Immunol** 2008; 181:5386-5395.

Ou R, Zhang M, Huang L, Moskophidis D. Control of virus-specific CD8+ T-cell exhaustion and immune-mediated pathology by E3 ubiquitin ligase Cbl-b during chronic viral infection. **J Virol** 2008; 82:3353-68.

Park DS, Lee H, Frank PG, et al. Caveolin-1 deficient mice show accelerated mammary gland development during pregnancy, premature lactation and hyperactivation of the Jak2/STAT5a signaling cascade. **Mol Biol Cell** 2002; 13:3416-30.

Perou CM, Jeffrey SS, vande Rijn M, et al. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1999; 96:9212-7.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumors. **Nature** 2000; 406:747-52.

Pollack JR. RNA common reference sets. In: Botwell D, Sambrook J, editors. **DNA microarrays: a molecular cloning manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2002. p.168-72.

Quest AF, Gutierrez-Pajares JL, Torres VA. Caveolin-1: an ambiguous partner in cell signalling and cancer. **J Cell Mol Med** 2008; 12:1130-50.

Re D, Muschen M, Ahmadi T, et al. Oct-2 and Bob-1 deficiency in Hodgkin and Reed Sternberg cells. **Cancer Res** 2001; 61:2080-4.

Re D, Thomas RK, Behringer K, Diehl V. From Hodgkin disease to Hodgkin lymphoma: biologic insights and therapeutic potential. **Blood** 2005; 105:4553-60.

Ross DT, Scherf U, Eisen MB, et al. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. **Nat Genet** 2000; 24:227-35.

Sáez AI, Artiga MJ, Sánchez-Beato M, et al. Analysis of octamer-binding transcription factors Oct2 and Oct1 and their coactivator BOB.1/OBF.1 in lymphomas. **Mod Pathol** 2002; 15:211-20.

Sakata K, Satoh M, Someya M, et al. Expression of matrix metalloproteinase 9 is a prognostic factor in patients with non-Hodgkin lymphoma. **Cancer** 2004; 100:356-65.

Sánchez-Aguilera A, Montalbán C, de la Cueva P, et al. Spanish Hodgkin Lymphoma Study Group. Tumor microenvironment and mitotic checkpoint are key factors in the outcome of classic Hodgkin lymphoma. **Blood** 2006; 108:662-8.

Schnitzer B. Hodgkin Lymphoma. In: Hsi, editor. **Hematopathology**. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2007. p.333-64.

Schreck S, Friebel D, Buettner M, et al. Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma. **Hematol Oncol** 2009; 27:31-9.

Skinnider BF, Mak TW. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. **Blood** 2002; 99:4283-97.

Soung YH, Jeong EG, Ahn CH, et al. Mutational analysis of caspase 1, 4, and 5 genes in common human cancers. **Hum Pathol** 2008; 39:895-900.

Sturm RA, Das G, Herr W. The ubiquitous octamer-binding protein Oct-1 contains a POU domain with a homeo box subdomain. **Genes Dev** 1988; 2:1582-99.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. **WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues**. 4th ed. Lyon: IARC; 2008. WHO (Classification of Tumours, Volume 2, IARC WHO Classification of Tumours, N° 2). p.321-34.

Schwering I, Bräuninger A, Distler V, et al. Profiling of Hodgkin's lymphoma cell line L1236 and germinal center B cells: identification of Hodgkin's lymphoma-specific genes. **Mol Med** 2003; 9:85-95. Erratum in: **Mol Med** 2003; 9:235.

Tao Q, Robertson KD, Manns A, et al. Epstein-Barr virus (EBV) in endemic Burkitt's lymphoma: molecular analysis of primary tumor tissues. **Blood** 1998; 91:1373-1381.

Todd T, Raj S, Camilleri D, et al. Intermediate dose gemcitabine-cisplatin combination chemotherapy without treatment delay for cytopenia followed by autografting-a new standard of care in relapsed or refractory Hodgkin lymphoma? **Ann Hematol** 2009; 88:1107-12.

Torlakovic E, Tierens A, Dang HD, Delabie J. The transcription factor PU.1, necessary for B-cell development is expressed in lymphocyte predominance, but not classical Hodgkin's disease. **Am J Pathol** 2001; 159:1807-14.

van Spronsen DJ, Vrints LW, Hofstra G, Crommelin MA, Coeberg JW, Breed WP. Disappearance of prognostic significance of histopathological grading of nodular sclerosing Hodgkin's disease for unselected patients, 1972-92. **Br J Haematol** 1997; 96:322-7.

Vassallo J. **Expressão do vírus de Epstein-Barr e de proteínas relacionadas à apoptose em linfomas de Hodgkin clássicos do adulto: um estudo dos pacientes atendidos na Universidade Estadual de Campinas.** Campinas; 2000. [Tese de Livre Docência-Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas].

Vercammen E, Staal J, Beyaert R. Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3. **Clin Microbiol Rev** 2008; 21:13-25.

Verdin E, Dequiedt F, Kasler HG. Class II histone deacetylases: versatile regulators. **Trends Genet** 2003; 19:286-93.

Verjovski-Almeida S, Venancio TM, Oliveira KC, et al. Use of a 44k oligoarray to explore the transcriptome of *Schistosoma mansoni* adult worms. **Exp Parasitol** 2007; 117:236-45.

von Wasielewski R, Wilkens L, Nolte M, et al. Light-chain mRNA in lymphocyte-predominant and mixed-cellularity Hodgkin's disease. **Mod Pathol** 1996; 9:334-8.

Wade PA. Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. **Hum Mol Genet** 2001; 10:693-8.

Weiss L, Movahed L, Warnke R, Sklar J. Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. **N Engl J Med** 1989; 320:502-6.

Weniger MA, Melzner I, Menz CK, et al. Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. **Oncogene** 2006; 25:2679-84.

Yamanaka K, Clark R, Dowgiert R, Hurwitz D, Shibata M, Rich BE, Hirahara K, Jones DA, Eapen S, Mizutani H, Kupper TS. Expression of interleukin-18 and caspase-1 in cutaneous T-cell lymphoma. **Clin Cancer Res** 2006; 12:376-82.

Yoshizaki T, Sato H, Furukawa M, Pagano JS. The expression of matrix metalloproteinase 9 is enhanced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. **Proc Natl Acad Sci USA** 1998; 95:3621-6.

Zeng Y. Seroepidemiological studies on nasopharyngeal carcinoma in China. **Adv Cancer Res** 1985; 44:121-38.

Zhang B, Kirov S, Snoddy J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. **Nucleic Acids Res** 2005; 33:W741-8.

Anexo 1: 267 genes mais expressos nas linhagens EBV-negativas

Número	"Fold"	Input ID	Entrez Gene ID	Símbolo	Nome
1	108,2109172	KLF3	51274	KLF3	Kruppel-like factor 3 (basic)
2	69,29537809	PTGER4	5734	PTGER4	prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)
3	48,91990446	IGF2BP1	10642	IGF2BP1	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1
4	34,7915644	MAGEA9	4108	MAGEA9	melanoma antigen family A, 9
5	33,94577103	PRAME	23532	PRAME	preferentially expressed antigen in melanoma
6	33,85411732	ZDHHC11	79844	ZDHHC11	zinc finger, DHHC-type containing 11
7	32,92862806	CUZD1	50624	CUZD1	CUB and zona pellucida-like domains 1
8	30,80773023	PLS3	5358	PLS3	plastin 3 (T isoform)
9	30,27506653	RAPH1	65059	RAPH1	Ras association (RalGDS/AF-6) and pleckstrin homology domains 1
10	28,76167381	FOXP1	27086	FOXP1	forkhead box P1
11	28,36968527	SH2D1A	4068	SH2D1A	SH2 domain protein 1A, Duncan's disease (lymphoproliferative syndrome)
12	27,14954667	KIAA0408	9729	KIAA0408	KIAA0408
13	24,26905612	RBM11	54033	RBM11	RNA binding motif protein 11
14	23,52458671	TMEM71	137835	TMEM71	transmembrane protein 71
15	23,09095091	SNRPN	6638	SNRPN	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N
16	23,04633959	FGFR1	2260	FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1 (fms-related tyrosine kinase 2, Pfeiffer syndrome)
17	22,48822377	TSPYL5	85453	TSPYL5	TSPY-like 5
18	21,60327045	CYP4Z1	199974	CYP4Z1	cytochrome P450, family 4, subfamily Z, polypeptide 1
19	20,6671439	NR2F2	7026	NR2F2	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2
20	20,18256426	MID1	4281	MID1	midline 1 (Opitz/BBB syndrome)
21	19,73107586	NR2F1	7025	NR2F1	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1
22	18,93604094	PLEKHA1	59338	PLEKHA1	pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 1
23	18,37350905	PLAT	5327	PLAT	plasminogen activator, tissue
24	18,04581379	C1orf34	22996	C1orf34	chromosome 1 open reading frame 34
25	17,13882598	ELMOD1	55531	ELMOD1	ELMO/CED-12 domain containing 1
26	16,40684152	COL8A2	1296	COL8A2	collagen, type VIII, alpha 2
27	16,20323541	MAGEB1	4112	MAGEB1	melanoma antigen family B, 1
28	15,18159231	DUSP6	1848	DUSP6	dual specificity phosphatase 6
29	15,12607987	ZC3HAV1L	92092	ZC3HAV1L	zinc finger CCCH-type, antiviral 1-like
30	14,98216329	ARHGAP29	9411	ARHGAP29	Rho GTPase activating protein 29
31	14,88198642	GIMAP8	155038	GIMAP8	GTPase, IMAP family member 8
32	14,69519294	SLC26A9	115019	SLC26A9	solute carrier family 26, member 9
33	14,38316376	STK39	27347	STK39	serine threonine kinase 39 (STE20/SPS1 homolog, yeast)
34	14,13135107	FES	2242	FES	feline sarcoma oncogene
35	13,81659574	NFIA	4774	NFIA	nuclear factor I/A
36	13,40892952	MET	4233	MET	met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)
37	13,34554972	POU4F1	5457	POU4F1	POU domain, class 4, transcription factor 1
38	13,06850955	TFPI2	7980	TFPI2	tissue factor pathway inhibitor 2
39	13,05167806	CAV1	857	CAV1	caveolin 1, caveolae protein, 22kDa
40	12,90216833	SH2D1B	117157	SH2D1B	SH2 domain containing 1B
41	12,76203259	C1orf59	113802	C1orf59	chromosome 1 open reading frame 59

Anexo 1: 267 genes mais expressos nas linhagens EBV-negativas (continuação)

Número	"Fold"	Input ID	Entrez Gene ID	Símbolo	Nome
42	12,68172703	ADPRHL1	113622	ADPRHL1	ADP-ribosylhydrolase like 1
43	12,66338657	DCDC2	51473	DCDC2	doublecortin domain containing 2
44	12,32398155	PPM1H	57460	PPM1H	protein phosphatase 1H (PP2C domain containing)
45	12,29263231	DUXAP10	503639	DUXAP10	double homeobox A pseudogene 10
46	12,23796244	IL13RA1	3597	IL13RA1	interleukin 13 receptor, alpha 1
47	11,72903119	DLG5	9231	DLG5	discs, large homolog 5 (Drosophila)
48	11,68554116	TNFSF14	8740	TNFSF14	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14
49	11,64354141	STXBP6	29091	STXBP6	syntaxin binding protein 6 (amisyn)
50	11,43687711	NUB1	51667	NUB1	negative regulator of ubiquitin-like proteins 1
51	11,22087301	PGBD5	79605	PGBD5	piggyBac transposable element derived 5
52	11,19914561	DLX1	1745	DLX1	distal-less homeobox 1
53	11,08760584	RSAD2	91543	RSAD2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2
54	10,87354812	JSRP1	126306	JSRP1	junctional sarcoplasmic reticulum protein 1
55	10,87009154	IRS1	3667	IRS1	insulin receptor substrate 1
56	10,86471101	TRERF1	55809	TRERF1	transcriptional regulating factor 1
57	10,51407658	BCAN	63827	BCAN	brevican
58	10,30214481	TNF	7124	TNF	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
59	10,19097624	GNAZ	2781	GNAZ	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha z polypeptide
60	10,05251281	PHKA1	5255	PHKA1	phosphorylase kinase, alpha 1 (muscle)
61	9,999397037	MOBKL2B	79817	MOBKL2B	MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 2B (yeast)
62	9,928273315	SLC37A3	84255	SLC37A3	solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 3
63	9,823156011	BAMBI	25805	BAMBI	BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog (Xenopus laevis)
64	9,596610732	EPHB1	2047	EPHB1	EPH receptor B1
65	9,545827189	KIAA0802	23255	KIAA0802	KIAA0802
66	9,503137468	FJX1	24147	FJX1	four jointed box 1 (Drosophila)
67	9,465665155	PPM1E	22843	PPM1E	protein phosphatase 1E (PP2C domain containing)
68	9,421913762	STX3	6809	STX3	syntaxin 3
69	9,325992393	KCNH2	3757	KCNH2	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 2
70	9,296739953	IL13	3596	IL13	interleukin 13
71	9,286808028	NDST4	64579	NDST4	N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 4
72	9,133223896	AKT3	10000	AKT3	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3 (protein kinase B, gamma)
73	9,052435645	STMN3	50861	STMN3	stathmin-like 3
74	9,045267648	FAM80B	57494	FAM80B	family with sequence similarity 80, member B
75	9,002016389	IFI44	10561	IFI44	interferon-induced protein 44
76	8,933486624	TPO	7173	TPO	thyroid peroxidase
77	8,844908102	DHDH	27294	DHDH	dihydrodiol dehydrogenase (dimeric)
78	8,704317488	TFEC	22797	TFEC	transcription factor EC
79	8,582551044	PLEKHA5	54477	PLEKHA5	pleckstrin homology domain containing, family A member 5
80	8,489510005	C3orf15	89876	C3orf15	chromosome 3 open reading frame 15
81	8,390697331	CDON	50937	CDON	Cdon homolog (mouse)
82	8,255321573	VCX3A	51481	VCX3A	variable charge, X-linked 3A

Anexo 1: 267 genes mais expressos nas linhagens EBV-negativas (continuação)

Número	"Fold"	Input ID	Entrez Gene ID	Símbolo	Nome
83	8,241463304	TMEM2	23670	TMEM2	transmembrane protein 2
84	8,004685741	CLU	1191	CLU	clusterin
85	7,86641417	ZCCHC14	23174	ZCCHC14	zinc finger, CCHC domain containing 14
86	7,825179012	PDE5A	8654	PDE5A	phosphodiesterase 5A, cGMP-specific
87	7,808754047	IFI44L	10964	IFI44L	interferon-induced protein 44-like
88	7,765847349	SCN8A	6334	SCN8A	sodium channel, voltage gated, type VIII, alpha
89	7,747862388	MID2	11043	MID2	midline 2
90	7,672472836	DHRS2	10202	DHRS2	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2
91	7,655892633	C21orf7	56911	C21orf7	chromosome 21 open reading frame 7
92	7,62964359	MCM10	55388	MCM10	MCM10 minichromosome maintenance deficient 10 (<i>S. cerevisiae</i>)
93	7,6189814	FHAD1	114827	FHAD1	forkhead-associated (FHA) phosphopeptide binding domain 1
94	7,610992921	FBXO25	26260	FBXO25	F-box protein 25
95	7,604471569	PHF6	84295	PHF6	PHD finger protein 6
96	7,58010207	NID2	22795	NID2	nidogen 2 (osteonidogen)
97	7,5039137	MAGEA1	4100	MAGEA1	melanoma antigen family A, 1 (directs expression of antigen MZ2-E)
98	7,480365658	EIF5	1983	EIF5	eukaryotic translation initiation factor 5
99	7,423140326	CYB5R2	51700	CYB5R2	cytochrome b5 reductase 2
100	7,340007418	OPRS1	10280	OPRS1	opioid receptor, sigma 1
101	7,325784663	ACSL6	23305	ACSL6	acyl-CoA synthetase long-chain family member 6
102	7,241076081	IL5	3567	IL5	interleukin 5 (colony-stimulating factor, eosinophil)
103	7,233755269	CCDC11	220136	CCDC11	coiled-coil domain containing 11
104	7,198662049	TAC3	6866	TAC3	tachykinin 3 (neuromedin K, neurokinin beta)
105	7,126640978	PEG10	23089	PEG10	paternally expressed 10
106	7,036648296	DDC	1644	DDC	dopa decarboxylase (aromatic L-amino acid decarboxylase)
107	6,990924464	PARP11	57097	PARP11	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 11
108	6,987949586	TEX15	56154	TEX15	testis expressed sequence 15
109	6,985648	RGS2	5997	RGS2	regulator of G-protein signalling 2, 24kDa
110	6,909277989	MAPT	4137	MAPT	microtubule-associated protein tau
111	6,874601734	FABP6	2172	FABP6	fatty acid binding protein 6, ileal (gastrotropin)
112	6,835009902	GDAP1	54332	GDAP1	ganglioside-induced differentiation-associated protein 1
113	6,655350398	PCDH9	5101	PCDH9	protocadherin 9
114	6,646519628	XKR4	114786	XKR4	XK, Kell blood group complex subunit-related family, member 4
115	6,622770904	CXADR	1525	CXADR	coxsackie virus and adenovirus receptor
116	6,545810467	PRKCQ	5588	PRKCQ	protein kinase C, theta
117	6,520766274	MYO1D	4642	MYO1D	myosin ID
118	6,503036079	CPNE4	131034	CPNE4	copine IV
119	6,447300248	HRK	8739	HRK	harakiri, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain)
120	6,266700675	GJA1	2697	GJA1	gap junction protein, alpha 1, 43kDa (connexin 43)
121	6,251922113	LRP11	84918	LRP11	low density lipoprotein receptor-related protein 11
122	6,214661772	SAMD4A	23034	SAMD4A	sterile alpha motif domain containing 4A
123	6,207491589	WWC3	55841	WWC3	WWC family member 3

Anexo 1: 267 genes mais expressos nas linhagens EBV-negativas (continuação)

Número	"Fold"	Input ID	Entrez Gene ID	Símbolo	Nome
124	6,19319475	ISG15	9636	ISG15	ISG15 ubiquitin-like modifier
125	6,151243612	SNURF	8926	SNURF	SNRPN upstream reading frame
126	6,13760316	AMPH	273	AMPH	amphiphysin (Stiff-Man syndrome with breast cancer 128kDa autoantigen)
127	6,136433699	SLC25A27	9481	SLC25A27	solute carrier family 25, member 27
128	6,089865158	CX3CL1	6376	CX3CL1	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1
129	6,089862831	SLC6A8	6535	SLC6A8	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine), member 8
130	6,072610798	RAB6B	51560	RAB6B	RAB6B, member RAS oncogene family
131	6,069796257	PAGE4	9506	PAGE4	P antigen family, member 4 (prostate associated)
132	6,067917088	KAZALD1	81621	KAZALD1	Kazal-type serine peptidase inhibitor domain 1
133	6,038720396	TCF7	6932	TCF7	transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box)
134	6,001711419	MAP3K15	389840	MAP3K15	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 15
135	5,987444622	SPP1	6696	SPP1	secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1)
136	5,972060914	ENPP1	5167	ENPP1	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1
137	5,93242625	PLA2G4A	5321	PLA2G4A	phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)
138	5,874853224	KIAA1166	55906	KIAA1166	KIAA1166
139	5,866296018	NFIL3	4783	NFIL3	nuclear factor, interleukin 3 regulated
140	5,833934531	TSPAN5	10098	TSPAN5	tetraspanin 5
141	5,832975186	ZNF365	22891	ZNF365	zinc finger protein 365
142	5,803710542	IGSF9	57549	IGSF9	immunoglobulin superfamily, member 9
143	5,790560515	ANK3	288	ANK3	ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)
144	5,779818304	THEX1	90459	THEX1	three prime histone mRNA exonuclease 1
145	5,776456858	TMPRSS3	64699	TMPRSS3	transmembrane protease, serine 3
146	5,764879467	CNTNAP4	85445	CNTNAP4	contactin associated protein-like 4
147	5,763987519	TMEM74	157753	TMEM74	transmembrane protein 74
148	5,741951297	DISP2	85455	DISP2	dispatched homolog 2 (Drosophila)
149	5,692213016	SNAP25	6616	SNAP25	synaptosomal-associated protein, 25kDa
150	5,67730822	TPMT	7172	TPMT	thiopurine S-methyltransferase
151	5,652120216	CIRH1A	84916	CIRH1A	cirrhosis, autosomal recessive 1A (cirhin)
152	5,648423424	FAM24B	196792	FAM24B	family with sequence similarity 24, member B
153	5,631809843	PLEKHK1	219790	PLEKHK1	pleckstrin homology domain containing, family K member 1
154	5,627707205	MAF	4094	MAF	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian)
155	5,603366419	RIN2	54453	RIN2	Ras and Rab interactor 2
156	5,602113925	WNK4	65266	WNK4	WNK lysine deficient protein kinase 4
157	5,482840294	IL5RA	3568	IL5RA	interleukin 5 receptor, alpha
158	5,475939775	FAM70A	55026	FAM70A	family with sequence similarity 70, member A
159	5,454470983	MSH2	4436	MSH2	mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)
160	5,40413841	NFIX	4784	NFIX	nuclear factor I/X (CCAAT-binding transcription factor)
161	5,365485837	HLXB9	3110	HLXB9	homeobox HB9
162	5,352732759	RAB11FIP1	80223	RAB11FIP1	RAB11 family interacting protein 1 (class I)
163	5,349709593	C6orf168	84553	C6orf168	chromosome 6 open reading frame 168
164	5,328044271	IL12A	3592	IL12A	interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35)

Anexo 1: 267 genes mais expressos nas linhagens EBV-negativas (continuação)

Número	"Fold"	Input ID	Entrez Gene ID	Símbolo	Nome
165	5,291757209	IL22RA1	58985	IL22RA1	interleukin 22 receptor, alpha 1
166	5,287092394	TNXB	7148	TNXB	tenascin XB
167	5,233548707	BRUNOL6	60677	BRUNOL6	bruno-like 6, RNA binding protein (Drosophila)
168	5,229037859	SLC45A3	85414	SLC45A3	solute carrier family 45, member 3
169	5,190657128	TSPAN2	10100	TSPAN2	tetraspanin 2
170	5,181065336	EXO1	9156	EXO1	exonuclease 1
171	5,151452134	SH3RF1	57630	SH3RF1	SH3 domain containing ring finger 1
172	5,13572224	GCNT2	2651	GCNT2	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 2, I-branching enzyme (I blood group)
173	5,12903065	ENPP3	5169	ENPP3	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3
174	5,117279292	PRIM1	5557	PRIM1	primase, polypeptide 1, 49kDa
175	5,117096573	MAGI3	260425	MAGI3	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 3
176	5,104103994	TMTC1	83857	TMTC1	transmembrane and tetratricopeptide repeat containing 1
177	5,091254491	KIAA1641	57730	KIAA1641	KIAA1641
178	5,064311076	C17orf76	388341	C17orf76	chromosome 17 open reading frame 76
179	5,053330486	CCL5	6352	CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5
180	5,053305776	NUP205	23165	NUP205	nucleoporin 205kDa
181	5,048816304	ADORA3	140	ADORA3	adenosine A3 receptor
182	5,046931126	NEXN	91624	NEXN	nexilin (F actin binding protein)
183	5,044966163	NANOS1	340719	NANOS1	nanos homolog 1 (Drosophila)
184	5,042938701	MMP12	4321	MMP12	matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)
185	5,028539476	PODXL	5420	PODXL	podocalyxin-like
186	5,027657701	UBE2E1	7324	UBE2E1	ubiquitin-conjugating enzyme E2E 1 (UBC4/5 homolog, yeast)
187	5,012208938	MGST3	4259	MGST3	microsomal glutathione S-transferase 3
188	4,977240586	SHOX2	6474	SHOX2	short stature homeobox 2
189	4,941832861	CDH18	1016	CDH18	cadherin 18, type 2
190	4,933499188	MAOA	4128	MAOA	monoamine oxidase A
191	4,932566394	NEO1	4756	NEO1	neogenin homolog 1 (chicken)
192	4,929075198	CD99	4267	CD99	CD99 molecule
193	4,91495272	TNFRSF12A	51330	TNFRSF12A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12A
194	4,883945065	PRKCA	5578	PRKCA	protein kinase C, alpha
195	4,824559224	AP3B2	8120	AP3B2	adaptor-related protein complex 3, beta 2 subunit
196	4,763382614	ULBP2	80328	ULBP2	UL16 binding protein 2
197	4,744972751	MAP1B	4131	MAP1B	microtubule-associated protein 1B
198	4,717089219	C14orf65	317762	C14orf65	chromosome 14 open reading frame 65
199	4,678658741	IVL	3713	IVL	involutrin
200	4,669998567	RTN1	6252	RTN1	reticulon 1
201	4,669489705	MMP9	4318	MMP9	matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
202	4,617050579	IL4	3565	IL4	interleukin 4
203	4,606226416	KCTD15	79047	KCTD15	potassium channel tetramerisation domain containing 15
204	4,598985809	ESAM	90952	ESAM	endothelial cell adhesion molecule
205	4,588246892	RBMS3	27303	RBMS3	RNA binding motif, single stranded interacting protein

Anexo 1: 267 genes mais expressos nas linhagens EBV-negativas (continuação)

Número	"Fold"	Input ID	Entrez Gene ID	Símbolo	Nome
206	4,584990498	HSP90AA1	3320	HSP90AA1	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1
207	4,576299879	MOSC2	54996	MOSC2	MOCO sulphurase C-terminal domain containing 2
208	4,569330639	SLC25A37	51312	SLC25A37	solute carrier family 25, member 37
209	4,55356383	SSX6	280657	SSX6	synovial sarcoma, X breakpoint 6
210	4,54274888	RAET1K	353093	RAET1K	retinoic acid early transcript 1K pseudogene
211	4,517588792	DLC1	10395	DLC1	deleted in liver cancer 1
212	4,503279835	TMEM98	26022	TMEM98	transmembrane protein 98
213	4,499955137	GNAT2	2780	GNAT2	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha transducing activity polypeptide 2
214	4,488518474	DSCR8	84677	DSCR8	Down syndrome critical region gene 8
215	4,48754019	EVI5	7813	EVI5	ecotropic viral integration site 5
216	4,473619192	ATXN7L1	57485	ATXN7L1	ataxin 7-like 1
217	4,47128118	GPR158	57512	GPR158	G protein-coupled receptor 158
218	4,467561555	CHGB	1114	CHGB	chromogranin B (secretogranin 1)
219	4,456978799	USP18	11274	USP18	ubiquitin specific peptidase 18
220	4,430483453	RFWD3	55159	RFWD3	ring finger and WD repeat domain 3
221	4,419146412	CD3D	915	CD3D	CD3d molecule, delta (CD3-TCR complex)
222	4,414958903	HOXB7	3217	HOXB7	homeobox B7
223	4,403545019	SEZ6L2	26470	SEZ6L2	seizure related 6 homolog (mouse)-like 2
224	4,403083743	TNNT1	7138	TNNT1	troponin T type 1 (skeletal, slow)
225	4,390022654	TYR	7299	TYR	tyrosinase (oculocutaneous albinism IA)
226	4,358609247	TRIM36	55521	TRIM36	tripartite motif-containing 36
227	4,357941986	ASRGL1	80150	ASRGL1	asparaginase like 1
228	4,350800504	IL10RA	3587	IL10RA	interleukin 10 receptor, alpha
229	4,341176569	WNT10A	80326	WNT10A	wingless-type MMTV integration site family, member 10A
230	4,320416025	FOXJ1	2302	FOXJ1	forkhead box J1
231	4,310553454	BDNF	627	BDNF	brain-derived neurotrophic factor
232	4,308146772	ZPBP2	124626	ZPBP2	zona pellucida binding protein 2
233	4,304641661	EGR1	1958	EGR1	early growth response 1
234	4,29332597	AUH	549	AUH	AU RNA binding protein/enoyl-Coenzyme A hydratase
235	4,290765559	DDIT3	1649	DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3
236	4,284536125	ZNF251	90987	ZNF251	zinc finger protein 251
237	4,280562042	GPR125	166647	GPR125	G protein-coupled receptor 125
238	4,261890966	FOXD1	2297	FOXD1	forkhead box D1
239	4,2510081	C2orf27	29798	C2orf27	chromosome 2 open reading frame 27
240	4,250773819	ZNF238	10472	ZNF238	zinc finger protein 238
241	4,238582875	HSPB1	3315	HSPB1	heat shock 27kDa protein 1
242	4,22795914	RNF43	54894	RNF43	ring finger protein 43
243	4,202140984	RNASET2	8635	RNASET2	ribonuclease T2
244	4,169782188	PSCA	8000	PSCA	prostate stem cell antigen
245	4,165402601	RHEB	6009	RHEB	Ras homolog enriched in brain
246	4,164645014	CYP19A1	1588	CYP19A1	cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1

Anexo 1: 267 genes mais expressos nas linhagens EBV-negativas (continuação)

Número	"Fold"	Input ID	Entrez Gene ID	Símbolo	Nome
247	4,146584268	KCTD4	386618	KCTD4	potassium channel tetramerisation domain containing 4
248	4,143860113	NRP1	8829	NRP1	neuropilin 1
249	4,136128774	MLF1	4291	MLF1	myeloid leukemia factor 1
250	4,133924701	SCHIP1	29970	SCHIP1	schwannomin interacting protein 1
251	4,126191548	IFI27	3429	IFI27	interferon, alpha-inducible protein 27
252	4,126100303	XCL1	6375	XCL1	chemokine (C motif) ligand 1
253	4,113761121	ITIH5	80760	ITIH5	inter-alpha (globulin) inhibitor H5
254	4,113303197	TACC2	10579	TACC2	transforming, acidic coiled-coil containing protein 2
255	4,11159582	HBE1	3046	HBE1	hemoglobin, epsilon 1
256	4,109836026	ZNF545	284406	ZNF545	zinc finger protein 545
257	4,099916495	MC1R	4157	MC1R	melanocortin 1 receptor (alpha melanocyte stimulating hormone receptor)
258	4,08033707	CCL2	6347	CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2
259	4,069744881	UNC13B	10497	UNC13B	unc-13 homolog B (C. elegans)
260	4,067991187	MAGEA10	4109	MAGEA10	melanoma antigen family A, 10
261	4,054663246	TRIM15	89870	TRIM15	tripartite motif-containing 15
262	4,052910342	GPR98	84059	GPR98	G protein-coupled receptor 98
263	4,036972859	SLC13A3	64849	SLC13A3	solute carrier family 13 (sodium-dependent dicarboxylate transporter), member 3
264	4,035636239	SHROOM3	57619	SHROOM3	shroom family member 3
265	4,03264242	TLR3	7098	TLR3	toll-like receptor 3
266	4,014021303	ZNF397	84307	ZNF397	zinc finger protein 397
267	4,011363761	FAM90A10	441328	FAM90A10	family with sequence similarity 90, member A10

Anexo 2: 489 genes mais expressos na linhagem EBV-positiva

Número	"Fold"	Input ID	Entrez Gene ID	Símbolo	Nome
1	-286,5622331	CPE	1363	CPE	carboxypeptidase E
2	-257,7911032	G0S2	50486	G0S2	G0/G1switch 2
3	-137,9348404	ADCY7	113	ADCY7	adenylate cyclase 7
4	-132,4593564	PLAC8	51316	PLAC8	placenta-specific 8
5	-112,7287711	CBR1	873	CBR1	carbonyl reductase 1
6	-106,5870938	CD2	914	CD2	CD2 molecule
7	-104,6608035	ANXA3	306	ANXA3	annexin A3
8	-89,54125457	GSTT2	2953	GSTT2	glutathione S-transferase theta 2
9	-64,75337942	TMEM22	80723	TMEM22	transmembrane protein 22
10	-61,05995435	KCNK1	3775	KCNK1	potassium channel, subfamily K, member 1
11	-58,09804184	ST3GAL6	10402	ST3GAL6	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6
12	-56,10367842	PTPN13	5783	PTPN13	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13 (APO-1/CD95 (Fas)-associated phosphatase)
13	-55,42094672	RAB32	10981	RAB32	RAB32, member RAS oncogene family
14	-52,02956417	PIR	8544	PIR	pirin (iron-binding nuclear protein)
15	-48,80722016	CLDN1	9076	CLDN1	claudin 1
16	-48,318526	TUBB6	84617	TUBB6	tubulin, beta 6
17	-46,47702831	POU2AF1	5450	POU2AF1	POU domain, class 2, associating factor 1
18	-43,95856882	MPDZ	8777	MPDZ	multiple PDZ domain protein
19	-43,1006714	CXCL9	4283	CXCL9	chemokine (C-X-C motif) ligand 9
20	-42,00758117	BTLA	151888	BTLA	B and T lymphocyte associated
21	-41,7125666	ACSS2	55902	ACSS2	acyl-CoA synthetase short-chain family member 2
22	-40,90452183	GPX7	2882	GPX7	glutathione peroxidase 7
23	-40,72496863	CNN3	1266	CNN3	calponin 3, acidic
24	-40,42043411	ESRRG	2104	ESRRG	estrogen-related receptor gamma
25	-40,0404045	ROBO1	6091	ROBO1	roundabout, axon guidance receptor, homolog 1 (Drosophila)
26	-39,91717993	KIAA0367	23273	KIAA0367	KIAA0367
27	-38,42600032	ANKRD22	118932	ANKRD22	ankyrin repeat domain 22
28	-38,15050476	LDOC1L	84247	LDOC1L	leucine zipper, down-regulated in cancer 1-like
29	-34,09320687	JAG1	182	JAG1	jagged 1 (Alagille syndrome)
30	-32,89079669	DPYSL3	1809	DPYSL3	dihydropyrimidinase-like 3
31	-32,53711844	OGDHL	55753	OGDHL	oxoglutarate dehydrogenase-like
32	-32,24598618	CXCL12	6387	CXCL12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)
33	-31,52093333	GTF2IRD1	9569	GTF2IRD1	GTF2I repeat domain containing 1
34	-30,73181885	STAC	6769	STAC	SH3 and cysteine rich domain
35	-30,58956728	KIF26B	55083	KIF26B	kinesin family member 26B
36	-30,4570544	CD84	8832	CD84	CD84 molecule
37	-30,38188356	LARP6	55323	LARP6	La ribonucleoprotein domain family, member 6
38	-29,89071675	APP	351	APP	amyloid beta (A4) precursor protein (peptidase nexin-II, Alzheimer disease)
39	-29,32158379	TNFRSF17	608	TNFRSF17	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17
40	-28,83698462	COCH	1690	COCH	coagulation factor C homolog, cochlin (Limulus polyphemus)
41	-27,79610469	DAZ2	57055	DAZ2	deleted in azoospermia 2

Anexo 2: 489 genes mais expressos na linhagem EBV-positiva (continuação)

Número	"Fold"	Input ID	Entrez Gene ID	Símbolo	Nome
42	-27,48638643	F2R	2149	F2R	coagulation factor II (thrombin) receptor
43	-26,61843442	SPARCL1	8404	SPARCL1	SPARC-like 1 (mast9, hevin)
44	-26,43194256	CREB5	9586	CREB5	cAMP responsive element binding protein 5
45	-26,25268695	ITGA1	3672	ITGA1	integrin, alpha 1
46	-26,23486068	UTS2D	257313	UTS2D	urotensin 2 domain containing
47	-26,0356212	TPRXL	348825	TPRXL	tetra-peptide repeat homeobox-like
48	-25,64953283	TCEAL4	79921	TCEAL4	transcription elongation factor A (SII)-like 4
49	-25,30389722	ME3	10873	ME3	malic enzyme 3, NADP(+)-dependent, mitochondrial
50	-23,80447941	MYBPC1	4604	MYBPC1	myosin binding protein C, slow type
51	-23,5897973	ODF1	4956	ODF1	outer dense fiber of sperm tails 1
52	-23,56587281	C10orf11	83938	C10orf11	chromosome 10 open reading frame 11
53	-23,4928194	LRP12	29967	LRP12	low density lipoprotein-related protein 12
54	-23,39923897	KCNE3	10008	KCNE3	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 3
55	-23,33972251	IL6R	3570	IL6R	interleukin 6 receptor
56	-23,19359587	CCL20	6364	CCL20	chemokine (C-C motif) ligand 20
57	-23,05670137	ZNF71	58491	ZNF71	zinc finger protein 71
58	-23,0387702	TPD52L1	7164	TPD52L1	tumor protein D52-like 1
59	-22,76444624	NCF1	653361	NCF1	neutrophil cytosolic factor 1, (chronic granulomatous disease, autosomal 1)
60	-22,39783167	LMO7	4008	LMO7	LIM domain 7
61	-21,93701166	ME1	4199	ME1	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic
62	-21,82241293	GMFG	9535	GMFG	glia maturation factor, gamma
63	-20,57203972	SERPINB9	5272	SERPINB9	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9
64	-20,42360928	PPARG	5468	PPARG	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
65	-20,17841209	LGALS8	3964	LGALS8	lectin, galactoside-binding, soluble, 8 (galectin 8)
66	-19,57133377	HCLS1	3059	HCLS1	hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1
67	-19,46972326	DOCK8	81704	DOCK8	dedicator of cytokinesis 8
68	-18,84986678	XIST	7503	XIST	X (inactive)-specific transcript
69	-18,64073453	RASSF4	83937	RASSF4	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 4
70	-18,53985515	GPC6	10082	GPC6	glypican 6
71	-18,44508966	EMR2	30817	EMR2	egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 2
72	-18,33983452	FEZ1	9638	FEZ1	fasciculation and elongation protein zeta 1 (zygin 1)
73	-18,17304154	P2RY8	286530	P2RY8	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 8
74	-17,82189821	PRKCB1	5579	PRKCB1	protein kinase C, beta 1
75	-17,72578288	ATP6V0D2	245972	ATP6V0D2	ATPase, H+ transporting, lysosomal 38kDa, V0 subunit d2
76	-17,62993338	ADA	100	ADA	adenosine deaminase
77	-17,3684837	TFCP2	7024	TFCP2	transcription factor CP2
78	-17,31637439	NMNAT2	23057	NMNAT2	nicotinamide nucleotide adenyltransferase 2
79	-17,22251109	CASP1	834	CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)
80	-17,19355262	WNT5B	81029	WNT5B	wingless-type MMTV integration site family, member 5B
81	-17,18288906	RAVER2	55225	RAVER2	ribonucleoprotein, PTB-binding 2
82	-17,16241603	HCK	3055	HCK	hemopoietic cell kinase

Anexo 2: 489 genes mais expressos na linhagem EBV-positiva (continuação)

Número	"Fold"	Input ID	Entrez Gene ID	Símbolo	Nome
83	-17,14372334	IMPACT	55364	IMPACT	Impact homolog (mouse)
84	-17,00954917	SOCS3	9021	SOCS3	suppressor of cytokine signaling 3
85	-16,97928078	PIM2	11040	PIM2	pim-2 oncogene
86	-16,86392021	MGST1	4257	MGST1	microsomal glutathione S-transferase 1
87	-16,85976122	GPRC5C	55890	GPRC5C	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member C
88	-16,362335	EYA2	2139	EYA2	eyes absent homolog 2 (Drosophila)
89	-16,19202115	USP40	55230	USP40	ubiquitin specific peptidase 40
90	-16,13426345	IL1A	3552	IL1A	interleukin 1, alpha
91	-16,08087816	CD48	962	CD48	CD48 molecule
92	-15,7270434	TNFRSF11B	4982	TNFRSF11B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)
93	-15,64662046	ITGB2	3689	ITGB2	integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)
94	-15,62563745	PTPRE	5791	PTPRE	protein tyrosine phosphatase, receptor type, E
95	-15,35013204	NRXN3	9369	NRXN3	neurexin 3
96	-15,21159473	PLCG2	5336	PLCG2	phospholipase C, gamma 2 (phosphatidylinositol-specific)
97	-15,05587574	SPINT1	6692	SPINT1	serine peptidase inhibitor, Kunitz type 1
98	-15,00537612	KBTBD11	9920	KBTBD11	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 11
99	-14,84646259	WFDC2	10406	WFDC2	WAP four-disulfide core domain 2
100	-14,67290529	S100A6	6277	S100A6	S100 calcium binding protein A6
101	-14,58513536	EBF1	1879	EBF1	early B-cell factor 1
102	-14,5693892	LHX2	9355	LHX2	LIM homeobox 2
103	-14,51335617	STAG3	10734	STAG3	stromal antigen 3
104	-14,4853805	RHOV	171177	RHOV	ras homolog gene family, member V
105	-14,39662364	POPDC3	64208	POPDC3	popeye domain containing 3
106	-14,38158131	PRDX2	7001	PRDX2	peroxiredoxin 2
107	-14,21855672	BMP7	655	BMP7	bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1)
108	-14,14301614	ARL11	115761	ARL11	ADP-ribosylation factor-like 11
109	-13,97288548	TNFRSF13B	23495	TNFRSF13B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13B
110	-13,95962647	TLR10	81793	TLR10	toll-like receptor 10
111	-13,8007127	CD44	960	CD44	CD44 molecule (Indian blood group)
112	-13,79841803	GNB4	59345	GNB4	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 4
113	-13,73285504	VASN	114990	VASN	vasorin
114	-13,72480498	NGFRAP1	27018	NGFRAP1	nerve growth factor receptor (TNFRSF16) associated protein 1
115	-13,67221501	PRL	5617	PRL	prolactin
116	-13,60820644	PROK2	60675	PROK2	prokineticin 2
117	-13,58694523	TMEM45A	55076	TMEM45A	transmembrane protein 45A
118	-13,30952757	C1orf21	81563	C1orf21	chromosome 1 open reading frame 21
119	-13,1434027	ECHDC3	79746	ECHDC3	enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 3
120	-13,09910233	C1orf67	200095	C1orf67	chromosome 1 open reading frame 67
121	-13,05200282	IL7	3574	IL7	interleukin 7
122	-12,95900613	ALKBH3	221120	ALKBH3	alkB, alkylation repair homolog 3 (E. coli)
123	-12,93634118	RASAL2	9462	RASAL2	RAS protein activator like 2

Anexo 2: 489 genes mais expressos na linhagem EBV-positiva (continuação)

Número	"Fold"	Input ID	Entrez Gene ID	Símbolo	Nome
124	-12,90167178	CD19	930	CD19	CD19 molecule
125	-12,80212939	LILRB2	10288	LILRB2	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 2
126	-12,77282957	ANGPTL6	83854	ANGPTL6	angiopoietin-like 6
127	-12,62850419	C3orf59	151963	C3orf59	chromosome 3 open reading frame 59
128	-12,61123478	MCTP2	55784	MCTP2	multiple C2 domains, transmembrane 2
129	-12,59777226	CXorf57	55086	CXorf57	chromosome X open reading frame 57
130	-12,51729741	AHRR	57491	AHRR	aryl-hydrocarbon receptor repressor
131	-12,46765633	IL12B	3593	IL12B	interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40)
132	-12,44333456	SLC16A3	9123	SLC16A3	solute carrier family 16, member 3 (monocarboxylic acid transporter 4)
133	-12,3981004	ALPK2	115701	ALPK2	alpha-kinase 2
134	-12,39476179	CTSH	1512	CTSH	cathepsin H
135	-12,1904743	PTPRC	5788	PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
136	-12,01387256	CXCL3	2921	CXCL3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3
137	-11,89805303	AIM1	202	AIM1	absent in melanoma 1
138	-11,80718748	OSBPL10	114884	OSBPL10	oxysterol binding protein-like 10
139	-11,70360627	PAPSS2	9060	PAPSS2	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2
140	-11,5402157	TGM5	9333	TGM5	transglutaminase 5
141	-11,21390232	HSPA1A	3303	HSPA1A	heat shock 70kDa protein 1A
142	-11,1924897	TCF15	6939	TCF15	transcription factor 15 (basic helix-loop-helix)
143	-11,1794015	ITGB3	3690	ITGB3	integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)
144	-11,17228056	CCDC74B	91409	CCDC74B	coiled-coil domain containing 74B
145	-10,9215508	KIAA1913	114801	KIAA1913	KIAA1913
146	-10,87599523	CCL22	6367	CCL22	chemokine (C-C motif) ligand 22
147	-10,83625773	CD79B	974	CD79B	CD79b molecule, immunoglobulin-associated beta
148	-10,71515883	ZBED2	79413	ZBED2	zinc finger, BED-type containing 2
149	-10,70471859	MLC1	23209	MLC1	megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 1
150	-10,66275343	ZNF284	342909	ZNF284	zinc finger protein 284
151	-10,50605906	CXorf27	25763	CXorf27	chromosome X open reading frame 27
152	-10,4533177	TRIM32	22954	TRIM32	tripartite motif-containing 32
153	-10,36731302	CHMP4C	92421	CHMP4C	chromatin modifying protein 4C
154	-10,33947299	SLAMF6	114836	SLAMF6	SLAM family member 6
155	-10,32161903	PBX4	80714	PBX4	pre-B-cell leukemia transcription factor 4
156	-10,3078327	ITGB7	3695	ITGB7	integrin, beta 7
157	-10,26033279	ZNF222	7673	ZNF222	zinc finger protein 222
158	-10,25319435	RAD54B	25788	RAD54B	RAD54 homolog B (S. cerevisiae)
159	-10,18322339	LIN28B	389421	LIN28B	lin-28 homolog B (C. elegans)
160	-10,12690331	TNFAIP2	7127	TNFAIP2	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2
161	-10,09796855	CBLB	868	CBLB	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence b
162	-10,06210015	ITGB3	3690	ITGB3	integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)
163	-10,0489877	C5orf13	9315	C5orf13	chromosome 5 open reading frame 13
164	-10,01467283	IGF1	3479	IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)

Anexo 2: 489 genes mais expressos na linhagem EBV-positiva (continuação)

Número	"Fold"	Input ID	Entrez Gene ID	Símbolo	Nome
165	-10,00574229	THAP10	56906	THAP10	THAP domain containing 10
166	-9,942286343	EBI3	10148	EBI3	Epstein-Barr virus induced gene 3
167	-9,824259007	DDEF2	8853	DDEF2	development and differentiation enhancing factor 2
168	-9,687105754	TSPO	706	TSPO	translocator protein (18kDa)
169	-9,677432159	PAQR9	344838	PAQR9	progesterin and adipoQ receptor family member IX
170	-9,652320717	SLC2A5	6518	SLC2A5	solute carrier family 2 (facilitated glucose/fructose transporter), member 5
171	-9,624033621	RORA	6095	RORA	RAR-related orphan receptor A
172	-9,617133831	GALC	2581	GALC	galactosylceramidase
173	-9,498542742	LAPTM5	7805	LAPTM5	lysosomal associated multispinning membrane protein 5
174	-9,467192875	PYGL	5836	PYGL	phosphorylase, glycogen; liver (Hers disease, glycogen storage disease type VI)
175	-9,437117752	B3GALT4	8705	B3GALT4	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 4
176	-9,375371011	LRRK2	120892	LRRK2	leucine-rich repeat kinase 2
177	-9,299136493	ADAMTS4	9507	ADAMTS4	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 4
178	-9,279610961	ALDH2	217	ALDH2	aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)
179	-9,26598544	BAZ2B	29994	BAZ2B	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2B
180	-9,236367469	TDO2	6999	TDO2	tryptophan 2,3-dioxygenase
181	-9,106493067	SH3BP2	6452	SH3BP2	SH3-domain binding protein 2
182	-9,0775013	ARL4A	10124	ARL4A	ADP-ribosylation factor-like 4A
183	-9,07076956	CD53	963	CD53	CD53 molecule
184	-9,048368227	C6orf32	9750	C6orf32	chromosome 6 open reading frame 32
185	-9,022704995	MSL3L1	10943	MSL3L1	male-specific lethal 3-like 1 (Drosophila)
186	-9,013933792	C6orf114	85411	C6orf114	chromosome 6 open reading frame 114
187	-8,955777338	DUSP5	1847	DUSP5	dual specificity phosphatase 5
188	-8,918278047	DSC3	1825	DSC3	desmocollin 3
189	-8,857608779	BLVRA	644	BLVRA	biliverdin reductase A
190	-8,850857713	ZNF551	90233	ZNF551	zinc finger protein 551
191	-8,724743059	CASP5	838	CASP5	caspase 5, apoptosis-related cysteine peptidase
192	-8,701277659	ABLIM3	22885	ABLIM3	actin binding LIM protein family, member 3
193	-8,699368302	C19orf36	113177	C19orf36	chromosome 19 open reading frame 36
194	-8,662663337	LRIG1	26018	LRIG1	leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1
195	-8,618237759	EVI2B	2124	EVI2B	ecotropic viral integration site 2B
196	-8,617802635	LZTFL1	54585	LZTFL1	leucine zipper transcription factor-like 1
197	-8,596650826	APOBEC3G	60489	APOBEC3G	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G
198	-8,531992211	FAM92A1	137392	FAM92A1	family with sequence similarity 92, member A1
199	-8,489278324	MGLL	11343	MGLL	monoglyceride lipase
200	-8,463907789	ZNF264	9422	ZNF264	zinc finger protein 264
201	-8,453217913	C10orf47	254427	C10orf47	chromosome 10 open reading frame 47
202	-8,444184471	CTDSPL	10217	CTDSPL	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase-like
203	-8,410767737	POU2F2	5452	POU2F2	POU domain, class 2, transcription factor 2
204	-8,409013668	ZNF22	7570	ZNF22	zinc finger protein 22 (KOX 15)
205	-8,313130204	SYK	6850	SYK	spleen tyrosine kinase

Anexo 2: 489 genes mais expressos na linhagem EBV-positiva (continuação)

Número	"Fold"	Input ID	Entrez Gene ID	Símbolo	Nome
206	-8,308707763	ATF7IP2	80063	ATF7IP2	activating transcription factor 7 interacting protein 2
207	-8,275478862	PTGIR	5739	PTGIR	prostaglandin I2 (prostacyclin) receptor (IP)
208	-8,272856918	ARMCX5	64860	ARMCX5	armadillo repeat containing, X-linked 5
209	-8,216807445	ARHGEF5	7984	ARHGEF5	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 5
210	-8,163725714	CR2	1380	CR2	complement component (3d/Epstein Barr virus) receptor 2
211	-8,146893899	OPLAH	26873	OPLAH	5-oxoprolinase (ATP-hydrolysing)
212	-8,070926277	CDH11	1009	CDH11	cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)
213	-8,060028823	COL4A5	1287	COL4A5	collagen, type IV, alpha 5 (Alport syndrome)
214	-7,955634695	PCDH21	92211	PCDH21	protocadherin 21
215	-7,953497493	TSPAN15	23555	TSPAN15	tetraspanin 15
216	-7,92738218	RARB	5915	RARB	retinoic acid receptor, beta
217	-7,922327867	EVL	51466	EVL	Enah/Vasp-like
218	-7,913041999	PRDM1	639	PRDM1	PR domain containing 1, with ZNF domain
219	-7,876095647	TP53INP1	94241	TP53INP1	tumor protein p53 inducible nuclear protein 1
220	-7,849820224	HLA-DOA	3111	HLA-DOA	major histocompatibility complex, class II, DO alpha
221	-7,847319601	LNPEP	4012	LNPEP	leucyl/cystinyl aminopeptidase
222	-7,842665871	PLEKHO1	51177	PLEKHO1	pleckstrin homology domain containing, family O member 1
223	-7,785012335	PKIG	11142	PKIG	protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor gamma
224	-7,755929664	GPR177	79971	GPR177	G protein-coupled receptor 177
225	-7,740282877	CD226	10666	CD226	CD226 molecule
226	-7,715461911	ENPP2	5168	ENPP2	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (autotaxin)
227	-7,704286141	C1orf38	9473	C1orf38	chromosome 1 open reading frame 38
228	-7,681695158	EDG6	8698	EDG6	endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptor, 6
229	-7,663453652	TNIP3	79931	TNIP3	TNFAIP3 interacting protein 3
230	-7,649906094	RASSF5	83593	RASSF5	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 5
231	-7,641519557	GCHFR	2644	GCHFR	GTP cyclohydrolase I feedback regulator
232	-7,640104375	HMOX1	3162	HMOX1	heme oxygenase (decycling) 1
233	-7,63562231	DSG2	1829	DSG2	desmoglein 2
234	-7,56518234	SLC12A6	9990	SLC12A6	solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters), member 6
235	-7,526246743	SYTL1	84958	SYTL1	synaptotagmin-like 1
236	-7,525552971	SLC44A2	57153	SLC44A2	solute carrier family 44, member 2
237	-7,524657804	ROR2	4920	ROR2	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2
238	-7,466378431	HPGD	3248	HPGD	hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)
239	-7,437363803	KRT222P	125113	KRT222P	keratin 222 pseudogene
240	-7,430024466	ZNF44	51710	ZNF44	zinc finger protein 44
241	-7,41215974	GLRX	2745	GLRX	glutaredoxin (thioltransferase)
242	-7,348433089	CASP4	837	CASP4	caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase
243	-7,336523114	PLAUR	5329	PLAUR	plasminogen activator, urokinase receptor
244	-7,309840959	RAPGEF4	11069	RAPGEF4	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4
245	-7,306920021	PIK3R5	23533	PIK3R5	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 5, p101
246	-7,299013827	FMNL3	91010	FMNL3	formin-like 3

Anexo 2: 489 genes mais expressos na linhagem EBV-positiva (continuação)

Número	"Fold"	Input ID	Entrez Gene ID	Símbolo	Nome
247	-7,227777471	HECW2	57520	HECW2	HECT, C2 and WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2
248	-7,1696132	DUSP23	54935	DUSP23	dual specificity phosphatase 23
249	-7,166828668	MTL5	9633	MTL5	metallothionein-like 5, testis-specific (tesmin)
250	-7,150445872	VASP	7408	VASP	vasodilator-stimulated phosphoprotein
251	-7,122528443	SIGLEC10	89790	SIGLEC10	sialic acid binding Ig-like lectin 10
252	-7,115380822	VLDLR	7436	VLDLR	very low density lipoprotein receptor
253	-7,113019655	TIAM2	26230	TIAM2	T-cell lymphoma invasion and metastasis 2
254	-7,111842157	TMEPAI	56937	TMEPAI	transmembrane, prostate androgen induced RNA
255	-7,066348933	C6orf85	63027	C6orf85	chromosome 6 open reading frame 85
256	-7,057561607	KCNN4	3783	KCNN4	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4
257	-7,029618182	CRY1	1407	CRY1	cryptochrome 1 (photolyase-like)
258	-7,017454179	EVC2	132884	EVC2	Ellis van Creveld syndrome 2 (limbin)
259	-7,009709809	TMEM166	84141	TMEM166	transmembrane protein 166
260	-6,972132822	GALNT11	63917	GALNT11	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 11 (GalNAc-T11)
261	-6,914307922	CDC42EP3	10602	CDC42EP3	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3
262	-6,879901147	MYH11	4629	MYH11	myosin, heavy chain 11, smooth muscle
263	-6,870242318	ITGA4	3676	ITGA4	integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)
264	-6,84762585	HCP5	10866	HCP5	HLA complex P5
265	-6,840469952	KCNN3	3782	KCNN3	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 3
266	-6,826068515	C10orf116	10974	C10orf116	chromosome 10 open reading frame 116
267	-6,797064668	NPNT	255743	NPNT	nephronectin
268	-6,790876146	ST3GAL4	6484	ST3GAL4	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 4
269	-6,778115229	LIMD2	80774	LIMD2	LIM domain containing 2
270	-6,778003728	TNFAIP8L2	79626	TNFAIP8L2	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8-like 2
271	-6,742365042	C21orf121	150142	C21orf121	chromosome 21 open reading frame 121
272	-6,718868029	TRAF1	7185	TRAF1	TNF receptor-associated factor 1
273	-6,685071619	LGALS14	56891	LGALS14	lectin, galactoside-binding, soluble, 14
274	-6,678730262	BLNK	29760	BLNK	B-cell linker
275	-6,659158625	TRIB1	10221	TRIB1	tribbles homolog 1 (Drosophila)
276	-6,623837969	CD22	933	CD22	CD22 molecule
277	-6,592680934	SUHW4	54816	SUHW4	suppressor of hairy wing homolog 4 (Drosophila)
278	-6,584894414	MUC1	4582	MUC1	mucin 1, cell surface associated
279	-6,57859028	HAVCR2	84868	HAVCR2	hepatitis A virus cellular receptor 2
280	-6,475993313	ACOXL	55289	ACOXL	acyl-Coenzyme A oxidase-like
281	-6,469505966	GLIPR1	11010	GLIPR1	GLI pathogenesis-related 1 (glioma)
282	-6,457326134	CCDC50	152137	CCDC50	coiled-coil domain containing 50
283	-6,449653061	TEKT4	150483	TEKT4	tektin 4
284	-6,442820323	UACA	55075	UACA	uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats
285	-6,433040958	CDKN1A	1026	CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
286	-6,406620641	MYO1F	4542	MYO1F	myosin IF
287	-6,406086998	SIDT2	51092	SIDT2	SID1 transmembrane family, member 2

Anexo 2: 489 genes mais expressos na linhagem EBV-positiva (continuação)

Número	"Fold"	Input ID	Entrez Gene ID	Símbolo	Nome
288	-6,384327057	ADAM19	8728	ADAM19	ADAM metallopeptidase domain 19 (meltrin beta)
289	-6,329055819	METTL7A	25840	METTL7A	methyltransferase like 7A
290	-6,327004354	KATNAL1	84056	KATNAL1	katanin p60 subunit A-like 1
291	-6,282765056	HEY1	23462	HEY1	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1
292	-6,272908057	DGKI	9162	DGKI	diacylglycerol kinase, iota
293	-6,237062455	SUSD1	64420	SUSD1	sushi domain containing 1
294	-6,232625715	SH3BP5	9467	SH3BP5	SH3-domain binding protein 5 (BTK-associated)
295	-6,230112067	CYP2U1	113612	CYP2U1	cytochrome P450, family 2, subfamily U, polypeptide 1
296	-6,209820928	FXYD5	53827	FXYD5	FXYD domain containing ion transport regulator 5
297	-6,201691035	CAB39L	81617	CAB39L	calcium binding protein 39-like
298	-6,141991698	KLF8	11279	KLF8	Kruppel-like factor 8
299	-6,109171339	CAPG	822	CAPG	capping protein (actin filament), gelsolin-like
300	-6,104144191	SOX4	6659	SOX4	SRY (sex determining region Y)-box 4
301	-6,103225067	DUSP2	1844	DUSP2	dual specificity phosphatase 2
302	-6,092518451	LATS2	26524	LATS2	LATS, large tumor suppressor, homolog 2 (Drosophila)
303	-6,087375523	SLC43A2	124935	SLC43A2	solute carrier family 43, member 2
304	-6,086611458	LYN	4067	LYN	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog
305	-6,069307273	BAIAP2L1	55971	BAIAP2L1	BAI1-associated protein 2-like 1
306	-6,067922781	KCNA3	3738	KCNA3	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 3
307	-6,067575271	LGALS13	29124	LGALS13	lectin, galactoside-binding, soluble, 13 (galectin 13)
308	-6,020526534	MYADM	91663	MYADM	myeloid-associated differentiation marker
309	-6,020456399	SAT1	6303	SAT1	spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1
310	-6,009577892	RHBDF2	79651	RHBDF2	rhomboid 5 homolog 2 (Drosophila)
311	-6,006131856	C16orf74	404550	C16orf74	chromosome 16 open reading frame 74
312	-5,996257643	BCL2L14	79370	BCL2L14	BCL2-like 14 (apoptosis facilitator)
313	-5,988380034	GPR157	80045	GPR157	G protein-coupled receptor 157
314	-5,955944274	ENAH	55740	ENAH	enabled homolog (Drosophila)
315	-5,954739708	FAM78A	286336	FAM78A	family with sequence similarity 78, member A
316	-5,946894284	CD80	941	CD80	CD80 molecule
317	-5,914487892	TMPRSS6	164656	TMPRSS6	transmembrane protease, serine 6
318	-5,896681342	CYP1B1	1545	CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1
319	-5,802086331	WDR7	23335	WDR7	WD repeat domain 7
320	-5,800966626	MEF2C	4208	MEF2C	MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide C (myocyte enhancer factor 2C)
321	-5,793220221	PHGDH	26227	PHGDH	phosphoglycerate dehydrogenase
322	-5,783469811	LRRC34	151827	LRRC34	leucine rich repeat containing 34
323	-5,777028725	CDH1	999	CDH1	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
324	-5,776504053	ALPK1	80216	ALPK1	alpha-kinase 1
325	-5,773224928	SPN	6693	SPN	sialophorin (leukosialin, CD43)
326	-5,762601697	ANPEP	290	ANPEP	alanil (membrane) aminopeptidase (aminopeptidase N, aminopeptidase M, microsomal aminopeptidase, CD13, p150)
327	-5,745847207	NCF2	4688	NCF2	neutrophil cytosolic factor 2 (65kDa, chronic granulomatous disease, autosomal 2)

Anexo 2: 489 genes mais expressos na linhagem EBV-positiva (continuação)

Número	"Fold"	Input ID	Entrez Gene ID	Símbolo	Nome
328	-5,723806048	RAP2A	5911	RAP2A	RAP2A, member of RAS oncogene family
329	-5,71406273	ACP5	54	ACP5	acid phosphatase 5, tartrate resistant
330	-5,713015039	EPHX2	2053	EPHX2	epoxide hydrolase 2, cytoplasmic
331	-5,709274959	KIAA1189	57471	KIAA1189	KIAA1189
332	-5,691897696	ZNF302	55900	ZNF302	zinc finger protein 302
333	-5,67866744	SLC36A4	120103	SLC36A4	solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member 4
334	-5,678659454	TMEM49	81671	TMEM49	transmembrane protein 49
335	-5,678103469	KIAA0922	23240	KIAA0922	KIAA0922
336	-5,677043496	GCET2	257144	GCET2	germinal center expressed transcript 2
337	-5,65364954	BBS1	582	BBS1	Bardet-Biedl syndrome 1
338	-5,636845082	TMEM100	55273	TMEM100	transmembrane protein 100
339	-5,594929428	TNFRSF14	8764	TNFRSF14	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14 (herpesvirus entry mediator)
340	-5,548619101	HES1	3280	HES1	hairy and enhancer of split 1, (Drosophila)
341	-5,539314266	C14orf49	161176	C14orf49	chromosome 14 open reading frame 49
342	-5,517104904	NUDT12	83594	NUDT12	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 12
343	-5,512930244	DOCK9	23348	DOCK9	dedicator of cytokinesis 9
344	-5,486139686	EVI2A	2123	EVI2A	ecotropic viral integration site 2A
345	-5,455660194	POU5F1	5460	POU5F1	POU domain, class 5, transcription factor 1
346	-5,454044623	ARHGEF17	9828	ARHGEF17	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 17
347	-5,4318371	ARHGDIB	397	ARHGDIB	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta
348	-5,421434045	H6PD	9563	H6PD	hexose-6-phosphate dehydrogenase (glucose 1-dehydrogenase)
349	-5,369862678	TMEM132A	54972	TMEM132A	transmembrane protein 132A
350	-5,368733026	BIN2	51411	BIN2	bridging integrator 2
351	-5,362915842	DUSP22	56940	DUSP22	dual specificity phosphatase 22
352	-5,350043364	ANKRD5	63926	ANKRD5	ankyrin repeat domain 5
353	-5,343831192	GZMB	3002	GZMB	granzyme B (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1)
354	-5,336895284	C20orf112	140688	C20orf112	chromosome 20 open reading frame 112
355	-5,309887801	PBEF1	10135	PBEF1	pre-B-cell colony enhancing factor 1
356	-5,26048093	CPEB3	22849	CPEB3	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 3
357	-5,251364238	MAN1A1	4121	MAN1A1	mannosidase, alpha, class 1A, member 1
358	-5,250794517	CD274	29126	CD274	CD274 molecule
359	-5,23795039	ABCA1	19	ABCA1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1
360	-5,191106937	HERC5	51191	HERC5	hect domain and RLD 5
361	-5,116535294	HSD11B1	3290	HSD11B1	hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1
362	-5,10813147	CSF2RA	1438	CSF2RA	colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity (granulocyte-macrophage)
363	-5,090419519	RYR2	6262	RYR2	ryanodine receptor 2 (cardiac)
364	-5,068079268	MAP7	9053	MAP7	microtubule-associated protein 7
365	-5,019962212	PRKCH	5583	PRKCH	protein kinase C, eta
366	-5,017331708	C8orf38	137682	C8orf38	chromosome 8 open reading frame 38
367	-5,015087986	AGT	183	AGT	angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)
368	-5,007196331	SYTL3	94120	SYTL3	synaptotagmin-like 3

Anexo 2: 489 genes mais expressos na linhagem EBV-positiva (continuação)

Número	"Fold"	Input ID	Entrez Gene ID	Símbolo	Nome
369	-4,985453122	FAM123A	219287	FAM123A	family with sequence similarity 123A
370	-4,98441273	VAMP5	10791	VAMP5	vesicle-associated membrane protein 5 (myobrevin)
371	-4,96944222	RASAL2	9462	RASAL2	RAS protein activator like 2
372	-4,969112417	GRAMD1B	57476	GRAMD1B	GRAM domain containing 1B
373	-4,968314369	RAC2	5880	RAC2	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2)
374	-4,94618184	CTSZ	1522	CTSZ	cathepsin Z
375	-4,933652545	PAG1	55824	PAG1	phosphoprotein associated with glycosphingolipid microdomains 1
376	-4,929666123	LAMC1	3915	LAMC1	laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)
377	-4,926969151	SLFN11	91607	SLFN11	schlafen family member 11
378	-4,923830577	C18orf1	753	C18orf1	chromosome 18 open reading frame 1
379	-4,918630491	ZNF600	162966	ZNF600	zinc finger protein 600
380	-4,895200981	CFB	629	CFB	complement factor B
381	-4,879819495	SCARB1	949	SCARB1	scavenger receptor class B, member 1
382	-4,865744767	PSCD3	9265	PSCD3	pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains 3
383	-4,858898386	FKBP9L	360132	FKBP9L	FK506 binding protein 9-like
384	-4,826730079	PIGR	5284	PIGR	polymeric immunoglobulin receptor
385	-4,821670209	PFKFB3	5209	PFKFB3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3
386	-4,81407155	TNFSF12	8742	TNFSF12	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12
387	-4,806784927	NAB1	4664	NAB1	NGFI-A binding protein 1 (EGR1 binding protein 1)
388	-4,766699759	PDE6H	5149	PDE6H	phosphodiesterase 6H, cGMP-specific, cone, gamma
389	-4,753239586	TMEM163	81615	TMEM163	transmembrane protein 163
390	-4,753177551	PLK2	10769	PLK2	polo-like kinase 2 (Drosophila)
391	-4,749810063	LY6E	4061	LY6E	lymphocyte antigen 6 complex, locus E
392	-4,744824561	CD82	3732	CD82	CD82 molecule
393	-4,719560932	CXCL10	3627	CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
394	-4,692971809	ZNF761	388561	ZNF761	zinc finger protein 761
395	-4,690776511	APBB1IP	54518	APBB1IP	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1 interacting protein
396	-4,680538883	ECHDC2	55268	ECHDC2	enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 2
397	-4,664070013	PRSS12	8492	PRSS12	protease, serine, 12 (neurotrypsin, motopsin)
398	-4,663438796	C3orf28	26355	C3orf28	chromosome 3 open reading frame 28
399	-4,65386136	PDE4D	5144	PDE4D	phosphodiesterase 4D, cAMP-specific (phosphodiesterase E3 dunce homolog, Drosophila)
400	-4,653434185	GLCC1	113263	GLCC1	glucocorticoid induced transcript 1
401	-4,651658033	MALAT1	378938	MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-coding RNA)
402	-4,651064217	UNC5C	8633	UNC5C	unc-5 homolog C (C. elegans)
403	-4,648077086	TIRAP	114609	TIRAP	toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein
404	-4,637555042	DEF6	50619	DEF6	differentially expressed in FDCP 6 homolog (mouse)
405	-4,626309007	TIMD4	91937	TIMD4	T-cell immunoglobulin and mucin domain containing 4
406	-4,622462899	CPEB2	132864	CPEB2	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 2
407	-4,619897302	IGLL1	3543	IGLL1	immunoglobulin lambda-like polypeptide 1
408	-4,608936421	LOXL3	84695	LOXL3	lysyl oxidase-like 3
409	-4,600292791	HHLA2	11148	HHLA2	HERV-H LTR-associating 2

Anexo 2: 489 genes mais expressos na linhagem EBV-positiva (continuação)

Número	"Fold"	Input ID	Entrez Gene ID	Símbolo	Nome
410	-4,59774283	SIPA1	6494	SIPA1	signal-induced proliferation-associated gene 1
411	-4,59627794	PRKAR2B	5577	PRKAR2B	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta
412	-4,588005107	RAB3C	115827	RAB3C	RAB3C, member RAS oncogene family
413	-4,580984773	PITPNC1	26207	PITPNC1	phosphatidylinositol transfer protein, cytoplasmic 1
414	-4,569482569	HLA-DRB3	3125	HLA-DRB3	major histocompatibility complex, class II, DR beta 3
415	-4,564961924	TP53I3	9540	TP53I3	tumor protein p53 inducible protein 3
416	-4,564328174	ZNF358	140467	ZNF358	zinc finger protein 358
417	-4,561156176	BMPR2	659	BMPR2	bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)
418	-4,556243879	ZNF606	80095	ZNF606	zinc finger protein 606
419	-4,544975483	S100A11	6282	S100A11	S100 calcium binding protein A11
420	-4,544919076	KDEL1	79070	KDEL1	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) containing 1
421	-4,529204025	CCDC80	151887	CCDC80	coiled-coil domain containing 80
422	-4,527331178	PPFIBP1	8496	PPFIBP1	PTPRF interacting protein, binding protein 1 (liprin beta 1)
423	-4,515620774	PFKFB4	5210	PFKFB4	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4
424	-4,496267253	CFLAR	8837	CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
425	-4,491242254	MYO1G	64005	MYO1G	myosin IG
426	-4,484065428	TP53INP2	58476	TP53INP2	tumor protein p53 inducible nuclear protein 2
427	-4,463364558	ALB	213	ALB	albumin
428	-4,448306933	FLT1	2321	FLT1	fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)
429	-4,441899735	PPIL6	285755	PPIL6	peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 6
430	-4,44015999	SLCO4A1	28231	SLCO4A1	solute carrier organic anion transporter family, member 4A1
431	-4,43360316	CST3	1471	CST3	cystatin C (amyloid angiopathy and cerebral hemorrhage)
432	-4,423323071	DYNLRB2	83657	DYNLRB2	dynein, light chain, roadblock-type 2
433	-4,422360975	ZNF558	148156	ZNF558	zinc finger protein 558
434	-4,392554922	TCN2	6948	TCN2	transcobalamin II; macrocytic anemia
435	-4,390087331	CORO2A	7464	CORO2A	coronin, actin binding protein, 2A
436	-4,382937763	OSBPL3	26031	OSBPL3	oxysterol binding protein-like 3
437	-4,381453696	FNDC3A	22862	FNDC3A	fibronectin type III domain containing 3A
438	-4,377416781	C7orf46	340277	C7orf46	chromosome 7 open reading frame 46
439	-4,37471928	FBN1	2200	FBN1	fibrillin 1
440	-4,374464606	HIC1	3090	HIC1	hypermethylated in cancer 1
441	-4,372425737	FRY	10129	FRY	furry homolog (Drosophila)
442	-4,371823917	ACADS	35	ACADS	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-2 to C-3 short chain
443	-4,368344702	CCDC109B	55013	CCDC109B	coiled-coil domain containing 109B
444	-4,367214506	GLT25D2	23127	GLT25D2	glycosyltransferase 25 domain containing 2
445	-4,366796863	SEC14L1	6397	SEC14L1	SEC14-like 1 (S. cerevisiae)
446	-4,353185628	EDG5	9294	EDG5	endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 5
447	-4,325667478	FAM64A	54478	FAM64A	family with sequence similarity 64, member A
448	-4,322678429	GHR	2690	GHR	growth hormone receptor
449	-4,304083696	ALDOC	230	ALDOC	aldolase C, fructose-bisphosphate
450	-4,277485492	OLAH	55301	OLAH	oleoyl-ACP hydrolase

Anexo 2: 489 genes mais expressos na linhagem EBV-positiva (continuação)

Número	"Fold"	Input ID	Entrez Gene ID	Símbolo	Nome
451	-4,26922392	SMAD3	4088	SMAD3	SMAD, mothers against DPP homolog 3 (Drosophila)
452	-4,263930607	RAB31	11031	RAB31	RAB31, member RAS oncogene family
453	-4,26107068	WDR35	57539	WDR35	WD repeat domain 35
454	-4,255249449	HLA-DRA	3122	HLA-DRA	major histocompatibility complex, class II, DR alpha
455	-4,252952362	CRISPLD2	83716	CRISPLD2	cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2
456	-4,251514594	GSTP1	2950	GSTP1	glutathione S-transferase pi
457	-4,248820451	HLA-G	3135	HLA-G	HLA-G histocompatibility antigen, class I, G
458	-4,243741388	MDGA1	266727	MDGA1	MAM domain containing glycosylphosphatidylinositol anchor 1
459	-4,239889752	AGMAT	79814	AGMAT	agmatine ureohydrolase (agmatinase)
460	-4,236480628	KIAA1217	56243	KIAA1217	KIAA1217
461	-4,231415233	RHOH	399	RHOH	ras homolog gene family, member H
462	-4,211838046	PAK1	5058	PAK1	p21/Cdc42/Rac1-activated kinase 1 (STE20 homolog, yeast)
463	-4,202439586	EFCAB2	84288	EFCAB2	EF-hand calcium binding domain 2
464	-4,193177491	HLA-DQB2	3120	HLA-DQB2	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 2
465	-4,18436763	DST	667	DST	dystonin
466	-4,182846861	C4orf18	51313	C4orf18	chromosome 4 open reading frame 18
467	-4,179873013	CXCL13	10563	CXCL13	chemokine (C-X-C motif) ligand 13 (B-cell chemoattractant)
468	-4,175485315	GUCY1A2	2977	GUCY1A2	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 2
469	-4,172211923	CDC42BPA	8476	CDC42BPA	CDC42 binding protein kinase alpha (DMPK-like)
470	-4,159781058	PALLD	23022	PALLD	palladin, cytoskeletal associated protein
471	-4,158254592	LRRC56	115399	LRRC56	leucine rich repeat containing 56
472	-4,154898418	CBS	875	CBS	cystathionine-beta-synthase
473	-4,128073319	ZDHHC21	340481	ZDHHC21	zinc finger, DHHC-type containing 21
474	-4,124241702	PEX5L	51555	PEX5L	peroxisomal biogenesis factor 5-like
475	-4,110634413	SEC31B	25956	SEC31B	SEC31 homolog B (S. cerevisiae)
476	-4,103281535	ARHGEF6	9459	ARHGEF6	Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6
477	-4,103270774	RGN	9104	RGN	regucalcin (senescence marker protein-30)
478	-4,099622254	SLC44A1	23446	SLC44A1	solute carrier family 44, member 1
479	-4,093299877	TLE4	7091	TLE4	transducin-like enhancer of split 4 (E(sp1) homolog, Drosophila)
480	-4,086526492	PITPNM1	9600	PITPNM1	phosphatidylinositol transfer protein, membrane-associated 1
481	-4,076108945	MIA	8190	MIA	melanoma inhibitory activity
482	-4,048763995	ITK	3702	ITK	IL2-inducible T-cell kinase
483	-4,043710938	P4HA2	8974	P4HA2	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha polypeptide II
484	-4,030858666	TUBB4	10382	TUBB4	tubulin, beta 4
485	-4,025116711	MSN	4478	MSN	moesin
486	-4,018882293	CD40	958	CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5
487	-4,01435063	TRPM4	54795	TRPM4	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 4
488	-4,010023457	SCG5	6447	SCG5	secretogranin V (7B2 protein)
489	-4,004698804	MAPK8	5599	MAPK8	mitogen-activated protein kinase 8

Anexo 3: Genes diferencialmente expressos em amostras de tecido fresco congelado

Número	"Fold" Pos/Neg	TargetID	Símbolo	Nome
1	-3,166103636	NM_012449	STEAP1	six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1
2	-2,670069173	NM_016157	TRO	trophinin
3	-2,498775494	NM_017651	AHI1	Abelson helper integration site 1
4	-2,458524227	NM_003898	SYNJ2	synaptojanin 2
5	-2,335076462	NM_152421	FAM69B	family with sequence similarity 69. member B
6	-2,086186801	AK128423	CIRBP	cold inducible RNA binding protein
7	-2,047286774	NM_021070	LTBP3	latent transforming growth factor beta binding protein 3
8	-2,014254986	NM_019845	RPRM	reprimin. TP53 dependent G2 arrest mediator candidate
9	-1,996803253	NM_173551	ANKS6	ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 6
10	-1,981145694	NM_173485	TSHZ2	teashirt family zinc finger 2
11	-1,952286079	NM_017460	CYP3A4	cytochrome P450. family 3. subfamily A. polypeptide 4
12	-1,938280916	ENST00000292562	ZNF251	zinc finger protein 251
13	-1,928529555	NM_021724	NR1D1	nuclear receptor subfamily 1. group D. member 1
14	-1,927352426	NM_033210	ZNF502	zinc finger protein 502
15	-1,923649799	NM_002218	ITIH4	inter-alpha (globulin) inhibitor H4 (plasma Kallikrein-sensitive glycoprotein)
16	-1,900589658	NM_001025266	LOC285382	hypothetical gene supported by AK091454
17	-1,862727641	NM_001635	AMPH	amphiphysin (Stiff-Man syndrome with breast cancer 128kDa autoantigen)
18	-1,839921608	NM_003436	ZNF135	zinc finger protein 135
19	-1,803386145	NM_003995	NPR2	natriuretic peptide receptor B/guanylate cyclase B (atrionatriuretic peptide receptor B)
20	-1,785679057	AF495725	SLC25A37	solute carrier family 25. member 37
21	-1,775368592	NM_032682	FOXP1	forkhead box P1
22	-1,711535774	NM_152988	SPPL2B	signal peptide peptidase-like 2B
23	-1,679846086	NM_013312	HOOK2	hook homolog 2 (Drosophila)
24	-1,663011217	NM_017671	C20orf42	chromosome 20 open reading frame 42
25	-1,663004549	ENST00000302057	IRX2	iroquois homeobox protein 2
26	-1,611546419	NM_030937	CCNL2	cyclin L2
27	-1,609972618	NM_133450	ANKS3	ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 3
28	-1,590213653	NM_004695	SLC16A5	solute carrier family 16. member 5 (monocarboxylic acid transporter 6)
29	-1,588982879	NM_020665	TMEM27	transmembrane protein 27
30	-1,58733132	NM_018430	TSNAXIP1	translin-associated factor X interacting protein 1
31	-1,555891686	NM_032853	MUM1	melanoma associated antigen (mutated) 1
32	-1,546355791	NM_006262	PRPH	peripherin
33	-1,543377779	NM_014432	IL2ORA	interleukin 20 receptor. alpha
34	-1,542187515	NM_182552	WDR27	WD repeat domain 27
35	-1,519411499	NM_033419	PERLD1	per1-like domain containing 1
36	-1,509598139	NM_030770	TMPRSS5	transmembrane protease. serine 5 (spinesin)
37	-1,480591354	NM_020376	PNPLA2	patatin-like phospholipase domain containing 2
38	-1,478674767	NM_032160	DSEL	dermatan sulfate epimerase-like
39	-1,472679935	NM_004089	TSC22D3	TSC22 domain family. member 3
40	-1,467843722	NM_025161	C17orf70	chromosome 17 open reading frame 70
41	-1,440893745	NM_018419	SOX18	SRY (sex determining region Y)-box 18

Anexo 3: Genes diferencialmente expressos em amostras de tecido fresco congelado (continuação)

Número	"Fold" Pos/Neg	TargetID	Símbolo	Nome
42	-1,439233746	NM_001009944	PKD1	polycystic kidney disease 1 (autosomal dominant)
43	-1,415608451	NM_031454	RP3-402G11.5	selenoprotein O
44	-1,412957024	BC000527	EWSR1	Ewing sarcoma breakpoint region 1
45	-1,406520731	NM_005859	PURA	purine-rich element binding protein A
46	-1,381921223	NM_003086	SNAPC4	small nuclear RNA activating complex. polypeptide 4. 190kDa
47	-1,380626396	NM_032213	RBED1	RNA binding motif and ELMO/CED-12 domain 1
48	-1,372237488	NM_022817	PER2	period homolog 2 (Drosophila)
49	-1,370148328	NM_017883	WDR13	WD repeat domain 13
50	-1,369687715	NM_006092	NOD1	nucleotide-binding oligomerization domain containing 1
51	-1,369263213	NM_181489	ZNF445	zinc finger protein 445
52	-1,356167383	NM_182923	KLC1	kinesin light chain 1
53	-1,352590537	AF280547	NRP1	neuropilin 1
54	-1,349104983	NM_020713	ZNF512B	zinc finger protein 512B
55	-1,338670848	NM_022843	PCDH20	protocadherin 20
56	-1,332392398	NM_053005	HCCA2	HCCA2 protein
57	-1,329578887	NM_006767	LZTR1	leucine-zipper-like transcription regulator 1
58	-1,328659495	NM_032826	SLC35B4	solute carrier family 35. member B4
59	-1,324673069	NM_000950	PRRG1	proline rich Gla (G-carboxyglutamic acid) 1
60	-1,321215903	NM_016122	CCDC41	coiled-coil domain containing 41
61	-1,311354989	NM_014080	DUOX2	dual oxidase 2
62	-1,310252046	NM_018346	RSAD1	radical S-adenosyl methionine domain containing 1
63	-1,309092408	NM_001888	CRYM	crystallin. mu
64	-1,306232876	NM_003760	EIF4G3	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma. 3
65	-1,30114479	NM_014849	SV2A	synaptic vesicle glycoprotein 2A
66	-1,300635478	NM_021008	DEAF1	deformed epidermal autoregulatory factor 1 (Drosophila)
67	-1,298779134	NM_012157	FBXL2	F-box and leucine-rich repeat protein 2
68	-1,298529446	NM_138452	DHRS1	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 1
69	-1,29743007	NM_152743	C7orf27	chromosome 7 open reading frame 27
70	-1,295940068	NM_017797	BTBD2	BTB (POZ) domain containing 2
71	-1,2909883	NM_000765	CYP3A7	cytochrome P450. family 3. subfamily A. polypeptide 7
72	-1,288075139	NM_020378	NAT14	N-acetyltransferase 14
73	-1,286243789	NM_012239	SIRT3	sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 3 (S. cerevisiae)
74	-1,276278831	NM_005657	TP53BP1	tumor protein p53 binding protein. 1
75	-1,275415662	NM_007255	B4GALT7	xylosylprotein beta 1.4-galactosyltransferase. polypeptide 7 (galactosyltransferase I)
76	-1,272456442	NM_015654	NAT9	N-acetyltransferase 9
77	-1,270986788	AL390151	ZBTB7A	zinc finger and BTB domain containing 7A
78	-1,260873586	NM_006393	NEBL	nebullette
79	-1,260547836	NM_002651	PIK4CB	phosphatidylinositol 4-kinase. catalytic. beta polypeptide
80	-1,259217603	NM_001006630	CHRM2	cholinergic receptor. muscarinic 2
81	-1,257484546	NM_025078	PQLC1	PQ loop repeat containing 1
82	-1,257198377	NM_022764	MTHFSD	methenyltetrahydrofolate synthetase domain containing

Anexo 3: Genes diferencialmente expressos em amostras de tecido fresco congelado (continuação)

Número	"Fold" Pos/Neg	TargetID	Símbolo	Nome
83	-1,253519277	NM_152307	C14orf172	chromosome 14 open reading frame 172
84	-1,238288938	NM_007359	CASC3	cancer susceptibility candidate 3
85	-1,234497319	NM_015545	PTCD1	pentatricopeptide repeat domain 1
86	-1,226640692	NM_002917	RFNG	RFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase
87	-1,223944827	NM_001039476	C16orf35	chromosome 16 open reading frame 35
88	-1,223583936	NM_020210	SEMA4B	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain. (semaphorin) 4B
89	-1,220238798	NM_003951	SLC25A14	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, brain), member 14
90	-1,217511347	NM_174923	CCDC107	coiled-coil domain containing 107
91	-1,214476264	NM_012235	SCAP	SREBF chaperone
92	-1,21339581	NM_030895	ZNF696	zinc finger protein 696
93	-1,210574242	ENST00000272907	KIAA1486	KIAA1486 protein
94	-1,199118571	NM_006037	HDAC4	histone deacetylase 4
95	-1,197953122	NM_016526	BET1L	blocked early in transport 1 homolog (S. cerevisiae)-like
96	-1,185306739	NM_033266	ERN2	endoplasmic reticulum to nucleus signalling 2
97	-1,185294529	CD050206	hCG_1815504	hCG1815504
98	-1,181624617	NM_001261	CDK9	cyclin-dependent kinase 9 (CDC2-related kinase)
99	-1,179437286	NM_004359	CDC34	cell division cycle 34 homolog (S. cerevisiae)
100	-1,176281234	NM_001040457	RHBDD2	rhomboïd domain containing 2
101	-1,16718321	NM_001080421	UNC13A	unc-13 homolog A (C. elegans)
102	-1,158357137	NM_152757	FLJ30313	hypothetical protein FLJ30313
103	-1,157330806	NM_017744	ST7L	suppression of tumorigenicity 7 like
104	-1,155792933	NM_080414	VPS16	vacuolar protein sorting 16 homolog (S. cerevisiae)
105	-1,144508343	NM_005687	FARSB	phenylalanyl-tRNA synthetase, beta subunit
106	-1,140322835	NM_000343	SLC5A1	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 1
107	-1,136676956	NM_032840	SPRYD3	SPRY domain containing 3
108	-1,134683034	NM_007259	VPS45	vacuolar protein sorting 45 homolog (S. cerevisiae)
109	-1,127399892	NM_030640	DUSP16	dual specificity phosphatase 16
110	-1,106021447	NM_153375	PLAC2	placenta-specific 2
111	-1,101650033	NM_000400	ERCC2	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2 (xeroderma pigmentosum D)
112	-1,100108749	NM_019088	PAF1	Paf1, RNA polymerase II associated factor, homolog (S. cerevisiae)
113	1,126094825	NM_001005328	OR2A7	olfactory receptor, family 2, subfamily A, member 7
114	1,143564403	NM_002255	KIR2DL4	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 4
115	1,148137107	NM_003477	PDHX	pyruvate dehydrogenase complex, component X
116	1,164319551	NM_018373	SYNJ2BP	synaptojanin 2 binding protein
117	1,167484438	AK095603	KIAA1822	KIAA1822
118	1,175173312	NM_022457	RFWD2	ring finger and WD repeat domain 2
119	1,178036422	AK091468	SMUG1	single-strand-selective monofunctional uracil-DNA glycosylase 1
120	1,181642047	NM_005427	TP73	tumor protein p73
121	1,198804187	AB067495	KIAA1908	KIAA1908 protein
122	1,203356674	NM_145014	HYLS1	hydrolethalus syndrome 1
123	1,233554267	XM_001129035	hCG_1657112	hCG1657112

Anexo 3: Genes diferencialmente expressos em amostras de tecido fresco congelado (continuação)

Número	"Fold" Pos/Neg	TargetID	Símbolo	Nome
124	1,239501423	NM_003093	SNRPC	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide C
125	1,24005542	NM_012387	PADI4	peptidyl arginine deiminase. type IV
126	1,250139301	NM_014484	MOCS3	molybdenum cofactor synthesis 3
127	1,253023568	NM_004547	NDUFB4	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex. 4. 15kDa
128	1,253062939	NM_003375	VDAC2	voltage-dependent anion channel 2
129	1,259975448	NM_004564	PET112L	PET112-like (yeast)
130	1,262827914	NM_138792	LEO1	Leo1. Paf1/RNA polymerase II complex component. homolog (S. cerevisiae)
131	1,265053652	NM_017955	CDCA4	cell division cycle associated 4
132	1,265487187	NM_015180	SYNE2	spectrin repeat containing. nuclear envelope 2
133	1,267255678	NM_005925	MEP1B	meprin A. beta
134	1,268463776	L02932	PPARA	peroxisome proliferator-activated receptor alpha
135	1,270712833	NM_006937	SUMO2	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 2 (S. cerevisiae)
136	1,275141244	NM_152363	ANKRD41	ankyrin repeat domain 41
137	1,280812234	NM_001926	DEFA6	defensin. alpha 6. Paneth cell-specific
138	1,285234555	NM_006234	POLR2J	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide J. 13.3kDa
139	1,285667544	NM_004663	RAB11A	RAB11A. member RAS oncogene family
140	1,291761788	NM_024632	SAP30L	SAP30-like
141	1,295093771	NM_007238	PXMP4	peroxisomal membrane protein 4. 24kDa
142	1,296386587	BC030111	MGC42157	hypothetical locus MGC42157
143	1,298150922	NM_017613	DONSON	downstream neighbor of SON
144	1,315482525	NM_005901	SMAD2	SMAD family member 2
145	1,321762221	BC058160	LOC554234	ribosomal protein L36a pseudogene
146	1,32343508	NM_004782	SNAP29	synaptosomal-associated protein. 29kDa
147	1,325678517	BC107860	LOC401397	hypothetical LOC401397
148	1,327260634	NM_024955	FOXRED2	FAD-dependent oxidoreductase domain containing 2
149	1,33103412	BC031691	SLAIN2	SLAIN motif family. member 2
150	1,331839618	NM_016231	NLK	nemo-like kinase
151	1,335206379	NM_000285	PEPD	peptidase D
152	1,336807019	NM_001533	HNRPL	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L
153	1,342145928	NM_005782	THOC4	THO complex 4
154	1,35399475	NM_002125	HLA-DRB5	major histocompatibility complex. class II. DR beta 5
155	1,360195878	NM_198175	NME1	non-metastatic cells 1. protein (NM23A) expressed in
156	1,360572266	NM_001859	SLC31A1	solute carrier family 31 (copper transporters). member 1
157	1,360934023	NM_032151	PCBD2	pterin-4 alpha-carbinolamine dehydratase/dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1 alpha (TCF1) 2
158	1,362975049	NM_006755	TALDO1	transaldolase 1
159	1,374815151	NM_000965	RARB	retinoic acid receptor. beta
160	1,375416578	NM_000532	PCCB	propionyl Coenzyme A carboxylase. beta polypeptide
161	1,376463704	AK122995	GPR113	G protein-coupled receptor 113
162	1,376688972	NM_182634	FLJ36166	hypothetical protein FLJ36166
163	1,37990616	NM_080656	MGC13017	similar to RIKEN cDNA A430101B06 gene
164	1,385296428	NM_002266	KPNA2	karyopherin alpha 2 (RAG cohort 1. importin alpha 1)

Anexo 3: Genes diferencialmente expressos em amostras de tecido fresco congelado (continuação)

Número	"Fold" Pos/Neg	TargetID	Símbolo	Nome
165	1,391567851	NM_015905	TRIM24	tripartite motif-containing 24
166	1,393099315	NM_017821	RHBDL2	rhomboid. veinlet-like 2 (Drosophila)
167	1,393754636	NM_003002	SDHD	succinate dehydrogenase complex. subunit D. integral membrane protein
168	1,397799917	NM_203364	CAPRIN1	cell cycle associated protein 1
169	1,399099309	NM_001047	SRD5A1	steroid-5-alpha-reductase. alpha polypeptide 1 (3-oxo-5 alpha-steroid delta 4-dehydrogenase alpha 1)
170	1,405109973	NM_012321	LSM4	LSM4 homolog. U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)
171	1,415540894	NM_144639	UROC1	urocanase domain containing 1
172	1,427281012	NM_173167	UNC45B	unc-45 homolog B (C. elegans)
173	1,428586059	NM_033117	RBM18	RNA binding motif protein 18
174	1,436411253	NM_139243	Tenr	testis nuclear RNA-binding protein
175	1,443780758	NM_015161	ARL6IP1	ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein 1
176	1,45414305	NM_003729	RTCD1	RNA terminal phosphate cyclase domain 1
177	1,462981407	NM_130848	C5orf20	chromosome 5 open reading frame 20
178	1,476460868	NM_016086	STYXL1	serine/threonine/tyrosine interacting-like 1
179	1,479360017	NM_004027	INPP4A	inositol polyphosphate-4-phosphatase. type I. 107kDa
180	1,479988847	NM_003495	HIST1H4I	histone cluster 1. H4i
181	1,486214129	NM_173517	VKORC1L1	vitamin K epoxide reductase complex. subunit 1-like 1
182	1,496109809	BC033618	SPECC1	sperm antigen with calponin homology and coiled-coil domains 1
183	1,496882216	NM_005917	MDH1	malate dehydrogenase 1. NAD (soluble)
184	1,498723013	NM_139013	MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14
185	1,500847611	NM_001002876	CENPM	centromere protein M
186	1,505309249	NM_144709	FLJ32312	hypothetical protein FLJ32312
187	1,513463623	NM_024940	DOCK5	dedicator of cytokinesis 5
188	1,517195522	NM_004784	NDST3	N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 3
189	1,518405795	NM_000688	ALAS1	aminolevulinatase. delta-. synthase 1
190	1,526322119	BC037547	CDC20B	cell division cycle 20 homolog B (S. cerevisiae)
191	1,531777211	NM_182620	FAM33A	family with sequence similarity 33. member A
192	1,533487189	NM_080621	SAMD10	sterile alpha motif domain containing 10
193	1,535793961	NM_016625	RSRC1	arginine/serine-rich coiled-coil 1
194	1,545560027	NM_000447	PSEN2	presenilin 2 (Alzheimer disease 4)
195	1,554931825	NM_018638	ETNK1	ethanolamine kinase 1
196	1,556421182	NM_006085	BPNT1	3'(2'). 5'-bisphosphate nucleotidase 1
197	1,566954654	NM_198157	UBE2L3	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3
198	1,571140546	NM_001909	CTSD	cathepsin D
199	1,572967445	NM_013257	SGK3	serum/glucocorticoid regulated kinase family. member 3
200	1,577454399	NM_002985	CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5
201	1,590052686	NM_173532	FNDC7	fibronectin type III domain containing 7
202	1,591335533	NM_004789	LHX2	LIM homeobox 2
203	1,595373678	NM_006547	IGF2BP3	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3
204	1,596205429	NM_147148	GSTM4	glutathione S-transferase M4
205	1,602290449	NM_005540	INPP5B	inositol polyphosphate-5-phosphatase. 75kDa

Anexo 3: Genes diferencialmente expressos em amostras de tecido fresco congelado (continuação)

Número	"Fold" Pos/Neg	TargetID	Símbolo	Nome
206	1,605206895	NM_005321	HIST1H1E	histone cluster 1. H1e
207	1,607595005	NM_015600	ABHD12	abhydrolase domain containing 12
208	1,623667536	AB209777	BTN2A1	butyrophilin. subfamily 2. member A1
209	1,624123601	NM_025049	PIF1	PIF1 5'-to-3' DNA helicase homolog (S. cerevisiae)
210	1,625448206	NM_003215	TEC	tec protein tyrosine kinase
211	1,645007293	NM_031299	CDCA3	cell division cycle associated 3
212	1,650954603	NM_016027	LACTB2	lactamase. beta 2
213	1,660293353	ENST00000332148	LOC441795	similar to high-mobility group box 3
214	1,66053106	NM_017667	CCDC132	coiled-coil domain containing 132
215	1,660705536	NM_000310	PPT1	palmitoyl-protein thioesterase 1 (ceroid-lipofuscinosis. neuronal 1. infantile)
216	1,670037398	NM_019886	CHST7	carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 7
217	1,671323746	NM_198468	C6orf167	chromosome 6 open reading frame 167
218	1,676071045	NM_006153	NCK1	NCK adaptor protein 1
219	1,677916834	NM_017589	BTG4	B-cell translocation gene 4
220	1,678594879	NM_004217	AURKB	aurora kinase B
221	1,680504873	XR_018106	LOC647771	similar to Mak3 homolog
222	1,690304386	NM_182910	SYNE2	spectrin repeat containing. nuclear envelope 2
223	1,692507293	NM_014089	NUPL1	nucleoporin like 1
224	1,70982451	NM_021067	GINS1	GINS complex subunit 1 (Psf1 homolog)
225	1,746969228	NM_016521	TFDP3	transcription factor Dp family. member 3
226	1,752879662	NM_003526	HIST1H2BC	histone cluster 1. H2bc
227	1,76481062	AK001795	KIF24	kinesin family member 24
228	1,784536661	NM_002104	GZMK	granzyme K (granzyme 3; tryptase II)
229	1,788342555	NM_000791	DHFR	dihydrofolate reductase
230	1,789026925	NM_198468	C6orf167	chromosome 6 open reading frame 167
231	1,804374472	NM_000791	DHFR	dihydrofolate reductase
232	1,804726615	NM_003666	BLZF1	basic leucine zipper nuclear factor 1 (JEM-1)
233	1,833928998	NM_012413	QPCT	glutaminyl-peptide cyclotransferase (glutaminyl cyclase)
234	1,844023928	NM_175065	HIST2H2AB	histone cluster 2. H2ab
235	1,846868348	NM_080669	SLC46A1	solute carrier family 46. member 1
236	1,847025085	NM_003686	EXO1	exonuclease 1
237	1,848066066	NM_001005210	LRRC55	leucine rich repeat containing 55
238	1,888103381	NM_053067	UBQLN1	ubiquilin 1
239	1,906206625	NM_002854	PVALB	parvalbumin
240	1,913655224	NM_182523	MGC61571	hypothetical protein MGC61571
241	1,922488135	XR_019587	LOC124496	similar to ATP synthase B chain. mitochondrial precursor
242	1,939630348	BC005077	FANCF	Fanconi anemia. complementation group F
243	1,951653318	NM_001335	CTSW	cathepsin W
244	1,969133183	ENST00000373644	CXXC6	CXXC finger 6
245	1,972156116	NM_018101	CDCA8	cell division cycle associated 8
246	1,999398389	NM_001335	CTSW	cathepsin W

Anexo 3: Genes diferencialmente expressos em amostras de tecido fresco congelado (continuação)

Número	"Fold" Pos/Neg	TargetID	Símbolo	Nome
247	2,002802859	NM_032844	MASTL	microtubule associated serine/threonine kinase-like
248	2,058866519	NM_002497	NEK2	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 2
249	2,111555723	NM_014783	ARHGAP11A	Rho GTPase activating protein 11A
250	2,124634476	NM_203394	E2F7	E2F transcription factor 7
251	2,275235089	NM_003650	CST7	cystatin F (leukocystatin)
252	2,293871634	NM_001786	CDC2	cell division cycle 2. G1 to S and G2 to M
253	2,329319856	NM_030769	NPL	N-acetylneuraminate pyruvate lyase (dihydrodipicolinate synthase)
254	2,443660764	NM_033423	GZMH	granzyme H (cathepsin G-like 2. protein h-CCPX)
255	2,461397823	NM_145654	RDM1	RAD52 motif 1
256	2,549858625	NM_022346	NCAPG	non-SMC condensin I complex. subunit G
257	2,665186258	NM_012413	QPCT	glutaminyl-peptide cyclotransferase (glutaminyl cyclase)
258	2,792694186	NM_152304	RAB42	RAB42. member RAS oncogene family
259	2,91066117	NM_002003	FCN1	ficolin (collagen/fibrinogen domain containing) 1
260	3,128977881	NM_002497	NEK2	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 2
261	3,383701301	BC016703	FLJ20581	hypothetical protein FLJ20581
262	4,936682442	NM_000235	LIPA	lipase A. lysosomal acid. cholesterol esterase (Wolman disease)
263	7,376423796	NR_001298	HLA-DRB6	major histocompatibility complex. class II. DR beta 6 (pseudogene)
264	7,394808915	NM_002260	KLRC2	killer cell lectin-like receptor subfamily C. member 2