

Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER Coordenação de Pós-graduação Stricto sensu

# MARIA GABRIELA VERA LOZADA

# PAPEL DO VÍRUS EPSTEIN-BARR E DE FATORES **GENÉTICOS NOS PERFIS IMUNES DO MICROAMBIENTE** TUMORAL NO LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO **PEDIATRICO**

**Orientadora: Prof: Dra. Rocio Hassan** Co-orientador: Dr. Mário Henrique Magalhães Barros

> **Rio de Janeiro** 2017



Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER Coordenação de Pós-graduação Stricto sensu

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER** Pós-Graduação em Oncologia

MARIA GABRIELA VERA LOZADA

## PAPEL DO VÍRUS EPSTEIN-BARR E DE FATORES GENÉTICOS NOS PERFIS IMUNES DO MICROAMBIENTE TUMORAL NO LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO PEDIÁTRICO

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Câncer como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Oncologia

Orientadora: Prof: Dra. Rocio Hassan Co-orientador: Dr. Mário Henrique Magalhães Barros

### **Rio de Janeiro** 2017

#### V475p Vera-Lozada, Maria Gabriela.

Papel do vírus Epstein-Barr e de fatores genéticos nos perfis imunes do microambiente tumoral no linfoma de Hodgkin clássico pediátrico. / Maria Gabriela Vera Lozada. – Rio de Janeiro: INCA, 2017. 184 f. il.

Tese (Doutorado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2017.

Orientador: Rocio Hassan.

1. Linfoma de Hodgkin. 2. Microambiente tumoral. 3. Vírus Epstein-Barr. 4. Inflamação. 5. Supressão. 6. Sobrevida. 7. Exaustão. I. Hassan, Rocio (Orient.). III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

CDD 616.99446



Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva NSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER Coordenação de Pós-graduação Stricto sensu

> **INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER** Pós-Graduação em Oncologia

## MARIA GABRIELA VERA LOZADA

## PAPEL DO VÍRUS EPSTEIN-BARR E DE FATORES GENÉTICOS NOS PERFIS IMUNES DO MICROAMBIENTE TUMORAL NO LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO PEDIÁTRICO

Orientador: Prof. Dra. Rocio Hassan

Co-orientador: Dr. Mário Henrique Magalhães Barros

**Aprovada em:** <u>14 / 06 / 2017</u>

**EXAMINADORES:** 

**Dr. Miguel Moreira** 

**Dr. Martin Bonamino** 

Dr. Bruno Diaz

**Dr. Marcelo Land** 

Dra. Renata Binato (Suplente)

**Dr. Fabio Leal (Suplente)** 

#### **RIO DE JANEIRO** 2017

À meus pais: Carmen Teresa e Germán.

#### AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Rocio, não tenho palavras para agradecer por todo o apoio, oportunidade de aprendizado, conselhos, amizade e por sempre acreditar e me forçar a dar o melhor de mim. Muito obrigada!

Ao Mário, pela ajuda e por compartilhar seus conhecimentos para o desenvolvimento deste trabalho.

À Priscilla, Davi, Carol M. e Paula, pelo companheirismo, amizade compartilhada, solidariedade, discussões científicas e apoio nas diferentes etapas deste trabalho.

À todas as pessoas do Laboratório de Oncovirologia do CEMO, Vanessa, Bianca, Priscilla, Davi, Flavia, Paula, Débora, Verónica, Elielson e Raquel, pela colaboração e companheirismo no dia a dia.

À Dra. Elizabeth Tapia e à todo o pessoal do Laboratório de Bio e agroinformática do CIFASIS (Rosário –Argentina) pela oportunidade brindada no estágio sanduíche e análises bioinformáticas desenvolvidos neste estudo, em especial ao Ing. Joaquin Ezpeleta e Dra. Flavia Krsticevic.

À Dra. Eliana Abdelhay pelo apoio financeiro e fazer possível a oportunidade do estágio no exterior.

À todo o pessoal do CEMO pelo carinho em todo este tempo.

À todo o pessoal do Laboratório de Imunologia do CEMO, em especial a Virginia e Mayara, por terem aberto as portas do laboratório e pelo companheirismo brindado.

Ao Dr. Gustavo Stefanoff, pelo apoio, troca de conhecimentos, ajuda concedida desde o primeiro dia da minha chegada e por ser essa pessoa que sempre está disponível em qualquer situação.

Aos Dr. Bárbara Du Rocher, Dr. Julio C. de Freitas Junior e Dra. Raquel Lopes Costa por terem compartilhado seus conhecimentos e por ter me acompanhado em algumas fases deste caminho.

Aos meus pais e irmão, pelo amor, apoio e entendimento na distância e por terem me incentivado a superar as dificuldades e a continuar a seguir em frente em todos os momentos.

À Jesús, pelo amor, apoio, paciência no dia a dia e por sempre estar presente em todo momento.

Aos meus amigos, Tállita, Jackie, Luisa, Carol, Raphael Tavares e Lauana pelo carinho no dia a dia e por serem essas pessoas aos quais sempre se pode acreditar e confiar, meus mais sinceros agradecimentos.

À Flavia e Malu pelo apoio e hospitalidade prestada durante a minha estadia em Rosário. Meu muito obrigado!!

À María Belén, parte deste logro foi incentivado por ti.

À família Flores Silva, pela amizade, conselhos, carinho, apoio cordial, por estarem sempre dispostos a ajudar e serem esse pedacinho da terra natal que nunca se esquece.

À todas as pessoas que, por diferentes motivos, foram fonte de inspiração e coragem nessa caminhada.

À Pós-Graduação em Oncologia do Instituto Nacional de Câncer pela oportunidade e ensinamentos.

À Danielle e ao Rodrigo pela ajuda burocrática ao longo desse trabalho.

À Coordenação de Ensino e Divulgação Científica (CEDC) – INCA pelo alojamento concedido numa etapa deste caminho.

Às agências de Fomento, CAPES, CNPq, FAPERJ, e INCT para o Controle do Câncer (INCA).

Aos pacientes, este trabalho não teria sido desenvolvido sem eles, é a motivação para sempre continuar na procura de respostas para seu bem estar.

"É impossível progredir sem mudança, e aqueles que não mudam suas mentes não podem mudar nada."

George Bernard Shaw



Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer, José Alencar Gomes da Silva Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu* 

#### PAPEL DO VÍRUS EPSTEIN-BARR E DE FATORES GENÉTICOS NOS PERFIS IMUNES DO MICROAMBIENTE TUMORAL NO LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO PEDIÁTRICO

#### RESUMO

O linfoma de Hodgkin clássico (LHc) é caracterizado por apresentar 0,5-1% de células neoplásicas (Hodgkin e Reed-Sternberg) com alta dependência do microambiente tumoral (MAT) formado por células inflamatórias e estromais. Este linfoma encontra-se associado ao vírus Epstein-Barr (EBV) em ~40-50% dos casos em nossa região. No LHc pediátrico EBV+, o MAT apresenta um perfil imune pró-inflamatório (células T citotóxicas/Th1), que poderia estar sendo inibido por mecanismos supressores pró-tumorais. Nosso objetivo foi investigar o MAT do LHc, o papel potencial do EBV e o papel do *background* genético individual na modulação do MAT. Por isto, foi proposto avaliar perfis de expressão gênica relacionados a potenciais mecanismos supressores e variantes genéticas associadas à resposta imune local, definida pela quantificação de subpopulações imunes mediante imunohistoquímica quantitativa, em linfonodos de pacientes pediátricos com LHc EBV+ e EBV-. Análises dos polimorfismos genéticos nas posições -1082/-592 do gene IL10 e +49/CT60 do gene CTLA4. Expressão de genes associados à resposta imune por RT-qPCR [perfil pro-inflamatório: CXCL10, IFNG e STAT1; supressor: IL10 e STAT6; checkpoint imune: CTLA4 (isoformas flCTLA4, completa e sCTLA4, solúvel), PDCD1, PD1L/CD274, HAVCR2/TIM3 e BTLA e; fatores de transcrição: EOMES e TBX21/TBET] foram analisados em relação às características clínicas-epidemiológicas, composição do MAT e resposta terapêutica. Análises bioinformáticas foram desenvolvidas na procura de uma assinatura relacionada à exaustão celular associada ao EBV. No gene IL10, genótipos -1082AA+AG foram associados a altos níveis de RNAm (P=0,014) e, os genótipos -1082GG/-592CC (baixa expressão) a um menor número de células MAF+ e haplótipo ATA (alta expressão) a um incremento de células MAF+ (P<0,05) no MAT. Pior sobrevida livre de progressão (SLP) preponderou nos pacientes com genótipos -1082AA+AG vs. GG, -592AA+AC vs. CC e no haplótipo ATA (P<0,05). No gene CTLA4, genótipos +49GG e CT60GG (baixo poder inibitório) foram associados a maior número de células citotóxicas (P<0,05). Pacientes com alta expressão de HAVCR2/TIM3, sCTLA4 e razões sCTLA4/flCTLA4>1,5 e EOMES/TBX21>1,5 apresentaram pior SLP (P < 0.05). Alta expressão de IFNG e STAT1 e baixa de STAT6 foram identificadas nos casos EBV+ vs. EBV- (P<0,05). In silico, a presença do EBV foi associada a maior número de células citotóxicas e a menor número de células T CD4+ totais e subpopulações T CD4+ naïve e T reguladoras (P<0,05). Na potencial assinatura de exaustão específica do LHc, genes relacionados à ativação e inibição de células inflamatórias foram identificados (CD80, CD86, KLRB1, IL1RB2), já nos LHcEBV+ uma resposta antiviral foi identificada (FASLG, SLAMF7, GRZA, GRZK, CEACAM1). Com isto, estes resultados mostram que variantes genéticas regulam os níveis de expressão e composição do MAT, impactando no desfecho terapêutico; perfis moleculares/celulares distintos são identificados nos casos EBV+ vs. EBV-, mostrando que a presença do EBV está associada a uma resposta pró-inflamatória, porém poderia mediar um estado celular de exaustão via contato célula-célula; a identificação de mediadores de supressão, como variantes genéticas e expressão de IL10 e genes do checkpoint imune, sugerem mecanismos supressores e de exaustão imune que poderia, em parte, ser responsável pela resposta inflamatória não funcional.



Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer, José Alencar Gomes da Silva Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu* 

#### THE ROLE OF EPSTEIN-BARR VIRUS AND GENETIC FACTORS IN IMMUNE PROFILES OF TUMOR MICROENVIRONMENT IN PEDIATRIC CLASSICAL HODGKIN LYMPHOMA

#### ABSTRACT

Classical Hodgkin lymphoma (cHL) is characterized by having 0.5-1% neoplastic (Hodgkin and Reed-Sternberg) cells, highly dependent of the tumor microenvironment (TME) formed by inflammatory and stromal cells. This lymphoma is associated Epstein-Barr virus (EBV) in ~40-50% of cases in our region. In pediatric EBV+cHL, the TME exhibits a pro-inflammatory immune profile (cytotoxic T cells/Th1), which could be inhibited by pro-tumor suppressor mechanisms. Our goal was to investigate the potential role of EBV and the role of individual genetic background on TME modulation and to characterize features of immune exhaustion. To these aims, we evaluated gene expression profiles related to potential suppressor mechanisms and genetic variants associated with the local immune response, defined by the quantification of immune subpopulations by quantitative immunohistochemistry, in lymph nodes of pediatric patients with EBV+ and EBV- cHL. Analyses of genetic polymorphisms the IL10 gene -1082/-592 positions and +49/CT60 positions in CTLA4 were performed. Expression of genes associated with the immune response by RT-qPCR [pro-inflammatory profile: CXCL10, IFNG, and STAT1; suppressor: IL10 and STAT6; checkpoint immune: CTLA4 (isoforms flCTLA4, full lenght and sCTLA4, soluble), PDCD1, PD1L/CD274, HAVCR2/TIM3, and BTLA, and; transcription factors: EOMES and TBX21/TBET] were analyzed in relation to the clinical-epidemiological characteristics, TME cell composition and therapeutic response. Bioinformatics analyses were developed in the search for a signature related to cellular exhaustion associated to EBV. In *IL10* gene, genotypes -1082AA+AG were associated with high levels of mRNA (P=0.014) and genotypes -1082GG/-592CC (low expression) to lower numbers of MAF+ cells, while ATA haplotype (high expression) to a high count of MAF+ cells (P < 0.05) in the TME. A worse progression-free survival (PFS) prevailed in the patients with genotypes -1082AA+AG vs. GG, -592AA+AC vs. CC and in the ATA haplotype (P<0.05). In the CTLA4 gene, genotypes +49GG and CT60GG (low inhibitory power) were associated with a higher number of cytotoxic cells (P < 0.05). Patients with high expression of HAVCR2/TIM3, sCTLA4, and sCTLA4/flCTLA4> 1.5 and EOMES/TBX21> 1.5 ratios exhibited a worse PFS (P<0.05). High IFNG and STAT1, and low STAT6 expression were characteristic of EBV+ vs. EBV- cases (P < 0.05). In silico, the presence of EBV was associated with a higher number of cytotoxic cells and a lower number of total CD4+ T cells and naïve CD4+ T and regulatory T subpopulations (P < 0.05). The potential signature associated with cHL exhaustion, genes related to the activation and inhibition of inflammatory cells was identified (CD80, CD86, KLRB1, IL1RB2). In EBV+ cHL an antiviral response was identified characterized by the expression of FASLG, SLAMF7, GRZA, GRZK, CEACAM1. Our results show that IL10 genetic variants may modulate TME composition, impacting on the therapeutic outcome; distinct molecular/cellular profiles were identified in EBV+ vs. EBV- cases, where EBV presence is associated with a proinflammatory response but could mediate cellular exhaustion by cell-cell contact; the identification of suppressor mediators and genes of immune checkpoint suggest suppressor mechanisms that could be partly responsible for the nonfunctional inflammatory response.

## INDICE

1	INT	INTRODUÇAO	
	1.1 Modulação do microambiente tumoral no linfoma de Hodgkin clássico: do		
		hospedeiro ao vírus Epstein-Barr	1
	1.2	Linfoma de Hodgkin clássico	3
	1.3	O vírus Epstein-Barr nas doenças benignas e malignas e sua associação com o linfoma de Hodgkin clássico	6
	1.4	Perfis de citocinas e quimiocinas no linfoma de Hodgkin clássico	7
	1.5	Mecanismos e papel do EBV na evasão imune no linfoma de Hodgkin clássico	9
	1.6	Moléculas do checkpoint imune no microambiente tumoral do LHc	11
	1.7	O linfoma de Hodgkin clássico em pacientes pediátricos: a procura de novos	
		biomarcadores	16
	1.8	Justificativa e antecedentes do estudo	17
2	OB.	IETIVOS	19
	2.1	Objetivo geral	19
	2.2	Objetivos específicos	19
3	MA	TERIAL E MÉTODOS	20
	3.1	Pacientes e amostras	20
	3.2	Dados clínicos e epidemiológicos	22
3.3 Métodos de extração de ácidos nucleicos a partir de amostras fixadas e		Métodos de extração de ácidos nucleicos a partir de amostras fixadas e incluídas	em
		parafina	22
	3.4	Avaliação da qualidade e quantidade dos ácidos nucleicos extraídos	23
	3.5	Genotipagem	23
	3.5.1	Genotipagem por discriminação alélica mediante a metodologia TaqMan®	24
	3.5.2	Confirmação da genotipagem pelo sequenciamento de Sanger	25
	3.5.3	Construção dos haplótipos	26
	3.6	Quantificação da expressão gênica	27

## INDICE (continuação)

	3.6.1	Informação mínima necessária pra publicação de experimentos em PCR quantitat	
		(MIQE)	31
3.7 Técnica de imunohistoquímica e quantificação das células por análise		Técnica de imunohistoquímica e quantificação das células por análise microscóp	ica
		Computacional Assistida	31
	3.8	Hibridização in situ para EBERs (EBER-ISH)	32
	3.9	Abordagem bioinformática a partir de banco de dados públicos de expressão gên	ica
			33
	3.9.1	Quantificação celular a partir de dados de expressão gênica provenientes de	
		microarranjos	34
	3.9.2	Identificação de uma assinatura de expressão gênica do estado celular de exaustã	0
			35
	3.10	Análises estatísticas	35
	3.10.1	Análises genéticas	36
	3.10.2	Análise de sobrevida	36
4	RES	SULTADOS	38
	4.1	Perfis de imunossupressão: Polimorfismos genéticos no gene IL10 e a modulação	С
		da composição do microambiente tumoral no linfoma de Hodgkin clássico	39
	4.1.1	Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes	39
	4.1.2	Polimorfismos no promotor proximal do gene de IL10	39
	4.1.3	Relação entre polimorfismos no promotor do gene IL10 e níveis de RNAm	40
4.1.4 Associação das variantes genéticas da <i>IL10</i> com a composição do microam		Associação das variantes genéticas da IL10 com a composição do microambiente	3
		tumoral	41
	4.1.5	Polimorfismos genéticos e níveis de expressão gênica da IL10 relacionados às	
		características clínicas e terapêuticas dos pacientes pediátricos com linfoma de	
		Hodgkin clássico	44
	4.1.6	Discussão	49
	4.2	Caracterização de moléculas associadas ao checkpoint imune e ao perfil de exaus	stão
		no linfoma de Hodgkin clássico	53

## INDICE (continuação)

4.2.1	Análise de expressão gênica de moléculas relacionadas ao <i>checkpoint</i> imune 5		
4.2.2	Níveis de expressão de genes relacionados ao checkpoint imune associado ao per	fil	
	imune inflamatório e supressor no linfoma de Hodgkin clássico	56	
4.2.3	Identificação e quantificação de células PD1 positivas intratumorais em pacientes	5	
	pediátricos com linfoma de Hodgkin clássico	57	
4.2.4	Análise da composição do microambiente tumoral em relação à expressão de gen	es	
	associados ao checkpoint imune	58	
4.2.5	Impacto clínico da expressão de genes do checkpoint imune	60	
4.2.6	Fatores de transcrição EOMES e TBX21/TBET associados à resposta terapêutica e	em	
	pacientes pediátricos com linfoma de Hodgkin clássico	64	
4.2.7	Discussão	66	
4.3	Variantes genéticas no gene CTLA4 e níveis de expressão em pacientes pediátrico	<b>DS</b>	
	com linfoma de Hodgkin clássico	71	
4.3.1	Polimorfismos no gene CTLA4 associados às características clínicas	72	
4.3.2	Polimorfismos no gene CTLA4 e níveis de expressão das isoformas moleculares r	na	
	modulação do microambiente tumoral	72	
4.3.3	Níveis de expressão das isoformas do gene CTLA4 associados à resposta terapêut	ica	
	em pacientes pediátricos com linfoma de Hodgkin clássico	74	
4.3.4	Discussão	75	
4.4	Perfis de expressão gênica e celulares associados ao vírus Epstein-Barr	79	
4.4.1	Caracterização da associação entre linfoma de Hodgkin clássico e vírus Epstein-		
	Barr	79	
4.4.1.1	Características do microambiente tumoral no linfoma de Hodgkin clássico		
	associados ou não ao vírus Epstein-Barr	80	
4.4.2	Diferenças nos níveis de expressão de genes relacionados ao checkpoint imune		
	segundo a presença do vírus Epstein-Barr	84	
4.4.3	Na busca de uma assinatura de expressão gênica do estado de exaustão celular		
	associado ao vírus Epstein-Barr	85	

INDICE (continuação)

	4.4.3.1	Proposta de uma assinatura gênica relacionada ao estado de exaustão nos	
		linfócitos T citotóxicos CD8 positivos	85
	4.4.3.2	l Identificação de um potencial perfil de expressão gênica associado ao fenôme	no de
		exaustão no linfoma de Hodgkin clássico associado ao vírus Epstein-Barr	89
	4.4.4	Discussão	95
5	DIS	CUSSÃO	102
6	CO	NCLUSÕES	105
7	REF	FERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
A	NEXO	I	133
A	NEXO	Ш	134
A	NEXO	III	135
A	NEXO	IV	141
A	NEXO	V	150
A	NEXO	VI	151
A	NEXO	VII	157
A	NEXO	VIII	158

#### LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Moléculas inibitórias e ligantes associadas ao checkpoint imune	13
Tabela 3.1 Características das crianças e adolescentes com linfoma de Hodgkin cl	ássico
incluídas no presente estudo.	21
Tabela 3.2 Iniciadores/sondas utilizados na avaliação de polimorfismos avaliados medi	ante a
metodologia TaqMan <sup>®</sup>	24
Tabela 3.3 Ensaios de PCR em tempo real quantitativo mediante a metodologia TaqMar	ı® 29
Tabela 3.4 Ensaios de PCR em tempo real quantitativo mediante corante intercalante	30
Tabela 3.5 Dados utilizados nas análises de bioinformática	33
Tabela 4.1 Regressão logística linear, utilizando como variável dependente a razão de c	élulas
MAF+/TBET+ em log10 da composição do MAT	44
<b>Tabela 4.2</b> Análise de sobrevida livre de progressão (SLP) segundo os genótipos e hapl no promotor do gene <i>IL10</i> em pacientes pediátricos com diagnóstico de linfoma de Ho	ótipos odgkin

**Tabela 4.3** Regressão de Cox considerando os genótipos/haplótipos no gene *IL10* com outrasvariáveis que influenciam a sobrevida livre de progressão em pacientes pediátricos comlinfoma de Hodgkin clássico48

46

clássico

**Tabela 4.4** Correlação entre os genes de interesse relacionados ao checkpoint imune e osfatores de transcrição TBX21/TBET e EOMES avaliados por RT-qPCR no grupo de pacientespediátricos diagnosticados com linfoma de Hodgkin clássico55

**Tabela 4.5** Correlação dos genes do *checkpoint* imune com os perfis de expressão gênica(inflamatório e supressor) avaliados por RT-qPCR no grupo de pacientes pediátricosdiagnosticados com linfoma de Hodgkin clássico56

**Tabela 4.6** Sobrevida livre de progressão (SLP) de acordo aos níveis de expressão de genesrelacionados ao *checkpoint* imune em pacientes pediátricos diagnosticados com linfoma deHodgkin clássico61

#### LISTA DE TABELAS (continuação)

**Tabela 4.7** Sobrevida livre de progressão (SLP) de acordo as razões dos níveis de expressão*EOMES/TBX21* em pacientes pediátricos com linfoma de Hodgkin clássico64

**Tabela 4.8** Análise multivariada de sobrevida livre de progressão (SLP) usando o modelo deregressão de Cox, considerando as variáveis clínicas e os níveis de expressão gênica no grupode pacientes pediátricos com linfoma de Hodgkin clássico66

**Tabela 4.9** Associações significativas entre as variantes genéticas no gene CTLA4 e osdiferentes subtipos celulares quantificados no do microambiente tumoral em pacientespediátricos com linfoma de Hodgkin clássico.73

**Tabela 4.10** Sobrevida livre de progressão (SLP) de acordo aos níveis de expressão dasisoformas de CTLA4 em pacientes pediátricos com linfoma de Hodgkin clássico75

**Tabela 4.11** As 10 vias mais frequentes associadas à assinatura de exaustão nos linfócitos TCD8+89

**Tabela 4.12** Genes diferencialmente expressos da potencial assinatura de exaustão imune empacientes adultos com linfoma de Hodgkin clássico segundo a presença do vírus Epstein-Barrquando comparado à hiperplasia reativa91

**Tabela 4.13** Genes associados à potencial assinatura de exaustão imune diferencialmenteexpressos em pacientes adultos com linfoma de Hodgkin clássico segundo associação com ovírus Epstein-Barr (EBV+ versus EBV-)94

#### LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Representação esquemática de algumas das relações entre as células tumorais (Hodgkin e Reed-Sternberg) e do microambiente tumoral através da expressão de moléculas mediadoras de superfície e solúveis (citocinas e quimiocinas).

Figura 1.2 Mecanismos de escape à resposta antitumoral T no microambiente tumoral dolinfoma de Hodgkin clássico.11

Figura 1.3Representação esquemática das principais moléculas coestimuladoras ecoinibitórias na regulação da resposta de células T.14

Figura 3.1 Gráfico de discriminação alélica para genotipagem de polimorfismos denucleotídeo simples (SNPs) pela metodologia TaqMan®.25

**Figura 3.2** Eletroferograma para genotipagem por sequenciamento de Sanger. 26

**Figura 3.3** Fluxograma das análises desenvolvidas na abordagem bioinformática. 33

Figura 3.4 Esquema da ferramenta de análise CIBERSORT.34

**Figura 4.1** Níveis de expressão gênica de *IL10*. 41

Figura 4.2 Macrófagos M2-like (CD68+MAF+) no microambiente tumoral de linfoma deHodgkin clássico.42

Figura 4.3 Número de células que expressam o fator de transcrição MAF segundo osgenótipos e haplótipos no promotor proximal do gene *IL10*.43

Figura 4.4 Correlação entre os níveis de RNAm *IL10* e o número de células quantificadas nomicroambiente tumoral.43

Figura 4.5 Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de progressão (SLP) em pacientespediátricos diagnosticados com linfoma de Hodgkin clássico.47

**Figura 4.6** Níveis de expressão gênica de moléculas associadas ao *checkpoint* imune e dos fatores de transcrição *TBX21/TBET* e *EOMES* no grupo total de pacientes pediátricos diagnosticados com linfoma de Hodgkin clássico. 54

Figura 4.7 Linfócitos PD1+ no microambiente tumoral de linfoma de Hodgkin clássico. Casocom células PD1+ distribuídas de maneira uniforme no linfonodo.57

xvii

#### LISTA DE FIGURAS (continuação)

Figura 4.8 Correlação entre o número de células PD1+ e o número de linfócitos quantificadosno microambiente tumoral.58

Figura 4.9 Correlação entre os níveis de RNAm e o número de células quantificadas nomicroambiente tumoral expressando a proteína correspondente.59

Figura 4.10 Gráfico de barras mostrando o peso relativo de genes avaliados por RT-qPCRcom o número de células granzima B positivas (log10 de células GRZB+).60

Figura 4.11 Gráfico scatter plot referente aos níveis de RNAm de HAVCR2/TIM3 empacientes pediátricos com linfoma de Hodgkin clássico.62

Figura 4.12 Curva de Kaplan-Meier, probabilidade de sobrevida livre de progressão no grupode pacientes pediátricos com linfoma de Hodgkin clássico.63

Figura 4.13 Curva de Kaplan-Meier, probabilidade de sobrevida livre de progressão segundoa razão da expressão gênica de EOMES/TBX21 no grupo de pacientes pediátricos comlinfoma de Hodgkin clássico.65

Figura 4.14 Curva de Kaplan-Meier, probabilidade de sobrevida livre de progressão segundoa expressão gênica das isoformas moleculares de CTLA4 no grupo de pacientes pediátricoscom linfoma de Hodgkin clássico.75

Figura 4.15 Detecção do vírus Epstein-Barr nas células Hodgkin e Reed-Sternberg (H-RS).79

**Figura 4.16** Quantificação celular relativa de 22 subpopulações imunes no microambiente tumoral no subconjunto de dados GSE13996 de pacientes com linfoma de Hodgkin clássico.

81

Figura 4.17Quantificação celular das subpopulações imunes no microambiente tumoral depacientes com linfoma de Hodgkin clássico segundo a presença do vírus Epstein-Barr.82

Figura 4.18Análise dos níveis de expressão gênica de IFNG, STAT1 e STAT6 no grupo totalde pacientes pediátricos diagnosticados com linfoma de Hodgkin clássico.83

#### LISTA DE FIGURAS (continuação)

Figura 4.19 Níveis de expressão gênica de moléculas associadas ao *checkpoint* imune e dos fatores de transcrição *TBX21/TBET* e *EOMES* segundo a presença do vírus Epstein-Barr (EBV) no grupo de pacientes pediátricos diagnosticados com linfoma de Hodgkin clássico (LHc).

Figura 4.20 Rede de interação do grupo de genes identificados na assinatura de exaustão delinfócitos T CD8 positivos.87

Figura 4.21Detalhes da rede de interação do grupo de genes do SISTEMA IMUNEidentificados na assinatura de exaustão de linfócitos T CD8 positivos.88

Figura 4.22 Interseção dos genes diferencialmente expressos em pacientes adultos comlinfoma de Hodgkin clássico (LHc) segundo o *status* de associação com o vírus Epstein-Barr(EBV) quando comparado a hiperplasias reativas/linfadenites benignas.93

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus centigrados					
μm	Micrometro					
ΔCq	Delta Cq					
λ	Comprimento de onda					
μg	Microgramo					
μL	microlitro					
AI	Amplitude interquartil					
APC	Célula apresentadora de antígeno (do inglês: antigen-presenting cell)					
BCR	Receptor de células B (do inglês, B cell receptor)					
BSA	Albumina de soro bovino					
CD	Conjunto de diferenciação (do inglês, Cluster of differentiation					
cDNA	DNA complementar					
CEMO	Centro de Transplante de Medula Óssea					
CF	Concentração final					
CG	Centro germinativo					
СМ	Linfoma de Hodgkin clássico subtipo histológico celularidade mista					
Cq	Ciclo de quantificação					
D´	Coeficiente de desvio padronizado					
DAMP	Padrão molecular associado a dano (do inglês: <i>damage-associated molecular pattern</i> )					
DEPC	Dietilpirocarbonato					
dL	Decilitro					
DL	Linfoma de Hodgkin clássico subtipo histológico depleção linfocitária					
DNA	Ácido desoxirribonucleico					
DNTPs	Desorribonucleotídeos trifosfatados					
DO	Densidade óptica					
DP	Desvio padrão					
DTT	Ditiotreitol					
EBER	Pequenos RNAs não codificantes do vírus Epstein-Barr					
EBNA	Antígeno nuclear Epstein-Barr (do inglês, Epstein-Barr nuclear antigen)					
EBV	Vírus Epstein-Barr					

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (continuação)

EN	Linfoma de Hodgkin clássico subtipo histológico esclerose nodular							
EUA	Estados Unidos de América							
FDA	Do inglês, Food and Drug Administration							
FDR	Do inglês, False discovery rate							
FFPE	Fixado em formalina e incluído em parafina (do inglês, formalin-fixed paraffin-embedded)							
Fig.	Figura							
GDI	Gene de interesse							
GDR	Gene de referência							
GEO	Gene Expression Omnibus							
GO	Do inglês, Gene Ontology							
HIV	Vírus da imunodeficiência humana							
HLA	Sistema antígeno leucocitário humano (do inglês: Human leukocyte antigen)							
HR	Hiperplasia folicular reativa							
H-RS	Células Hodgkin e Reed Sternberg							
IHQ	Imunohistoquímica							
IFNG	Interferon gamma							
IL	Interleucina							
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva							
IPS	Escore Prognóstico Internacional (do inglês, International Prognostic Score)							
ISH	Hibridização in situ							
LCMV	Vírus da coriomeningite linfocitica							
LHc	Linfoma de Hodgkin clássico							
LMP1	Proteína latente de membrana 1 (do inglês, Latent membrane protein 1)							
LMP2	Proteína latente de membrana 2A (do inglês, Latent membrane protein 2A)							
LOD	Do inglês, logarithm of the odds							
Log2	Logaritmo de base 2							
Log10	Logaritmo de base 10							
MAT	Microambiente tumoral							
MDSC	Células supressoras derivadas mieloides (do inglês: <i>Myeloid-derived</i> suppressor cells)							
mg	Miligramo							

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (continuação)

MHCComplexo principal de histocompatibilidade (MHC; do inglês, ma histocompatibility complex)								
MIQE	Informação mínima para publicação em experimentos de quantificação er PCR em tempo real							
mL	Mililitro							
mM	Milimolar							
mm <sup>2</sup>	Milímetro quadrado							
MNI	Mononucleose infecciosa							
NK	Linfócitos exterminadores naturais (do inglês, Natural Killer)							
NTC	Controle sem amostra (do inglês, no template control)							
OMS	Organização Mundial da Saúde							
OR	Razão de chance (do inglês: odds ratio)							
Р	Valor de P							
pb	Pares de base							
PBS	Tampão fosfato salino							
PCA	Análises de componente principal (do inglês, principal component analysis)							
PCR	Reação em cadeia da polimerase							
pLHc	Pacientes pediátricos com linfoma de Hodgkin clássico							
PLSR	Análises de regressão de mínimos quadrados parciais (do inglês, Partial Least Squares Regression)							
pré-Amp	Pré amplificação							
qPCR	PCR quantitativa							
RMA	Do inglês: robust multi-array average							
ROC	Do inglês, Receiver Operating Characteristic Curve							
r.p.m.	Rotações por minuto							
$\mathbb{R}^2$	Regressão da curva							
RL	Linfoma de Hodgkin clássico subtipo histológico rico em linfócitos							
RNA	Ácido ribonucleico							
RNAm	RNA mensageiro							
RT	Transcrição reversa ou retrotranscrição							
RT-qPCR PCR quantitativa a partir da transcrição reversa								
SFB	Soro fetal bovino							
TBS	Tampão salino tris							

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (continuação)

SG	Sobrevida global					
SLP	Sobrevida livre de progressão					
SNP	Polimorfismos de nucleotídeo simples (SNPs, do inglês: Single Nucleotide Polymorphism)					
SPSS	Do inglês, Statistical Package for Social Sciences					
STRING	RING Do inglês, Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins					
Th1	Linfócito T auxiliares 1 (do inglês, T helper cell)					
Th2	Linfócito T auxiliares 2 (do inglês, T helper cell)					
TMA	Do inglês, tissue microarray					
TNF	Fator de necrose tumoral					
Treg	Células T reguladoras					
U/µL	Unidade por microlitro					
UTR	Região não traduzida (do inglês: untranslated region)					

#### 1 INTRODUÇAO

# 1.1 Modulação do microambiente tumoral no linfoma de Hodgkin clássico: do hospedeiro ao vírus Epstein-Barr

O linfoma de Hodgkin clássico (LHc) é uma doença complexa do ponto de vista histológico e epidemiológico. Exibe características únicas entre todos os tipos de linfomas, já que se caracteriza por apresentar de 0,5-1% de células tumorais conhecidas como Hodgkin (H) e Reed-Sternberg (RS), imersas em um infiltrado inflamatório não neoplásico denominado de microambiente tumoral (MAT) (ALDINUCCI; CELEGATO; CASAGRANDE, 2016; MATHAS; HARTMANN; KÜPPERS, 2016).

O LHc, como é o caso de todo os linfomas, se desenvolvem em microambientes teciduais especializados (os órgãos linfoides secundários ou terciários) que contêm células do estroma e do tecido linfoide normal (células dendríticas, células foliculares dendríticas, células T do centro germinativo e macrófagos, entre outras) com as quais a célula tumoral interage (CARBONE *et al.*, 2014). Existem evidencias de que a célula tumoral é capaz de influenciar a composição do MAT pela modificação das condições de diferenciação no linfonodo, além de atrair células imunes que alteram a composição normal do microambiente linfonodal, que em conjunto dão suporte à célula tumoral (GLOGHINI; BONGARZONE, 2015; SHAIN; DALTON; TAO, 2015). Dependendo do predomínio celular observado na composição do MAT, dois perfis podem ser identificados: i) perfil supressor, formado por um incremento de células T reguladoras, linfócitos T auxiliares (Th, do inglês: *T helper lymphocytes*) tipo 2 e macrófagos com polarização supressora (M2) ou, ii) um perfil inflamatório, constituído por um maior número de linfócitos T citotóxicos, Th1 e macrófagos polarizados para um perfil inflamatório (M1) (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010).

Classicamente, considera-se que o perfil supressor é típico dos estádios mais avançados no câncer, e que um eventual perfil inflamatório é composto de células funcionalmente inertes na resposta antitumoral (KERKAR; RESTIFO, 2012; GAJEWSKI; SCHREIBER; FU, 2013; MANTOVANI *et al.*, 2013; QUAIL; JOYCE, 2013). Estudos em algumas patologias como o carcinoma colorretal e o câncer de mama mostram que a infiltração tumoral por linfócitos citotóxicos está associada a uma melhor resposta terapêutica (BINDEA *et al.*, 2011; TOSOLINI *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2015), o que serve como prova de principio de que, mesmo após os mecanismos de imunoedição tumoral tenham potencialmente operado nas vias que levaram ao câncer (DUNN *et al.*, 2002; DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004; BUI; SCHREIBER, 2007), no momento em que o tumor aparece clinicamente, ainda há potencial imune para coadjuvar a resposta terapêutica. A implementação de ferramentas de predição e prognóstico clínico baseado na quantificação e localização de células imunes no MAT no carcinoma colorretal mostra, em termos de conceito, que a resposta imune tumoral não é uniforme para todos os pacientes, abrindo a porta para a pesquisa de fatores que modulam este microambiente (GALON *et al.*, 2006).

O LHc é um modelo muito interessante de interação célula tumoral-MAT, uma vez que estudos que se iniciaram na década passada mostraram que a presença de alto número células citotóxicas, como determinado por técnicas de imunohistoquímica quantitativa, está associada a um prognóstico desfavorável (ÁLVARO *et al.*, 2005; KELLEY *et al.*, 2007), inclusive em grupos pediátricos, como descrito pela nossa equipe (Barros *et al.*, 2012). A natureza das células citotóxicas associadas ao mau prognóstico da doença não foi ainda elucidado.

Em geral, o MAT do LHc observado nos pacientes adultos apresenta características supressoras, mas a presença do vírus Epstein-Barr (EBV) nas células tumorais parece influenciar esta polarização para um predomínio celular inflamatório (MATSUKI; YOUNES, 2015; CARBONE *et al.*, 2017). Entretanto, a associação entre alto número de células citotóxicas e prognóstico clínico desfavorável é independente da presença viral.

Uma outra característica do MAT no LHc é a ativação constitutiva do eixo PDL1-PD1 (CHEMNITZ *et al.*, 2007; YAMAMOTO *et al.*, 2008; MUENST *et al.*, 2009), sendo PDL1 expresso pelas células tumorais via diversos mecanismos genéticos e não genéticos, inclusive pela estimulação da oncoproteína do EBV, proteína latente de membrana 1 (LMP1) (GREEN *et al.*, 2010; GREEN *et al.*, 2012). No ano de 2016 foram aprovadas duas drogas anti-PD1 como tratamento de segunda linha da doença (GLIMELIUS; DIEPSTRA, 2016; KASAMON *et al.*, 2017), devido à alta taxa de remissões observadas após o tratamento. Entretanto, o entendimento dos processos de exaustão imune nesta complexa doença são ainda fragmentários e incompletos.

Em especial o grupo de crianças e adolescentes merece uma maior atenção devido aos escassos estudos desenvolvidos neste subgrupo etário, às diferenças descritas ao nível epidemiológico, celular e estado funcional do sistema imune e ao incremento das complicações secundárias após o tratamento, quando comparado com os adultos (KELLY, 2012; KELLY, 2015; NAGPAL *et al.*, 2016).

Especial atenção é necessária também para a associação com o EBV. Este é um agente etiopatogênico da doença, encontrado em ~50% dos casos em nossa região (BARROS *et al.*, 2010b). A presença viral nas células H-RS possui associação prognóstica dependendo da idade dos pacientes, apresentando um papel desfavorável nos adultos, enquanto que nas crianças, a associação pode ser favorável (KEEGAN, 2005; DIEPSTRA *et al.*, 2009). Estes resultados junto com o perfil inflamatório observado no MAT permitem levantar a hipótese de que a presença do EBV é capaz de gerar uma resposta celular antiviral/antitumoral distinta, a nível do MAT. Os fatores que modulam a funcionalidade dessa resposta, incluindo o fenômeno de exaustão imune, não são conhecidos. Estudos que vislumbrem entender estes possíveis mecanismos se fazem necessários não somente para o melhor entendimento da patogênese desta complexa doença, senão também para traçar estratégias diferentes, sobre tudo em regiões onde o EBV é mais frequentemente associado à doença, como nas regiões com menos desenvolvimento socioeconômico.

#### 1.2 Linfoma de Hodgkin clássico

O LHc é uma doença complexa, cuja origem celular e natureza neoplásica somente pôde ser elucidada na década de 1990 (KUPPERS; YAHALOM; JOSTING, 2006). As células H-RS apresentam marcadores aberrantes de superfície e isto, junto com a escassez destas células na massa tumoral, representou um desafio na determinação da origem celular e da clonalidade desta neoplasia. As células H-RS, apesar de serem clonalmente derivadas de um linfócito B pós-apoptótico do centro germinativo (CG) (KÜPPERS et al., 1994), caracterizam-se por uma falta de expressão de marcadores pan-B e por exibir outros marcadores, como os membros da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNF) (CD30, CD40, BCMA e RANK), CD15 (molécula de adesão a carboidratos) e IRF4 (fator 4 de regulação do interferon) (HERTEL et al., 2002; SCHWERING et al., 2003; MATHAS; HARTMANN; KÜPPERS, 2016). Em aproximadamente 25% dos casos, a perda do fenótipo de célula B se deve a mutações e deleções no gene da cadeia pesada da imunoglobulina e nos outros 75%, a alterações genéticas ou epigenéticas da transcrição do complexo de receptor de células B (BCR). Estas alterações levariam a célula para a apoptose, caso não fossem recuperadas por mudanças genéticas, induzindo a ativação da via NF- $\kappa$ B, ou pela presença do EBV (MARAFIOTI et al., 2000; KÜPPERS, 2009).

Por outro lado, o LHc tem uma organização celular única entre os diferentes tipos de câncer. As células tumorais representam uma mínima proporção da composição tumoral (0,5-1%) rodeadas de um intenso infiltrado celular inflamatório constituído por linfócitos T, linfócitos B, eosinófilos, mastócitos, macrófagos, entre outros tipos de células imunes. Observam-se ainda células estromais, como fibroblastos, e matriz extracelular. Em conjunto, este complexo de células e material extracelular é conhecido como MAT (ALDINUCCI et al., 2010; STEIDL; CONNORS; GASCOYNE, 2011; ALDINUCCI; CELEGATO; CASAGRANDE, 2016). As células H-RS recrutam e/ou modulam o MAT, e interagem com este de maneira complexa, permitindo assim a sua proliferação e o seu escape da resposta antitumoral (BURGER et al., 2009; GLOGHINI; BONGARZONE, 2015; MATHAS; HARTMANN; KÜPPERS, 2016) (Fig. 1.1).



Figura 1.1: Representação esquemática de algumas das relações entre as células tumorais (Hodgkin e Reed-Sternberg) e do microambiente tumoral através da expressão de moléculas mediadoras de superfície e solúveis (citocinas e quimiocinas). Adaptado de KÜPPERS; ENGERT; HANSMANN (2012).

Do ponto de vista histológico, o LHc é classificado em 4 subtipos baseados na composição celular e na quantidade de esclerose observada no linfonodo: esclerose nodular (EN), celularidade mista (CM), depleção linfocitária (DL) e rico em linfócitos (RL) (SWERDLOW SH, 2008). Os fatores conhecidos que potencialmente influem na histopatogênese da doença são: 1) a idade e *status* imune do indivíduo quando da linfomagênese, e 2) a primo-infecção ou reativação do EBV (POPPEMA, 2005; BAUMFORTH *et al.*, 2008; BARROS; HASSAN; NIEDOBITEK, 2011).

Na grande maioria dos casos, o LHc surge nos linfonodos, onde a composição do MAT pode ser influenciada pela natureza dos processos imunes relacionados a doenças inflamatórias e/ou infecciosas (como por exemplo, a resposta imune à infecção primária pelo EBV) (LUZURIAGA; SULLIVAN, 2010), a qual vai sendo modulada durante o processo linfomagênico, tanto pela produção de citocinas e quimiocinas por parte das células H-RS que atraem as células inflamatórias e contribuem para a manutenção tumoral, como por uma resposta imune putativa contra antígenos tumorais ou antígenos virais, cuja eficiência não está comprovada (STEIDL; CONNORS; GASCOYNE, 2011).

Estudos em diferentes tipos de câncer mostraram que o predomínio de um perfil supressor favorece o desenvolvimento e a progressão da doença (GAJEWSKI; MENG; HARLIN, 2006; WHITESIDE, 2008), e o LHc não é alheio a esta característica (MATSUKI; YOUNES, 2015). Um predomínio de células CD4+, linfócitos T reguladores (Treg) e Th2, é considerado característico do LHc (MARSHALL, 2004; ÁLVARO *et al.*, 2005). Porém, outros estudos começam a desafiar esta noção (GREAVES *et al.*, 2013), inclusive os da nossa equipe com LHc pediátrico (BARROS *et al.*, 2012).

Células citotóxicas também são encontradas no MAT do LHc, entretanto estudos iniciais descreveram o *status* funcional destas células como anérgico, devido à supressão mediada por interleucina (IL) 10 e TGFB (fator de crescimento tumoral beta), ou pela expressão de moléculas relacionadas à exaustão imune (KADIN *et al.*, 1990; HERBST *et al.*, 1996). Estudos mais recentes mostram um estado heterogêneo da função celular, com a manutenção de potencialidade citotóxica em ao menos uma fração de células (GREAVES *et al.*, 2013).

# 1.3 O vírus Epstein-Barr nas doenças benignas e malignas e sua associação com o linfoma de Hodgkin clássico

O EBV é um gamaherpesvírus linfotrópico, conhecido por infectar mais de 95% da população adulta saudável de maneira assintomática (CRAWFORD, 2001). A transmissão viral ocorre pela saliva; o EBV penetra no organismo via epitélio da orofaringe e infecta os linfócitos B *naïve*, hospedando-se neles através de um processo conhecido como "latência" e persistindo nos linfócitos B de memória (RICKINSON *et al.*, 2014). A primeira infecção (primo-infecção) viral varia de acordo com a idade do indivíduo nas diferentes localidades geográficas. Nos países em desenvolvimento, o primeiro contato com o EBV ocorre na infância, já nos países desenvolvidos, ocorre na adolescência ou primeira juventude (WINSLER *et al.*, 1999; CRAWFORD, 2001; FIGUEIRA-SILVA; PEREIRA, 2004; MBULAITEYE *et al.*, 2006).

A primo-infecção pode ocorrer de maneira assintomática ou pode produzir uma doença benigna denominada mononucleose infecciosa (MNI), em até 50% dos casos em que a primo-infecção ocorre em adolescentes ou em adultos jovens (FAULKNER; KRAJEWSKI; CRAWFORD, 2000). A incidência de MNI varia segundo a idade do indivíduo, *status* social e país de residência. É mais comum nos países desenvolvidos e em pacientes adultos por conta do contato tardio com o EBV, enquanto nos países em desenvolvimento é observada numa baixa frequência desta doença (BALFOUR; DUNMIRE; HOGQUIST, 2015).

A pesar da extensão da sua infecção na população humana, o EBV está associado à patogênese de diferentes tipos de neoplasias linfoides, como o linfoma de Burkitt, doença linfoproliferativa pós-transplante, linfomas T/NK e uma fração dos LHc. Há também uma associação descrita com neoplasias epiteliais como o carcinoma de nasofaringe indiferenciado e 10% do câncer gástrico (CADER *et al.*, 2010; KLEIN; KLEIN; KASHUBA, 2010; GRYWALSKA; ROLINSKI, 2015).

O EBV é considerado um agente etiopatogênico do LHc, baseado em três achados importantes: 1) a determinação da clonalidade viral nas células H-RS EBV+ (CRAWFORD, 2001); 2) aumento do risco (de até 5 vezes) do LHc EBV+ nos primeiros 5 anos pósdesenvolvimento da MNI (HJALGRIM *et al.*, 2000; HJALGRIM *et al.*, 2007; MASSINI; SIEMER; HOHAUS, 2009; HJALGRIM *et al.*, 2010); 3) demonstração experimental do seu papel no resgate da apoptose das células H-RS. Em relação a isto, dois estudos mostraram que o vírus, por meio da utilização do programa de latência II sobrevive dentro das células tumorais e pelo efeito da expressão das proteínas latentes de membrana 1 (LMP1) e 2 (LMP2) (moléculas miméticas do receptor CD40 e do BCR, respectivamente), fornece os sinais necessários para evitar que a célula B com defeito do BCR seja enviada a apoptose, participando assim do processo linfomagênico (BECHTEL *et al.*, 2005; MANCAO *et al.*, 2005).

No LHc, o EBV parece ter uma interação de dupla via com o MAT. Por um lado, as interações da célula tumoral com os linfócitos CD4+, num contexto de estimulação por IL21, são essenciais para a manutenção da latência II viral (KIS *et al.*, 2010; KIS *et al.*, 2011). Por outro lado, o EBV parece modular a resposta imune, favorecendo mecanismos de escape tumoral.

#### 1.4 Perfis de citocinas e quimiocinas no linfoma de Hodgkin clássico

As citocinas e quimiocinas produzidas pelas células tumorais e do sistema imune são fundamentais no escape tumoral, devido à modulação da resposta imune tanto de maneira autócrina como parácrina, na promoção do crescimento e progressão das células tumorais, ao mesmo tempo em que atraem um novo conjunto de células, facilitando o escape da célula neoplásica (BENBARUCH, 2006). O LHc caracteriza-se por apresentar alta expressão de citocinas e quimiocinas associadas a um perfil supressor como IL4, IL10, IL13, CCL17/TARC e CCL22 (SKINNIDER; MAK, 2002). Especificamente, as células H-RS secretam IL5, IL13, CCL5/RANTES, CCL17/TARC, CCL22, CCL28, e CCL20, associadas diretamente à formação do MAT (KREHER *et al.*, 2015; ALDINUCCI; CELEGATO; CASAGRANDE, 2016). De fato a produção de CCL5/RANTES, CCL17/TARC e CCL22 é considerada essencial no recrutamento do perfil celular supressor (Th2, linfócitos Treg e macrófagos tipo M2 (KÜPPERS, 2009).

Em relação à presença do EBV, estudos que avaliem os perfis celulares imunes e de citocinas e quimiocinas associados ao *status* do vírus são escassos, principalmente devido a pouca prevalência viral nas coortes de pacientes com LHc estudadas nos países desenvolvidos (GLASER *et al.*, 1997; ARMSTRONG *et al.*, 1998). A presença do EBV influencia o balanço entre células Th1/Th2, o que tem reflexo no perfil de interleucinas e quimiocinas, como um aumento de CXCL9 e CXCL10 nos pacientes EBV+ *vs.* EBV- (TEICHMANN *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2014). Por outro lado, as células H-RS EBV+ podem ter um aumento da expressão de IL10 (HERBST *et al.*, 1996; BECK *et al.*, 2001; MORALES *et al.*, 2014). Além disso, uma alta expressão de *CCL20* tem sido associada à presença viral nas células tumorais, que

pode ser induzida pelo antígeno viral nuclear EBNA1 via IL21, contribuindo no recrutamento de mais células reguladoras (BAUMFORTH *et al.*, 2008; LAMPRECHT *et al.*, 2008).

Análises de expressão gênica de todo o linfonodo em pacientes com LHc descreveram um perfil inflamatório (*IFNG, CXCL9, CXCL10, CXCL11* e *STAT1*) associado à presença do EBV (CHETAILLE *et al.*, 2009). Já nas células tumorais microdissecadas foi mostrado que as células EBV+ apresentavam um aumento de *CCL8, CXCL9* e *CX3CL1* e uma diminuição de *TGFBR3, CX3CL1, MAF,* assim como de genes associados ao remodelamento tecidual (*MMP1, COL1A1* e *COL1A2*) (STEIDL *et al.*, 2012; TIACCI *et al.*, 2012).

A IL10 é uma interleucina imunossupressora associada à diferenciação das células imunes como as Th2, Treg e linfócitos B (SARAIVA; O'GARRA, 2010; NG *et al.*, 2013), assim como à proliferação de linfócitos B (BURDIN; ROUSSET; BANCHEREAU, 1997) e à polarização de subgrupos de macrófagos supressores, tanto em condições infecciosas como no câncer, com um papel importante na evasão da resposta imune antitumoral (COUPER; BLOUNT; RILEY, 2008; BISWAS; ALLAVENA; MANTOVANI, 2013).

Devido as suas funções na biologia das células B e sua capacidade de induzir supressão no MAT, a IL10 tem sido avaliada na patogenia dos linfomas B (KHATRI; CALIGIURI, 1998; MOORE *et al.*, 2001). Em pacientes adultos diagnosticados com LHc, altos níveis séricos de IL10 têm sido correlacionados com um prognóstico desfavorável da doença (BLAY *et al.*, 1993; BOHLEN *et al.*, 2000; VIVIANI *et al.*, 2000; VASSILAKOPOULOS *et al.*, 2001; RAUTERT *et al.*, 2008; HOHAUS *et al.*, 2009). Por outro lado, polimorfismos encontrados no promotor do gene *IL10* também foram associados com a resposta terapêutica em pacientes adultos com LHc (HOHAUS *et al.*, 2007; SCHOOF *et al.*, 2013).

Uma associação entre os polimorfismos encontrados no promotor do gene *IL10* nas posições -1082(A/G), -819(C/T), e -592(C/A) pares de bases do sitio de inicio da transcrição foram associados com os níveis de expressão da IL10 (TURNER *et al.*, 1997; ESKDALE *et al.*, 1998). De fato, diferenças interindividuais na produção de *IL10* têm um componente hereditário de aproximadamente 75% (REUSS *et al.*, 2002). Entretanto, não existe um consenso no modelo de controle genético da expressão de *IL10*, devido provavelmente aos diferentes tipos de células e estímulos de ativação utilizados nos modelos *in vitro* para avalia-lo (KURREEMAN, 2004; MÖRMANN *et al.*, 2004; LARSSON; RYMO; BERGLUNDH, 2010). Atualmente, faltam estudos que visem entender se há uma associação entre os

polimorfismos de *IL10* e os níveis de expressão gênica no linfonodo acometido pelo LHc, assim como se estes níveis poderiam influenciar a composição celular do MAT.

#### 1.5 Mecanismos e papel do EBV na evasão imune no linfoma de Hodgkin clássico

As células H-RS, como todas as células tumorais, desenvolvem uma série de recursos que permitem sua sobrevivência, escape e proliferação. Dentre esses mecanismos, encontram-se a ativação de diferentes vias celulares, mudanças na maquinaria de apresentação de antígenos e modulação do MAT (VARDHANA; YOUNES, 2016).

A ativação constitutiva, por alterações genéticas ou indução viral, das vias NF-κB e JAK-STAT é um dos principais, senão o principal fator intrínseco de sobrevivência das células H-RS (WENIGER; KÜPPERS, 2016). Os receptores de TNF assim como receptores de tirosina kinase são importantes na regulação destas vias. Tanto a sinalização via CD30 como a mimetização do receptor CD40 através da proteína viral LMP1 resulta na ativação destas vias (STEIDL; CONNORS; GASCOYNE, 2011; KÜPPERS; ENGERT; HANSMANN, 2012). Por outro lado, a ativação constitutiva da via NF-κB é responsável em parte pelo perfil de citocinas e quimiocinas descrito na seção anterior (HINZ *et al.*, 2002; KREHER *et al.*, 2015; DE OLIVEIRA *et al.*, 2016).

As células H-RS apresentam alterações na expressão das moléculas HLA de classe I e II causada por mutações ou alterações epigenéticas nos genes da B2M e CIITA, sendo mais frequentes nos casos EBV- (DIEPSTRA *et al.*, 2005; DIEPSTRA *et al.*, 2007; STEIDL *et al.*, 2011; JOHNSON *et al.*, 2015; REICHEL *et al.*, 2015). Mesmo que a célula neoplásica apresente alterações na expressão das moléculas HLA, o aparelho de apresentação de antígenos encontra-se funcional na maioria dos casos (OUDEJANS *et al.*, 1996; MURRAY *et al.*, 1998).

De fato, a falha das células T em eliminar as células tumorais EBV+ parece não ser devida a um defeito no processamento de antígenos, senão a defeitos funcionais dos linfócitos T infiltrantes específicos para o EBV (DOLCETTI, 2015). Adicionalmente foi mostrado que células tumorais EBV+ expressam EBI3 (proteína viral homologa a IL12B), sugerindo um mecanismo de manipulação antagônico do sistema imune inibindo a diferenciação de células Th1 (NIEDOBITEK *et al.*, 2002).

Adicionalmente, estudos que avaliaram polimorfismos de HLA nos pacientes com LHc, mostraram que a presença de HLA-A\*01 é um fator de risco e HLA-A\*02 é um fator protetor no desenvolvimento do LHc EBV+, sugerindo diferenças na "manipulação" imune da primo-infecção pelo EBV (NIENS *et al.*, 2007; HJALGRIM *et al.*, 2010; HUANG *et al.*, 2012). Por outro lado, as células tumorais parecem expressar as moléculas de HLA-G e HLA-E, sendo outra maneira possível de escape da resposta imune (DIEPSTRA *et al.*, 2008; KREN *et al.*, 2012).

Um dos mecanismos de escape do EBV que garante o estabelecimento da latência viral no hospedeiro saudável é a sua capacidade de permanecer oculto para as células do sistema imune, após uma primeira resposta citotóxica antiviral (MÜNZ, 2015). Células T citotóxicas específicas contra o EBV são geradas no processo da primo-infecção e são encontradas em quantidades constantes no hospedeiro, garantindo um estado de vigilância antiviral responsável pela baixa patogenicidade geral do EBV na população humana (CALLAN, 2003; HISLOP *et al.*, 2007; ABBOTT *et al.*, 2013).

A expressão de proteínas virais de membrana como a LMP1 é capaz de induzir um perfil supressor, induzindo um aumento de interleucinas como a IL6, IL8 e IL10, capazes manipular a resposta antiviral (DOLCETTI *et al.*, 2013). Adicionalmente, a proteína EBNA1 interfere na apresentação de antígenos via HLA de classe I para as células citotóxicas, através das repetições seriadas de glicina-alanina no domínio proteico que dificulta o processamento mediado pelo proteassoma (LEVITSKAYA *et al.*, 1997; TELLAM *et al.*, 2008; APCHER *et al.*, 2009).

Outro mecanismo de escape ao sistema imune pelo EBV foi descrito recentemente através da análise dos exossomas provenientes de linhagens celulares e de pacientes com diferentes tipos de doenças associadas ao vírus, em que foi determinado que as microvesículas são capazes de transportar a proteína viral LMP1 solúvel (FLANAGAN, 2003; VERWEIJ *et al.*, 2011; MECKES *et al.*, 2013; HURWITZ *et al.*, 2017).

As células tumorais, através da expressão de moléculas e secreção de proteínas solúveis atraem um infiltrado supressor que limita a proliferação e produção de moléculas inflamatórias dos linfócitos T CD8+ presentes no MAT, contribuindo assim ao escape da célula H-RS à resposta imune (MARSHALL, 2004). Foi descrito que a inibição das células Th1 presentes no MAT pode-se dever a um incremento da expressão das moléculas TGFB e PD1 (CHEMNITZ *et al.*, 2007).

O fenômeno celular de exaustão é considerado outro mecanismo supressor, que pode ser mediado por interações celulares via receptores inibitórios como PD1, CTLA4, BTLA, TIM3, LAG3, entre outros, ou pelo efeito de mediadores solúveis produzidos por células supressoras intratumorais (ARMAND, 2015; FUERTES MARRACO *et al.*, 2015; MCKINNEY; SMITH, 2016; HUDE *et al.*, 2017). Estes mecanismos serão abordados na seção seguinte. Algumas das interações celulares e seus mediadores que levam ao escape imune das células H-RS se encontram esquematizados na Fig. 1.2.



**Figura 1.2:** Mecanismos de escape à resposta antitumoral T no microambiente tumoral do linfoma de Hodgkin clássico. A: Células Hodgkin e Reed-Sternberg (H-RS) e do estroma secretam citocinas, quimiocinas e outros fatores imunomoduladores solúveis como IL10, CCL17/TARC, galectina 1 e *indoleamine 2,3-dioxygenase* (IDO), capazes de recrutar linfócitos Th2 (GATA3+) e reguladores (FOXP3+), assim como de favorecer esta diferenciação. B: Células H-RS evadem o reconhecimento das células do sistema imune (CD8+ e CD4+) através da alteração da expressão de moléculas do sistema antígeno leucocitário humano (HLA) de classe 1 e 2. Também, expressam o ligante de PD1 (receptor inibitório imune) encontrado nas células T ativadas. Por outro lado, as células H-RS enviam sinalizações de crescimento via CD40, através da ligação com CD40L expresso nos linfócitos T presentes no microambiente tumoral, que conduz a ativação da via NF-κB, contribuindo com a proliferação da célula tumoral. Adaptado de VARDHANA; YOUNES (2016).

#### 1.6 Moléculas do *checkpoint* imune no microambiente tumoral do LHc

Em resposta à presença de antígenos, por exemplo frente a uma infecção aguda, as células T antígeno-específicas proliferam rapidamente, controlando e eventualmente eliminando a fonte do antígeno; o que é seguido de uma fase de contração da resposta imune, em que a maioria das células sofre apoptose. Este mecanismo de contração da resposta tem como consequência uma diminuição da injúria tecidual que ocorreria no caso de uma resposta imune citotóxica exacerbada (WENINGER; MANJUNATH; VON ANDRIAN, 2002; ZHANG; BEVAN, 2011). Uma proporção de células permanece como células T de memória, conferindo imunidade protetora à longo prazo. Esta população tem capacidade de manutenção

mesmo na ausência do estímulo antigênico (JAMESON; MASOPUST, 2009; ARENS; SCHOENBERGER, 2010; KAECH; CUI, 2012). No entanto, na persistência do estímulo antigênico, como ocorre em infecções crônicas e no câncer, as células T são estimuladas constantemente, o que pode ter como consequência um estado celular de exaustão das células efetoras (linfócitos T citotóxicos CD8+ e CD4+) (PAUKEN; WHERRY, 2015a; MCKINNEY; SMITH, 2016).

O estado celular de exaustão é caracterizado pela perda progressiva da funcionalidade efetora, diminuição de IL2, parada proliferativa e por último por defeitos na produção de IFNG e quimiocinas inflamatórias (WHERRY *et al.*, 2003; DOERING *et al.*, 2012). Diferentes situações podem resultar no estado celular exausto como: i) estimulação constante do receptor das células T por antígenos, ii) altos níveis de citocinas inflamatórias como IFNG e de supressoras como IL10 e TGFB, e iii) atividade das células supressoras, como por exemplo, os linfócitos Treg (WHERRY; KURACHI, 2015).

As células que apresentam o fenótipo de exaustão são caracterizadas pela superexpressão de receptores inibitórios associados ao *checkpoint* imune como PD1, CTLA4, TIM3, LAG3, entre outros (WHERRY *et al.*, 2003). Na Tabela 1.1 e na Fig. 1.3 são mostradas as principais moléculas inibitórias e seus respectivos ligantes, associados ao *checkpoint* imune. Estes receptores não são exclusivos da exaustão imune, uma vez que em condições fisiológicas são expressos por diferentes subpopulações de linfócitos T CD8 e atuam no controle da autorreatividade celular (APPAY *et al.*, 2008; FUERTES MARRACO *et al.*, 2015; WHERRY; KURACHI, 2015; ZAMARIN; POSTOW, 2015).

Adicionalmente, estudos recentes têm descrito que as células efetoras "exaustas" não somente distinguem-se pela expressão de uma ou várias moléculas inibitórias, senão por um estado funcional de diferenciação (DOERING *et al.*, 2012), um perfil metabólico específico (BENGSCH *et al.*, 2016) e um programa de expressão gênica, que tem como atores importantes os fatores de transcrição TBET, EOMES e o próprio receptor PD1 (PAUKEN; WHERRY, 2015b; SEN *et al.*, 2016).

12

Receptor	Célula imune	Ligante	Célula imune	Efeito da interação	Via de sinalização
PD1	T CD4, CD8, B, NK, dendríticas, monócitos	PDL1 PDL2	APC, T, NK, epiteliais	Inibe a ativação e proliferação das células efetoras	SHP1, PI3K/AKT SHP2, RAS, LCK/ZAP70/PI3K
CTLA4	T CD4 e CD8	CD80 CD86	APC e T	Inibe ativação e função efetora	SHP2, LCK/ZAP70/PI3K PP2A/AKT
LAG3	T, B, NK, dendríticas	MHC-II	APC	Inibe ativação e função efetora (IL2, IL4, IFNG, TNFA)	Não determinado
TIM3 (HAVCR2)	Th1, CD8, NK, dendríticas, monócitos/macrófagos	Galectina9 CEACAM1 HMGB1	Molécula solúvel Célula CD8, NK, neutrófilo DAMP liberado pela célula dendrítica	Inibe a síntese de IFNG	PI3K BAT3/LCK
BTLA	B, T, e mieloides	HVEM (TNFRSF14)	APC	Limita a proliferação celular e produção de IFNG	SHP1, PI3K/AKT SHP2, LCK/ZAP70/PI3K
CD160	NK e CD8	HVEM (TNFRSF14)	APC	Diminui a proliferação de células T e produção de citocinas	Não determinada
KIR	NK	MHC-I	Todas as células nucleadas	Inibem a ativação das células NK	SHP1, SHP2
TIGIT (VSIG9, VSTM3)	T, NK, NKT	CD155 (PVR, necl-5) CD112 (PVRL2, nectin-2) CD113 (PVRL3/nectin 3)	Dendríticas e mieloides	Inibe a função citotóxica das células NK e a produção de citocinas (IL2 e TNFA) nos linfócitos CD8	NF-kB, PI3K e MAPK
CD244 (SLAMF4, 2B4)	T, NK, monócitos, basófilos	CD48	APC	Inibe a função das células T e citotóxica das NK	Não determinada
В7-Н3	T, NK, APC (dendríticas e macrófagos)	?	-	Inibe a proliferação de céls. CD4 e CD8 e a produção de IL2 e IFNG	NFAT, NF-κB, AP1,
B7-H4	APC	?	-	Diminui a ativação e proliferação de células T	Não determinada
VISTA (PD1-H)	T, dendríticas, macrófagos, monócitos, neutrófilos	?	-	Diminui a produção de citocinas como IL10, TNFA e IFNG	Não determinada
CD96 (tactile)	Células T, NK, mieloides	CD155	Dendríticas e mieloides	Inibe a sintese de IFNG	PI3K/AKT, SHP2

Tabela 1.1: Moléculas inibitórias e ligantes associadas ao checkpoint imune

?: desconhecido. Nesta tabela é descrita a expressão fisiológica de receptores e ligantes nas células imunes. É sabido que estas moléculas podem ser expressas pelas células tumorais ou por células infectadas por patógenos. APC: célula apresentadora de antígeno (do inglês: *antigen-presenting cell*); DAMP: padrão molecular associado a dano (do inglês: *damage-associated molecular pattern*); Treg: células T reguladoras; IL10: interleucina 10; TNFA: fator de necrose tumoral; IFNG: interferon gamma. Tabela construída a partir de PARDOLL, 2012; CHEN; FLIES, 2013; MAHONEY; RENNERT; FREEMAN, 2015; DAS; ZHU; KUCHROO, 2017; e CATAKOVIC *et al.*, 2017.


Figura 1.3: Representação esquemática das principais moléculas coestimuladoras e coinibitórias na regulação da resposta de células T. A interação entre o receptor de células T *naïve* (TCR) com a molécula de MHC (complexo de histocompatibilidade principal) de classe II (sinal 1) nas células apresentadoras de antígenos inicia a cascata de sinalização. Mas para que ocorra uma ativação completa da célula T, esta precisa de um sinal coestimulador através de CD28-CD80/CD86 (sinal 2). Interações coestimuladoras adicionais são representadas no fundo verde. No fundo vermelho são representadas as interações coinibitórias entre as células, cruciais na regulação da ativação e tolerância das células T que atuam no controle da autorreatividade celular. Muitos dos ligandos ligam-se a múltiplos receptores. Em geral, pares de receptores coestimuladores ou coinibidores que possam se ligar ao mesmo ligando, apresentam cinéticas diferentes, como é o caso de CD28 e CTLA4, em que este último apresenta cerca de 20 vezes mais avidez do que CD28, emitindo o sinal inibitório. O sinal inibitório é regulado positivamente após a ativação das células T. Adaptado de MAHONEY; RENNERT; FREEMAN (2015).

O bloqueio dos receptores do *checkpoint* imune por anticorpos específicos permite que a célula exausta recupere, ao menos em parte, suas funções efetoras (característica que as diferencia de uma célula em senescência), o que tem sido um elemento central no desenvolvimento de diferentes estratégias imunoterapêuticas (PARDOLL, 2012; DRAKE, 2015; TOPALIAN; DRAKE; PARDOLL, 2015; LONBERG; KORMAN, 2017). Em modelos animais mediante a expressão de TBET, EOMES e PD1 nas células T CD8 exaustas, foram descritas dois subtipos de células exaustas com base na capacidade de recuperação do seu estado funcional: i) as que expressam Tbet<sup>hi</sup>PD1<sup>int</sup>, que retém a sua capacidade proliferativa e produção de citocinas efetoras com limitada citotoxicidade, nas quais a função efetora pode ser recuperada pelo uso de imunoterapias e; ii) as Eomes<sup>hi</sup>PD1<sup>hi</sup>, que apresentam uma menor capacidade tanto de proliferar como de produzir citocinas, no entanto mostram maior citotoxicidade, e são caracterizadas por encontrar-se na fase de diferenciação terminal e não apresentar grande capacidade da recuperação efetora (PALEY et al., 2012; PAUKEN; WHERRY, 2015b). A maioria do conhecimento deste estado celular é proveniente de modelos animais através da estimulação crônica com o vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV, do inglês: lymphocytic choriomeningitis virus) clone 13, já nos humanos este conhecimento é parcial e limitado, apesar da utilização na prática clínica das estratégias de bloqueio de receptores inibitórios com bastante sucesso.

O LHc caracteriza-se por apresentar diferentes mecanismos supressores, dentre eles a expressão dos receptores inibitórios nas células do MAT. A presença de linfócitos T CD4+ expressando CTLA4 e LAG3, próximos às células H-RS, numa configuração de rosetas tem sido descrita. Estes linfócitos foram associados principalmente ao subtipo histológico EN (VANDENBORRE *et al.*, 1998; GANDHI, 2006).

A expressão do ligante de PD1, PD1L nas células H-RS (GOODMAN; PATEL; KURZROCK, 2016), permite estabelecer interação supressora com as células T intratumorais PD1+ (CHEMNITZ *et al.*, 2007; YAMAMOTO *et al.*, 2008; MUENST *et al.*, 2009). Um incremento de PD1L nas células tumorais foi descrito em ~70% dos casos com LHc, devido à amplificação da região cromossômica 9p24.1 (localização dos genes *PD1L* e *PD2L*) e à ativação da via JAK/STAT (GREEN *et al.*, 2010). Já no grupo de pacientes que não apresentam alterações no número de cópias ou que se encontram associados ao EBV foi descrito que a superexpressão é causada pelo fator de transcrição AP1 (expresso constitutivamente nas células H-RS) ou pela LMP1, respectivamente (GREEN *et al.*, 2012).

Por outro lado, um predomínio de células T CD4+ com polarização Th1 (CXCR3, CCR5, TNFA, IFNG e IL2) superior às células Th2 (CCR3, CCR4) foram descritas no MAT, em que células expressando PD1 encontraram-se numa baixa proporção (GREAVES *et al.,* 2013).

Na presença do EBV, um incremento de linfócitos T CD4+ LAG3+ foi observado no MAT, sugerindo que o vírus é capaz de recrutar células Treg tipo 1 que colaboram no escape da resposta antiviral mediada pelos linfócitos T citotóxicos específicos (GANDHI, 2006; MORALES *et al.*, 2014).

No sangue periférico de pacientes com LHc, a presença de linfócitos T CD3+CTLA4+ com diminuição da capacidade proliferativa e de produção de IL2 e IFNG, parece estar associada a falhas da resposta imune (KOSMACZEWSKA *et al.*, 2002).

### 1.7 O linfoma de Hodgkin clássico em pacientes pediátricos: a procura de novos biomarcadores

O LHc representa entre 10-30% das neoplasias pediátricas, ocupando a terceira posição a nível mundial (FARRELL; JARRETT, 2011). No Brasil, representa cerca de 50% do total dos casos de linfomas em crianças e adolescentes (FERREIRA *et al.*, 2012; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2015). Apesar disso, os estudos são escassos neste subgrupo de pacientes.

Os pacientes pediátricos mostram uma alta taxa de cura (~80%) nos países desenvolvidos (HARKER-MURRAY *et al.*, 2014). Entretanto, o intenso esquema de quimioterapias encontra-se associado a complicações secundárias como infertilidade, novas neoplasia e toxicidade cardiopulmonar (CASTELLINO *et al.*, 2010). Para os pacientes que recaem, as terapia de segunda linha estão associadas a respostas desanimadoras (MAUZ-KÖRHOLZ *et al.*, 2015).

Por essas razões, a procura de biomarcadores que possam ter valor na predição da resposta clínico-terapêutica ao diagnóstico, possibilitaria a estratificação dos pacientes quanto a intensidade das terapias; o desenvolvimento de alvos farmacológicos e o melhor entendimento da fisiopatologia do LHc (BARROS *et al.*, 2010a; NAGPAL *et al.*, 2016).

Diferentes biomarcadores tem sido descritos no grupo de crianças e adolescentes com LHc, mas nenhum com significância suficiente para ser levado à prática clínica. Entre alguns deles associados a um pior prognóstico encontram-se: a expressão de CD30 nas células H-RS (GUPTA *et al.*, 2013), assim como uma alta taxa de proliferação nestas células, identificada mediante a marcação KI67 (DINAND *et al.*, 2008) e; no nível sérico foram descritos altos níveis de CD30 solúvel (sCD30) (NADALI *et al.*, 1998), ICAM1 (CD54) (TACYILDIZ *et al.*, 1999; ABDELRAZIK *et al.*, 2008), CD44 (TAÇYILDIZ *et al.*, 2001; ELLI *et al.*, 2012), IL2R (PUI *et al.*, 1993), IL10 e IL12 (BIEN *et al.*, 2009); e em relação à composição celular do MAT o número de células NK (ORTAÇ *et al.*, 2002), T citotóxicas (BARROS *et al.*, 2012) e macrófagos intratumorais (BARROS; HASSAN; NIEDOBITEK, 2012; BARROS *et al.*, 2015). Por outro lado, a presença do EBV nas células H-RS foi relacionado ao bom prognóstico (KEEGAN, 2005).

Recentemente, a agência regulatória FDA (do inglês: *Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos de América (EUA) aprovou duas drogas anti-PD1 (nivolumabe e pembrolizumabe) para o tratamento de pacientes com LHc, tanto em adultos como em crianças, como segunda linha terapêutica, independente da expressão de PD1 nas células infiltrantes (GLIMELIUS; DIEPSTRA, 2016; KASAMON *et al.*, 2017). A utilização de nivolumabe em combinação com outras terapias encontra-se em processo de estudos clínicos em pacientes pediátricos (NCT02927769) (FORAN *et al.*, 2016; NAGPAL *et al.*, 2016; DIEFENBACH *et al.*, 2017). Não existem ainda marcadores relacionados à possibilidade de estratificar paciente de acordo com o grau ou natureza do processo de exaustão imune nestes pacientes.

#### 1.8 Justificativa e antecedentes do estudo

Os estudos do nosso grupo em crianças e adolescentes diagnosticados com LHc permitiram caracterizar os padrões clínicos e epidemiológicos deste grupo de pacientes na nossa região geográfica (CHABAY *et al.*, 2008; BARROS *et al.*, 2010b; BARROS; HASSAN; NIEDOBITEK, 2011). Um dos objetivos dos nossos estudos tem sido entender o interjogo de fatores imunes e ambientais (EBV) na patogênese do LHc, assim como a procura por biomarcadores que permitam estratificar os pacientes ao diagnóstico.

Estudos prévios por nossa equipe mostraram que a composição celular do MAT está formada majoritariamente por células supressoras, porém a presença do EBV parece impactar na composição celular, sendo associado com um perfil inflamatório (linfócitos CD3+, CD8+, TIA+, TBET+, CD68+pSTAT1+) (BARROS *et al.*, 2012; BARROS *et al.*, 2015). Por outro lado, as diferentes subpopulações que integram o MAT tem sido associadas à resposta terapêutica dos pacientes, contra intuitivamente um menor tempo de sobrevida foi relacionado

a um maior número de células citotóxicas GRZB+, tanto no nosso grupo de pacientes como em outros grupos (ÁLVARO *et al.*, 2005; KELLEY *et al.*, 2007), sugerindo que as células citotóxicas poderiam apresentar alterações na sua função efetora.

A descrição de moléculas inibitórias tanto nas células H-RS como nas subpopulações do MAT, a recente aprovação de imunoterápicos anti-PD1 nos pacientes em recaída do LHc juntamente com os resultados satisfatórios observados nesta nova modalidade terapêutica, reforçam a hipótese da existência de um estado hipofuncional (exaustão) em células efetoras localizadas no MAT, contribuindo com a sobrevivência das células neoplásicas. Caracterizar e entender estas células hipofuncionantes é essencial não apenas para o melhor entendimento da patogênese do LHc, como também para o desenho de novas estratégias terapêuticas.

Estas observações geraram as hipóteses, que nortearam os resultados aqui apresentados: 1) os perfis imunes observados no MAT dos pacientes com LHc podem ser modulados por variantes genéticas próprias de cada indivíduo; 2) a expressão de marcadores de citotoxicidade associada a prognóstico desfavorável poderia estar identificando uma população com alteração da funcionalidade e; 3) o EBV modula de uma maneira diferenciada a presença de um estado de exaustão imune.

#### **2 OBJETIVOS**

#### 2.1 Objetivo geral

Avaliar perfis de expressão gênica e de fatores genéticos relacionados à resposta imune local, determinada pela composição celular do microambiente tumoral, em um grupo de crianças e adolescentes com linfoma de Hodgkin clássico, segundo o *status* do vírus Epstein-Barr.

#### 2.2 Objetivos específicos

- Estudar uma possível associação entre polimorfismos dos genes *IL10* e *CTLA4*, composição celular do microambiente tumoral e resposta terapêutica.
- Caracterizar a expressão de genes relacionados aos receptores inibitórios do *checkpoint* imune e sua associação com a resposta clínico-terapêutica.
- Analisar a composição celular do microambiente tumoral e um perfil de expressão gênica relacionado à resposta imune no linfoma de Hodgkin clássico segundo a presença do vírus Epstein-Barr.
- Detectar uma potencial assinatura gênica de exaustão imune no LHc e sua provável associação ao vírus Epstein-Barr.

#### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1** Pacientes e amostras

O grupo de estudo foi composto por 99 pacientes pediátricos com LHc com idade de 3 a 18 anos (mediana de 14 anos), diagnosticados e tratados entre 1999 e 2006 no Instituto Nacional de Câncer (INCA). Em todos os casos havia quantidade de tecido tumoral em parafina para realização dos estudos propostos. Todos os pacientes foram negativos para o vírus da imunodeficiência humana (HIV).

Todos os casos foram revisados por dois patologistas, Mário Barros e Gerard Niedobitek (BARROS *et al.*, 2010; BARROS; HASSAN; NIEDOBITEK, 2011) e caracterizados desde o ponto de vista histológico e da composição do microambiente tumoral (MAT). Os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) foram seguidos para estabelecer a subclassificação histológica em esclerose nodular (EN), celularidade mista (CM), depleção linfocitária (DL) e rico em linfócitos (RL) (SWERDLOW SH, 2008).

As características clínicas, demográficas, histológicas e virológicas do grupo de pacientes estudados foram previamente publicadas (BARROS *et al.*, 2010; BARROS; HASSAN; NIEDOBITEK, 2011) e são apresentadas na Tabela 3.1.

Em relação ao tratamento poliquimioterápico dos pacientes com LHc, 50% dos casos (47/93) foram tratados seguindo o protocolo HD-90 do Grupo Cooperativo Alemão para Tratamento do Linfoma de Hodgkin na Infância (SCHELLONG *et al.*, 1999), 45% (42/93) dos pacientes com o protocolo ABVD (adriamicina, bleomicina, vimblastina e dacarbazina (FRYER *et al.*, 1990) e 5% (4/93) dos casos com outro esquema quimioterápico baseado na administração de antracíclicos.

Com referência ao grupo de casos diagnosticados com hiperplasia folicular reativa (HR, n=20), incluídos nas análises de associação da expressão gênica com polimorfismos do promotor da *IL10*, apresentaram uma mediana de idade no momento do diagnóstico de 36 anos (faixa de idade 4-83). Destes casos, 55,0% (11/20) foram do sexo feminino e 45,0% (9/20) do sexo masculino (Anexo IV, Tabela S1). Todos os casos foram negativos para o HIV.

Características clínicas e	Casos analisados	Valor percentual (%)
epidemiológicas		-
Idade (Anos)		
$\leq 14$ anos	56/99	56,6
>14 anos	43/99	43,4
Sexo		
Masculino	63/99	63,6
Feminino	36/99	36,4
Massa no mediastino		
Presente	62/95	65,3
Ausente	33/95	34,7
Estadiamento Ann Arbor		
I - II	58/94	61,7
III - IV	36/94	38,3
Grupo de Risco		
Favorável	49/94	52,1
Não favorável	45/94	47,9
Sítio extranodal		
Presença	11/94	11,7
Ausência	83/94	88,3
Sintomas B		
Presente	51/94	54,3
Ausente	43/94	45,7
Leucopenia		
Presença (<5.000 células/mm <sup>3</sup> )	11/95	11,6
Ausência (>5.000 células/mm <sup>3</sup> )	84/95	88,4
Diagnóstico histológico		
Esclerose Nodular	69/99	69,7
Celularidade Mista	23/99	23,2
Rico em linfócitos	2/99	2,0
Depleção linfocítica	1/99	1,0
Inclassificável	4/99	4,1
Grau de esclerose nodular		
Ι	38/69	55,1
II	31/69	44,9
Associação com EBV		
Sim	42/95	44,2
Não	53/95	55,8
Subtipo histológico pelo EBV		
Esclerose Nodular EBV+	26/67	38.8
Esclerose Nodular EBV-	41/67	61.2
Celularidade Mista EBV+	15/22	68.2
Celularidade Mista EBV-	7/22	31,8

**Tabela 3.1:** Características das crianças e adolescentes com linfoma de Hodgkin clássico incluídas no presente estudo.

EBV: vírus Epstein-Barr.

As amostras utilizadas para os estudos experimentais foram linfonodos fixados e incluídos em parafina (FFPE). Células mononucleares provenientes de doadores sadios (10 indivíduos) e linhagens celulares de LHc (KM-H2 e L428) foram utilizados como controles de qualidade das reações em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR).

Este estudo obedeceu às diretrizes de pesquisa envolvendo seres humanos do Conselho Nacional de Saúde, em sua resolução nº 466/2012 publicada no dia 13 de junho de 2013, que visam assegurar os direitos e deveres que dizem respeito à comunidade científica, aos sujeitos da pesquisa e ao Estado. Medidas que proporcionam confidencialidade e privacidade dos pacientes, foram adotadas, assim como sigilo e a segurança dos dados obtidos. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCA (Protocolo 37/05 e 56999916.5.0000.5274) e adendos (Anexo I e II).

#### 3.2 Dados clínicos e epidemiológicos

Os dados clínicos e demográficos dos pacientes foram obtidos através dos prontuários médicos. As informações coletadas incluíram local de procedência do paciente, histórico clínico e exames complementares (estudos radiológicos e análises laboratoriais) ao diagnóstico, durante o tratamento, ao final do tratamento e durante os 5 primeiros anos póstérmino do tratamento. Todos os casos tiveram período de seguimento pós-término do tratamento 5 anos.

Os critérios de *Ann Arbor* (CARBONE *et al.*, 1971) foram seguidos para classificar os pacientes em diferentes estádios. Pacientes com estadiamento I e IIA foram considerados como o grupo com doença favorável, e estádios IIB, IIIB e IV como doença desfavorável (VASSILAKOPOULOS *et al.*, 2005).

### 3.3 Métodos de extração de ácidos nucleicos a partir de amostras fixadas e incluídas em parafina

Condições livres de DNAse ou RNAse foram mantidas no local de extração, assim como nos instrumentos utilizados. Na extração do RNA, tanto as pipetas como as ponteiras foram separadas unicamente para estes procedimentos. As soluções de trabalho também foram preparadas e mantidas em condições livres de RNAse.

O material incluído nos blocos de parafina foi seccionado com um micrótomo da Leica Biosystems, obtendo-se em média 5 secções de 3µm de espessura. Os cortes foram submetidos ao processo de desparafinização com três incubações em xilol, seguida por três incubações em etanol 100% (Merck).

Após a desparafinização, o DNA foi extraído utilizando o kit comercial QIAamp® DNA FFPE Tissue (Qiagen®, Valencia, CA) mediante colunas de extração, seguindo as

22

indicações do fabricante. O DNA foi ressuspendido em 50  $\mu$ L de tampão de eluição e armazenado a -20°C.

A extração de RNA foi realizada utilizando o método de purificação de RNA Master Pure<sup>TM</sup> (Epicentre®, Madison, WI) como sugerido pelo fabricante com modificações na etapa de digestão (CHEN; BYRNE JR; LOSSOS, 2007; VERA-LOZADA *et al.*, 2014). Resumidamente, após a desparafinização foram adicionados ao *pellet* 480 µL de solução de lise celular com 60 µL de proteinase K (Invitrogen) a 60 mg/mL e incubado a 65°C por 16-20 horas. A precipitação de proteínas foi realizada com os reagentes do kit e a precipitação do RNA com isopropanol 100% (Merck). Um tratamento com *DNAse I* foi aplicado. Novamente uma etapa de lise celular, precipitação de proteínas e do RNA foi realizada, finalizando com duas etapas de lavagens com etanol (Merck) 75% diluído em água-DEPC. O RNA foi ressuspendido em 12 µL de água-DEPC e armazenado a -70°C. Os procedimentos se encontram descritos no Anexo VIII (VERA-LOZADA *et al.*, 2014).

#### 3.4 Avaliação da qualidade e quantidade dos ácidos nucleicos extraídos

As amostras extraídas foram quantificadas e sua pureza avaliada em um espectrofotômetro Nanodrop<sup>®</sup> (Wilmington, Delaware USA) nos comprimentos de onda ( $\lambda$ ) de 260, 280 e 230 nm que quantificam ácidos nucleicos, proteínas e contaminação com álcool, fenol e EDTA, respectivamente. A quantificação dos ácidos nucleicos foi realizada considerando as densidades ópticas (DO), em que uma unidade de DO corresponde a aproximadamente 50 µg/mL de DNA de dupla fita e a 40 µg/mL de RNA a 260 nm (SAMBROOK J, FRITSCHI EF, MANIATIS T, 1989). Características ótimas de pureza para uma amostra foram  $\lambda$ 260/280 entre 1,8-2,0; e  $\lambda$ 260/230 entre 2,0-2,2.

A integridade do RNA foi avaliado pela conservação relativa das frações do RNA ribossômico (28S, 18S e 5S) através de eletroforese em gel de agarose 1,2% preparado com tampão fosfato (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,01M) em condições livres de RNases. O gel foi corado com corante Gelred<sup>TM</sup> (Biotium, Inc; Hayward, CA) e a avaliação das amostras foi realizada sob luz ultravioleta.

#### 3.5 Genotipagem

Para evitar contaminação nas reações de PCR, a manipulação das amostras e as reações de PCR foram realizadas em ambientes separados: i) extração e manipulação dos

ácidos nucleicos; ii) misturas dos reagentes para as reações e; iii) incorporação dos ácidos nucleicos à PCR.

#### 3.5.1 Genotipagem por discriminação alélica mediante a metodologia TaqMan®

Polimorfismos de nucleotídeo simples (SNPs, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) foram avaliados usando a metodologia TaqMan® (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA), baseada no uso de um par de iniciadores que flanqueiam a região que contém o SNP e duas sondas alelo específicas com fluoróforos diferentes (5' 6-FAM<sup>TM</sup>-3'MGB e 5' VIC®-3'MGB). Ambos os alelos podem ser detectados em uma única reação, baseada na hibridização diferencial das sondas.

Quatro SNPs foram genotipados, dois localizados no promotor proximal do gene *IL10* [rs1800896 (-1082 A>G) e rs1800872 (-592 C>A)], um na região codificante do gene *CTLA4* e outro na região não traduzida 3' (UTR, do inglês: *untranslated region*) do mesmo gene [rs231775 (+49 A>G) e rs3087243 (CT60 G>A), respectivamente] (Tabela 3.2). Cada reação de genotipagem foi composta por 1X de TaqMan® PCR Master Mix Universal (Applied Biosystems), 1X do ensaio TaqMan® para genotipagem de SNPs (Applied Biosystems) e 9 ng de DNA total em volume final de 15  $\mu$ L. O perfil térmico da reação consistiu de um ciclo a 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, seguido por 50 ciclos a 92°C por 15 segundos e 60°C por 90 segundos. O passo final para a discriminação alélica foi realizado por 1 minuto a 60°C para a determinação e interpretação da fluorescência pelo *software* SDS (Applied biosystems). As reações de genotipagem foram realizadas usando o aparelho ViiA<sup>TM</sup> 7 (Applied Biosystems).

Posição no gene	ID SNP	ID Life Technologies	Alelos
-1082 <i>IL10</i>	rs1800896	C_1747360_10	A>G
-592 <i>IL10</i>	rs1800872	C_1747363_10	C>A
+49 <i>CTLA4</i>	rs231775	C_2415786_20	A>G
CT60CTLA4	rs3087243	C_3296043_10	G>A

**Tabela 3.2:** Iniciadores/sondas utilizados na avaliação de polimorfismos avaliados mediante a metodologia TaqMan<sup>®</sup>

O resultado da discriminação alélica foi mostrada em um gráfico cartesiano, que exibe os resultados da genotipagem do "alelo 1" no eixo X e os resultados do "alelo 2" no eixo Y. De acordo com as indicações do fabricante, o alelo 1 é identificado pela intensidade do fluoróforo VIC®, sendo o alelo 2 pela intensidade do fluoróforo 6-FAM<sup>TM</sup>. As relações entre as intensidades de fluorescência de cada alelo permite a determinação dos genótipos de cada amostra, como homozigotos para o alelo 1, homozigotos para o alelo 2 ou heterozigotos, quando houve sinais de fluorescência para ambos os fluoróforos. Genótipos heterozigotos são situados na diagonal do gráfico (Fig. 3.1).



**Figura 3.1 Gráfico de discriminação alélica para genotipagem de polimorfismos de nucleotídeo simples (SNPs) pela metodologia TaqMan®.** Em vermelho, amostras homozigotas para o alelo 1 (fluoróforo VIC<sup>®</sup>); em azul, amostras homozigotas para o alelo 2 (fluoróforo 6-FAM<sup>TM</sup>); em verde, amostras heterozigotas (sinal de fluorescência de VIC<sup>®</sup> e 6-FAM<sup>TM</sup>); "X", amostra indeterminada; quadrado negro: NTC (controle negativo com ausência de DNA).

Controles com genótipos conhecidos para os SNPs avaliados (2 amostras para cada genótipo homozigoto e 2 amostras para o genótipo heterozigoto), assim como 2 controles negativos com ausência de DNA (NTC, do inglês *no template control*) foram colocados em cada placa de corrida. Aproximadamente 10% das amostras foram selecionadas randomicamente para serem genotipadas no experimento posterior, sendo avaliadas neste estudo em duas corridas de discriminação alélica 35% das amostras.

#### 3.5.2 Confirmação da genotipagem pelo sequenciamento de Sanger

O polimorfismo rs231775 (+49 A>G) na região codificante no gene *CTLA4* foi validado através do sequenciamento de Sanger de fragmentos de DNA da região contendo o SNP. A reação de PCR foi realizada num volume final de 25  $\mu$ L, contendo 1X de tampão de PCR [60 mM Tris-SO<sub>4</sub> (pH 8,9) e 18 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>], 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de desorribonucleotídeos trifosfatado (dNTPs), 0,4 pmol/ $\mu$ L de iniciadores (F: TTCCTGAAGACCTGAACACC e R: TTGCAGAAGACAGGGATGAA), 0,5 U de *Taq* 

*High Fidelity* e 100 ng de DNA. As reações foram incubadas a 95°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos a 93°C por 45 segundos, 62°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos com uma extensão final a 72°C por 7 minutos. O produto da reação (141 pb) foi purificados mediante incubação com 0,4 U de Exonuclease I (Thermo Scientific<sup>TM</sup>) e 0,2 U de FastAP (Thermo Scientific<sup>TM</sup>), a 37°C por 20 minutos, seguido de 80°C a 15 minutos para inativação.

O sequenciamento direto foi realizado com o reagente *Bigdye terminator cycle v3.1* (Applied Biosystems) em um instrumento ABI 3130xl (Applied Biosystems).

As sequências foram analisadas utilizando o software BioEdit (HALL, 1999) (Fig. 3.2).



**Figura 3.2: Eletroferograma para genotipagem por sequenciamento de Sanger.** A: Sequência representativa de um indivíduo homozigoto para o alelo A; B: Sequência representativa de um indivíduo homozigoto para o alelo G; C: Sequência representativa de um indivíduo heterozigoto (AG). A posição de interesse na sequência se encontra identificada pelo retângulo vermelho. Os eletroferogramas foram gerados utilizando o *software* BioEdit.

#### 3.5.3 Construção dos haplótipos

Na análise dos polimorfismos no promotor do gene de *IL10* foi considerado que os SNPs (-819C/T e -592C/A) apresentam um forte desequilíbrio de ligação (ESKDALE; KUBE; GALLAGHER, 1996). Partindo do conhecimento de que a presença de uma citosina na posição -819 está associada à presença de outra citosina na posição -592 e de que na presença de uma timina na posição -819 está acoplada a uma adenina na -592, foi possível a construção de haplótipos (combinações de alelos de diferentes SNPs de um mesmo cromossomo) sem a necessidade da avaliação na posição -819, como descrito previamente

pelo nosso grupo (MINNICELLI *et al.*, 2012). Como resultado, três haplótipos foram construídos: GCC, ACC e ATA.

Haplótipos para os SNPs avaliados no gene *CTLA4* foram construídos utilizando o *software* PHASE (STEPHENS; SMITH; DONNELLY, 2001; STEPHENS; SCHEET, 2005), cuja imputação dos dados foi realizada segundo as indicações do programa.

#### 3.6 Quantificação da expressão gênica

Para os ensaios de expressão gênica, a reação de retrotranscrição foi realizada utilizando o kit *High-Capacity cDNA Archive* (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA) seguindo as indicações do fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir de 0,5  $\mu$ g de RNA total em um volume final de 20  $\mu$ L. A reação foi incubada a 25°C por 10 minutos, seguidos de 120 minutos a 37°C em um termociclador Veriti® (Applied Biosystems) e armazenada a -70°C.

As reações de quantificação por PCR em tempo real após transcrição reversa (RTqPCR) foram realizadas utilizando duas abordagens: atividade 5'nuclease com sondas hidrolíticas (TaqMan®) e uso de corantes intercalantes.

Para a metodologia TaqMan<sup>®</sup>, uma pré-amplificação foi realizada utilizando o reagente TaqMan<sup>®</sup> PreAmp Master Mix (Applied Biosystems) em reações com um volume final de 10  $\mu$ L, de acordo com as recomendações do fabricante. O perfil térmico consistiu de 10 minutos a 95°C, seguido de 14 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos em um termociclador Veriti<sup>®</sup> (Applied Biosystems). O produto foi diluído na proporção de 1:20 em água livre de nucleasses e armazenado a -70°C.

Cada reação de RT-qPCR na metodologia TaqMan®, apresentou um volume final de 15  $\mu$ L e estava composta por 1X TaqMan® PCR Master Mix Universal (Applied Biosystems), 1X do ensaio TaqMan® de expressão gênica específica (Applied Biosystems) e 3  $\mu$ L de cDNA pré-amplificado diluído 1:20. O perfil térmico utilizado foi 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido de 50 ciclos de 15 segundos a 95°C e 60°C por 1 minuto. As reações foram realizadas em um aparelho ViiA<sup>TM</sup> 7 (Applied Biosystems).

Na metodologia com corantes intercalantes, cada reação foi realizada em volumes finais de 15  $\mu$ L, constituída por 1X de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 400-900 nM de iniciadores, 0,5X de *enhancer* [2,7 M de betaina (Sigma B-0300), 6,7 mM de DTT (Invitrogen) e 6,7% de DMSO (Sigma D-8418)] e 3  $\mu$ L de cDNA diluído 1:5. O perfil térmico para estas reações foi 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido de 50 ciclos de 15 segundos a 95°C e 60°C por 1 minuto, finalizando com a determinação da temperatura de *melting* através do seguinte perfil térmico: 95°C por 15 segundos, seguido por uma diminuição da temperatura usando uma rampa 1,6 °C/segundo até 60°C por 1 minuto e um acréscimo da temperatura de 0,05°C/segundo até chegar a 95°C por 15 segundos.

Controles de qualidade foram incluídos nas placas das reações e na quantificação por RT-qPCR: i) dois controles da reação com ausência de cDNA (NTC) para cada gene avaliado, os quais não deviam mostrar amplificação; ii) as reações foram realizadas em duplicata, aceitando como valor máximo diferencial de desvio padrão (DP) < +0,15 ciclos; iii) os genes de interesse (GDI) e genes de referência (GDR) foram colocados na mesma corrida; iv) no caso da curva de dissociação, um único valor de temperatura de *melting* foi aceito por reação para o monitoramento de dímeros de primers; v) a variabilidade interplaca foi avaliada a partir de controles da reação utilizando cDNAs provenientes de RNA de alta qualidade de linhagens celulares (KM-H2 e L428) e de um pool de células mononucleares provenientes de doadores sadios; vi) valores fixos tanto para a linha de base como para o limiar de determinação (*"threshold*") foram estabelecidos no aparelho para todas as corridas (3-15 ciclos e limiar de 0,11; respectivamente).

O método de avaliação da expressão gênica a partir de RNA extraído de material FFPE foi publicado em <u>Vera-Lozada G</u>, Scholl V, Barros MH, Sisti D, Guescini M, Stocchi V, Stefanoff CG, Hassan R. *Analysis of biological and technical variability in gene expression assays from formalin-fixed paraffin-embedded classical Hodgkin lymphomas*. Exp Mol Pathol. 2014 Dec;97(3):433-9 (Anexo VIII).

Os GDIs selecionados para este estudo são mostrados na Tabela 3.3 e 3.4. Como GDRs foram utilizados "glucuronidase, beta" (*GUSB*) e "hydroxymethylbilane synthase" (*HMBS*).

Símbolo do Gene	Nome do Gene*	ID do ensaio#	Tamanho do amplicon (pb)	Perfil
CXCL10	"Chemokine (C-X-C	Hs01124251_g1	135	Inflamatório
	Motif) ligand 10"			
IFNG	"interferon, gamma"	Hs00989291_m1	73	Inflamatório
STAT1	"signal transducer and	Hs00234829_m1	79	Inflamatório
	activator of transcription			
	1, 91kDa"			
IL10	"interleukin 10"	Hs00961622_m1	74	Supressor
STAT6	"signal transducer and activator of transcription 6. interleukin-4 induced"	Hs00598625_m1	96	Supressor
GUSB	"glucuronidase, beta"	Hs99999908_m1	81	GDR
HMBS	"hydroxymethylbilane	Hs00609297_m1	64	GDR
	synthase"			

Tabela 3.3: Ensaios de PCR em tempo real quantitativo mediante a metodologia TaqMan®Símbolo doNome do Gene\*ID do ensaio#Tamanho doPerfil

\* De acordo com HUGO(WHITE *et al.*, 1997).# ID do ensaio, segundo inventário da Applied Biosystems; GDR: Gene de referência.

Símbolo do Gene	Nome do Gene*	Sequência	Ampl (pb)	Eficiência (%)	Temperatura de <i>melting</i> (°C)	CF de iniciadores
BTLA	"B and T Lymphocyte	F: GGGTCTTCTTCTTAATCCCATATC	69	98,3	76,94	600
	Associated"	R: GCTGTACATCACATGATTCTTTCC				
flCTLA4	"Cytotoxic T-	F:	79	101,52	78,80	600
	Lymphocyte Associated	ACCCAGATTTATGTAATTGATCCAGA				
	Protein 4"	R: CCGAACTAACTGCTGCAAGG				
sCTLA4	Isoforma solúvel de	F:	77	95,89	80,1	900
	"Cytotoxic T-	ATGTAATTGCTAAAGAAAAGAAGCC				
	Lymphocyte Associated	R: TCACATTCTGGCTCTGTTGG				
	Protein 4"					
HAVCR2/TIM3	"Hepatitis A Virus	F: CCTGAAGTTGGTCATCAAACC	91	98,7	81,10	600
	Cellular Receptor 2"	R: GGTGGTAAGCATCCTTGGAA				
LAG3#	"Lymphocyte	F: TGGCTTCAACGTCTCCATCA	59	100,71	82,15	600
	Activating 3"	R: CCCACCCTGGAACCTGCT				
PDCD1	"Programmed Cell	F: GCACGAGGGACAATAGGAG	88	103,41	85,29	600
	Death 1"	R: CCCCATAGTCCACAGAGAACA				
CD274/PDL1	"CD274 Molecule"	F: GCATTCCAGAAAGATGAGGA	101	100,26	78,61	600
		R: CCACATATAGGTCCTTGGGAA				
TBX21/TBET	"T-Box 21"	F: CCAACAATGTGACCCAGATG	86	100,58	79,20	400
		R: CTCTCCGTCGTTCACCTCA				
EOMES	"Eomesodermin"	F: GGCAAAGCCGACAATAACAT	101	96,96	76,55	400
		R: TTCCCGAATGAAATCTCCTG				
GUSB	"glucuronidase, beta"	F: CCTGTGACCTTTGTGAGCAA	70	99,67	80,0	600
		R: AACAGATCACATCCACATACGG				
HMBS	"hydroxymethylbilane	F: CCATGTCTGGTAACGGCAAT	63	98,27	81,30	600
	synthase"	R: TCACTCTCATCTTTGGGCTGT				

**Tabela 3.4:** Ensaios de PCR em tempo real quantitativo mediante corante intercalante

\* De acordo com HUGO (WHITE *et al.*, 1997). #Sequência de iniciadores publicada em MORALES *et al.* (2014), o resto, desenhada para este estudo. pb: pares de bases; CF: concentração final.

Para cada reação foi obtido o valor de Cq, em que os resultados para cada GDI foram expressos em valores relativos de quantificação (log2 de  $2^{\Delta Cq}$ ), com exceção no estudo das isoformas de *CTLA4* nos quais os valores foram expressos em  $2^{\Delta Cq}$ . Nesta parte do estudo, o valor de Cq<sub>GDR</sub> foi obtido a partir da média geométrica de quantificação dos genes *GUSB* e *HMBS* como recomendado.

### 3.6.1 Informação mínima necessária pra publicação de experimentos em PCR quantitativa (MIQE)

Como recomendado por BUSTIN *et al.* (2009), a lista das informações mínimas para publicação de experimentos em qPCR (MIQE) referente as 4 etapas: qualidade das amostras, condições da reação de retrotranscrição, detalhe sobre os ensaios de PCR e métodos estatísticos utilizados na avaliação dos dados, encontra-se no Anexo III.

### 3.7 Técnica de imunohistoquímica e quantificação das células por Análise Microscópica Computacional Assistida

Lâminas de TMA (do inglês, *Tissue microarray*) com cores de 1 mm<sup>2</sup> contendo tecido tumoral representativo foram utilizadas para realizar as imunomarcações simples e dupla para determinar e caracterizar as células H-RS e células infiltrantes do MAT. A caracterização dos casos e quantificação do número de células no MAT foi realizada por análise microscópica computacional e publicada em BARROS *et al.* (2012), BARROS; HASSAN; NIEDOBITEK (2012) e BARROS *et al.* (2015). A lista de anticorpos utilizados, clones, diluições e marcações esperadas encontram-se descrita no Anexo IV, Tabela S2.

Brevemente como descrito em BARROS *et al.* (2012), nas marcações com um único anticorpo, as lâminas foram desparafinadas e hidratadas utilizando xilol e etanol em concentrações decrescentes, respectivamente. A recuperação antigênica foi realizada na panela de pressão ou em um forno de micro-ondas com tampões específicos (Anexo IV, Tabela S2). O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio, enquanto que o bloqueio inespecífico foi conseguido através de uma solução caseira de leite em pó desnatado. O anticorpo primário foi incubado durante 1 hora com lavagem em tampão fosfato salino (PBS). O anticorpo secundário foi adicionado por 30 minutos, seguido de três lavagens com PBS. Posteriormente, o conjugado streptavidina peroxidase foi adicionado e incubado. Após lavagem, a revelação foi realizada com DAB (Dakocytomation, Califórnia, Inc.), seguida da coloração do tecido com hematoxilina de Harris. Finalmente, as lâminas foram desidratadas e montadas em meio não aquoso.

No caso das duplas marcações foram realizadas como descrito em BARROS *et al.* (2013). Após a revelação com o DAB, as lâminas foram lavadas e incubado o segundo anticorpo primário, seguindo os passos descritos anteriormente. A revelação foi realizada com o kit AP Polymer System (Zytomed Systems, Berlin, Germany), utilizando o kit *Blue Alkaline Phosphatase substrate* (Vector Laboratories, Burlingame, USA) como cromógeno. Posteriormente, etapas similares foram seguidas após a revelação, como descritas anteriormente.

O número de células imunomarcadas/mm<sup>2</sup> foi quantificado por um patologista mediante o programa HISTO (Biomas, Elangen, Alemanha), através de fotografias com aumento de 200x, usando como média o resultado proveniente de duas cores. Casos que não apresentavam marcação em nenhuma das cores foram excluídas.

#### 3.8 Hibridização in situ para EBERs (EBER-ISH)

A presença do EBV nas células H-RS foi avaliada mediante a técnica de hibridização *in situ* (ISH) através de sondas biotiniladas para os RNAs virais não codificantes (EBERs) como descrito por HASSAN *et al.* (2006) em condições livres de RNAses. Os resultados da caracterização foram publicados em BARROS *et al.* (2010) e BARROS *et al.* (2012).

Resumidamente, as lâminas foram desparafinizadas e hidratadas através de banhos de xilol e etanol. A digestão do tecido foi realizada com proteinase K em câmara úmida. O material foi desidratado por banhos em etanol. A ribosonda biotinilada contra EBER (Novocastra Laboratories Ltda., Newcastle, UK) foi adicionada e incubada a 65°C (15 minutos) e 37°C (2 horas), seguido de três banhos em tampão tri salino (TBS) com 0,1% Triton X-100. O bloqueio inespecífico foi realizado por uma solução bloqueante (TBS 0,1%; Triton X-100; BSA 3%). O anticorpo secundário anti-FITC conjugado com fosfatase alcalina (Novocastra) foi acrescentado, seguido de duas lavagens em TBS e uma em solução de fosfatase alcalina. A revelação do sinal foi realizada com uma solução cromógena em solução de fosfatase alcalina, BCIP/NBT e Levamisole (Novocastra). No dia seguinte, os cortes foram lavados, contra-corados com hematoxilina de Harris e montadas em meio aquoso.

Um caso com diagnóstico de linfoma de Burkitt EBV+ foi utilizado como controle positivo, sendo considerado como resultado positivo a presença de marcações (cor marrom escura) no núcleo das células H-RS. Todos os casos associados ao EBV tiveram a presença de EBERs na maioria das células H-RS.

# 3.9 Abordagem bioinformática a partir de banco de dados públicos de expressão gênica

Análises de bioinformática foram realizadas utilizando dados depositados no banco público GEO (do inglês: *Gene Expression Omnibus*). Foram usados três conjuntos de dados de microarranjos provenientes da plataforma Affymetrix® (Santa Clara, Califórnia, USA) (Tabela 3.5), derivados de: i) células CD8+ provenientes de camundongos durante o tratamento com o vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV) clone 13 na estimulação para células exaustas (GSE41867); ii) linfonodos de pacientes diagnosticados com LHc (GSE13996) e; iii) HR/linfadenites benignas (GSE13996).

Tabela 3.5: Dados utilizados nas análises de bioinformática

Nº acesso	Nº microarranjos por	Chip gênico	Referência bibliográfica
GEO	grupo biológico		
GSE41867	4 linf. T CD8+ naïve	MoGene 1.0 st	DOERING et al., 2012
	4 linf. T CD8+ exaustos		
GSE13996	64 LHc	U133 A2.0 human	CHETAILLE et al., 2009
	3 HR		

GEO: *Gene Expression Omnibus*; Linf: linfócitos; LHc: linfoma de Hodgkin clássico; HR: hiperplasia folicular reativa.

Um esquema de todos os passos realizados na abordagem bioinformática encontra-se na Fig. 3.3.



**Figura 3.3: Fluxograma das análises desenvolvidas na abordagem bioinformática.** GEO: *Gene Expression Omnibus*; Linf: linfócitos; LHc: linfoma de Hodgkin clássico; HR: hiperplasia folicular reativa; EBV: vírus Epstein-Barr.

Como parte do pré-processamento dos microarranjos, foi realizada uma análise de controle de qualidade para cada um dos conjuntos de dados usando ferramentas que avaliam os níveis das sondas, através do pacote em R "AffyPLM" (BOLSTAD *et al.*, 2005).

Posteriormente, cada subconjunto de dados foi normalizado mediante o método RMA (do inglês: *robust multi-array average*) proposto por IRIZARRY *et al.* (2003), usando o pacote em R "Affy" (GAUTIER *et al.*, 2004). Este método realiza os seguintes passos: i) ajusta o ruído através da combinação perfeita (do inglês: *perfect match*), usando um modelo estatístico que combina o sinal emitido pelas sondas e o ruído; ii) transforma a log2 a intensidade ajustada previamente; iii) normaliza por quartis usando os valores de log2 de todo o conjunto de dados e; iv) estima a intensidade de cada gene pelo conjunto de sondas presentes, através do método *median pulish*.

# 3.9.1 Quantificação celular a partir de dados de expressão gênica provenientes de microarranjos

A quantificação celular relativa das diferentes subpopulações imunes foi estimada através do *software* CIBERSORT (NEWMAN *et al.*, 2015), utilizando os dados de microarranjo normalizados. De maneira resumida, uma matriz de expressão gênica foi construída pelos autores a partir de dados transcriptômicos de células isoladas, permitindo a caracterização de uma assinatura específica por subpopulação celular imune. Assim, dados do transcriptoma de amostras desconhecidas podem ser comparadas com a matriz do banco de dados para estimar a porcentagem celular (Fig. 3.4). Este *software* permite obter uma quantificação relativa de 22 tipos de células hematopoiéticas humanas (sete subtipos de linfócitos T, linfócitos B *naïve* e de memória, células plasmáticas, linfócitos NK e diferentes subtipos de células dendríticas).



**Figura 3.4: Esquema da ferramenta de análise CIBERSORT.** Adaptado de NEWMAN *et al.* (2015).

#### 3.9.2 Identificação de uma assinatura de expressão gênica do estado celular de exaustão

Dados de expressão gênica depositados em bancos públicos provenientes de linfócitos T CD8+ de camundongos C57BL/6 infectados intravenosamente com  $2 \times 10^6$  pfu do clone 13 do LCMV (DOERING *et al.*, 2012), foram analisados utilizando a plataforma *GenePattern* (REICH *et al.*, 2006). Para obter uma assinatura de expressão gênica diferencial associada ao estado celular de exaustão foi comparado o dia 0 (linfócitos *naïve*) *vs*. dia 30 (linfócitos exaustos), previamente normalizados. Genes diferencialmente superexpressos com *fold change*>2 e *false discovery rate*, FDR<0,05, foram selecionados para fazer parte da assinatura de exaustão imune murina. Posteriormente, análises de homologia entre genes murinos e humanos foram realizados por R, utilizando os bancos de dados org.Hs.eg.db (CARLSON M, 2016a) e org.Mm.eg.db (CARLSON M, 2016b).

Partindo da assinatura proposta, análises de expressão gênica diferencial foram realizadas nos subconjuntos de dados provenientes de pacientes com LHc segundo o *status* do EBV, utilizando um grupo de 3 HR/linfadenites benignas para subtrair a expressão. Genes com *fold change*>2 e FDR<0,05 foram identificados como diferencialmente expressos.

#### 3.10 Análises estatísticas

O teste de *T-student* foi utilizado para análises de associação em variáveis contínuas e categóricas com distribuição normal. Para aquelas variáveis que não apresentavam uma distribuição normal, o teste não paramétrico *Mann-Whitney* foi usado para as análises de associação, assim como o teste de *Spearman* para correlacionar variáveis contínuas. O teste chi-quadrado ( $\chi^2$ ) de Pearson e o teste exato de *Fisher* foram utilizados para uma associação entre variáveis dicotômicas.

Testes de regressão logística linear foram utilizados na avaliação de modelos relacionados à composição celular do MAT com as variações genéticas e o *status* de EBV.

Análises de regressão de mínimos quadrados parciais (PLSR, do inglês: *Partial Least Squares Regression*) foram realizadas para avaliar a relação entre as variáveis latentes (valores de expressão gênica) e células do MAT, especificamente as GRZB+ e o "peso" que estas têm na variável indicadora, usando o pacote de R "plsdepot" (SANCHEZ G, 2012).

Análises de enriquecimento na identificação de redes e dos processos biológicos foram realizadas através da ferramenta STRING (do inglês: *Search Tool for the Retrieval of* 

35

Interacting Genes/Proteins) (SZKLARCZYK et al., 2017) e do banco de dados curado REACTOME (STEIN, 2004).

Os resultados foram considerados significativos com valores de P<0,05 e P<0,01 nos testes bicaudais. Os *softwares* IBM SPSS 20.0 (IBM Corp, Armonk, NY), *GENEX enterprise* (MultiD), *Haploview* e pacotes de R foram utilizados para realizar as análises estatísticas. Adicionalmente, os *softwares* GraphPad Prism 6 (GraphPad Inc, La Jolla, CA, USA) e Adobe® Photoshop® CS6 foram utilizados na construção de figuras.

#### 3.10.1 Análises genéticas

Tomando como base os princípios da genética de populações, no grupo total de indivíduos, análises do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foram realizadas através das frequências genotípicas para todos os SNPs mediante a aplicação do teste  $\chi^2$  de *Pearson* com um grau de liberdade.

Análises de desequilíbrio de ligação foram realizadas no software Haploview para os SNPs estudados no gene *CTLA4*, sendo calculados a partir de três medidas: o escore LOD (*logarithm of the odds*), o coeficiente de desvio padronizado (D') de LEWONTIN (1964) e a medida r<sup>2</sup>. Como parâmetros de análise foram estabelecidos um ponto de corte de *P* do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* de 0,0010 para cada SNP avaliado, um valor de 0,001 para a frequência alélica mínima e uma observação mínima de 75% para os genótipos. Como valores de referência para estabelecer se os SNPs estudados se encontravam em um desequilíbrio de ligação perfeito foram considerados: LOD>2, um valor de D'>0,98 e r<sup>2</sup> próximo de 1 (GABRIEL *et al.*, 2002). Resultados D'>0,7 são considerados como forte desequilíbrio de ligação, representando a porcentagem da probabilidade dos SNPs estudados de serem herdados juntos (GABRIEL *et al.*, 2002). Adicionalmente, o *software* PHASE 2.1 foi utilizado na construção de haplótipos no gene *CTLA4*.

#### 3.10.2 Análise de sobrevida

A análise de sobrevida foi realizada com o método *Kaplan-Meier* e as diferenças entre as distribuições de probabilidade foram comparadas usando o teste *log-rank*. O modelo de regressão de Cox foi utilizado como método multivariado com a estratégia de correção de *Firth*, para identificar o impacto independente das variáveis analisadas na sobrevida. A assunção de proporcionalidade para cada variável foi analisada através do modelo de risco proporcional de COX pela covariância tempo dependente, dados de *P*>0,05 foram considerados como pressuposto satisfeito.

O tipo de resposta terapêutica assim como o tempo de sobrevida para cada paciente foi determinado a partir das informações clínico-radiológico-laboratoriais existentes nos prontuários médicos. Todos os pacientes incluídos neste estudo foram tratados com protocolos baseados na administração de antraciclinas.

A sobrevida livre de progressão (SLP) foi determinada como o tempo em meses compreendido entre o diagnóstico da doença até a progressão, ou recaída, ou início de um tratamento não planejado, ou último seguimento em casos de uma resposta completa, enquanto que a sobrevida global (SG) foi determinada como o período de tempo em meses compreendido entre o diagnóstico e o óbito (por qualquer motivo) ou a data do último contato com o paciente (*follow-up*).

#### 4 **RESULTADOS**

Com o intuito de estudar o papel das contribuições genéticas do hospedeiro em pacientes com LHc, inferir sobre o estado funcional das células efetoras que compõem o MAT e explorar o balanço entre os perfis inflamatório e supressor presentes no tumor no nível molecular e celular de acordo com o *status* do EBV, o desenho do estudo visou: i) estudar perfis de imunossupressão de acordo com variantes polimórficas dos genes *IL10* e *CTLA4*, correlacionando com a composição celular do MAT e resposta terapêutica em pacientes com LHc; ii) caracterizar moléculas associadas aos receptores inibitórios do *checkpoint* imune em linfonodos diagnosticados com LHc; iii) avaliar perfis celulares e moleculares no MAT segundo a presença do EBV; iv) identificar uma potencial assinatura relacionada ao fenômeno de exaustão no LHc associado ao EBV.

Uma vez que esta tese deu origem a mais de um manuscrito, dos quais alguns se encontram em processo de submissão, os resultados serão apresentados em quatro subtópicos, em que cada um incluirá uma discussão específica. No final, uma discussão geral tentará mostrar as contribuições mais relevantes deste trabalho no entendimento da patogênese do LHc.

### 4.1 Perfis de imunossupressão: Polimorfismos genéticos no gene *IL10* e a modulação da composição do microambiente tumoral no linfoma de Hodgkin clássico

Altos níveis da proteína IL10 sérica assim como variantes alélicas de polimorfismos no promotor do gene *IL10* foram associadas com pior prognóstico no LHc de adultos (BLAY *et al.*, 1993; BOHLEN *et al.*, 2000; VIVIANI *et al.*, 2000; VASSILAKOPOULOS *et al.*, 2001; HOHAUS *et al.*, 2007; RAUTERT *et al.*, 2008; HOHAUS *et al.*, 2009; SCHOOF *et al.*, 2013), mas não existem estudos em crianças. O modelo de controle genético da expressão do gene *IL10* não se encontra resolvido e parece depender de tipos celulares específicos (SARAIVA; O'GARRA, 2010). O motivo pelo qual uma alta expressão de IL10 estaria associada ao mau prognóstico no LHc não é conhecido.

Para estudar algumas dessas questões, nesta parte do trabalho, análises de SNPs no promotor do gene *IL10*, assim como um estudo de associação entre as variantes genéticas, a expressão de RNAm, a composição do MAT e a resposta clínica foram realizadas no grupo de LHc pediátrico aqui estudado.

#### 4.1.1 Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes

Um grupo de 99 crianças e adolescentes diagnosticados com LHc no INCA foram incluídos neste estudo. As características clínicas e epidemiológicas encontram-se resumidas na Tabela 3.1.

A idade mediana do grupo foi de 14 anos. Foi observada uma maior prevalência do sexo masculino (63,6%; 63/99) sobre o feminino (36,4%; 36/99) (M:F 1,8:1). Os estadiamentos I e II e a classificação em risco favorável foram observados na maioria dos pacientes (61,7%; 58/94 e 52,1%; 49/94, respectivamente). A presença de massa no mediastino foi reconhecida em 65,3% (62/95) e o comprometimento de sítios extranodais foi descrito em 11,7% (11/94) dos pacientes.

#### 4.1.2 Polimorfismos no promotor proximal do gene de IL10

Do grupo total de pacientes com LHc, 98 casos foram completamente genotipados para a posição rs1800896 (-1082) no promotor proximal do gene da *IL10* e 97 pacientes para a posição rs1800872 (-592). Na posição -1082 (A>G), a distribuição das frequências alélicas foi: 0,6 para o alelo A e 0,4 para o alelo G. Para o SNP na posição -592 (C>A), as frequências alélicas foram observadas em 0,8 para o alelo C e 0,2 para o alelo A. Em 96 pacientes

pediátricos com LHc foi possível realizar a reconstrução do haplótipo. As frequências genotípicas e haplotípicas são mostradas no Anexo IV, Tabela S3.

Para ambos os SNPs, o grupo de pacientes de LHc se encontrava em equilíbrio de *Hardy Weinberg* (*P*>0,05, teste  $\chi^2$  de *Pearson*).

Já no grupo das 20 HR, na posição -1082 do gene da *IL10*, a frequência do alelo A foi de 0,6 e do alelo G de 0,4. Na posição -592 o alelo C foi o mais frequente com uma frequência de 0,8 e o alelo A apresentou uma frequência de 0,2. As frequências dos genótipos e haplótipos são mostradas no Anexo IV, Tabela S3.

#### 4.1.3 Relação entre polimorfismos no promotor do gene *IL10* e níveis de RNAm

Os níveis de RNAm de *IL10* no grupo de LHc foram superiores aos observados nos linfonodos com HR (média de log2 de  $2^{\Delta Cq}$ : -2.515  $\pm$  1.531 vs. -3.757  $\pm$  1.235) (*P*=0,001; teste de *T-Student*) (Fig. 4.1A).

No grupo de LHc, o genótipo -1082GG foi associado com baixos níveis de expressão de *IL10* (média de log2 de  $2^{\Delta Cq}$ : -3,517 ± 2,009) quando comparados com os genótipos AG+AA (log2 de  $2^{\Delta Cq}$ : -2,346 ± 1,392) (*P*=0,014; teste de *T-Student*) (Fig. 4.1B). Já para o SNP -592 não houve diferenças em relação aos níveis de *IL10* (Fig. 4.1C). No grupo de HR, tanto para a posição -1082 quanto para -592 não foram observadas diferenças significativas para a expressão gênica.

Em relação aos haplótipos do promotor proximal da *IL10*, uma tendência à alta expressão gênica foi observada nos pacientes que apresentavam os haplótipos ATA e ACC, em contraste com o observado em pacientes portadores do GCC/GCC (Fig. 4.1D).



**Figura 4.1:** Níveis de expressão gênica de *IL10*. A: associadas aos grupos biológicos de linfoma de Hodgkin clássico (LHc) e hiperplasia folicular reativa (HR); B: de acordo com o genótipo na posição rs1800896 (-1082 A>G) no promotor do gene *IL10*; C: de acordo com o genótipo na posição rs1800872 (-592 C>A) no promotor do gene *IL10*; D: haplótipos construídos baseados nas posições - 1082A/G e -592C/A. A barra representa a média do grupo total de avaliações  $\pm$  desvio padrão. n=número de casos em cada categoria.

### 4.1.4 Associação das variantes genéticas da *IL10* com a composição do microambiente tumoral

Tendo em vista que os genótipos e haplótipos no promotor do gene *IL10* estão associados aos níveis de RNAm de *IL10* nos linfonodos, surgiu a pergunta se estas mesmas variantes genéticas poderiam modular a composição do MAT no LHc. Dado o papel do fator de transcrição MAF no controle da expressão de *IL10* (CAO *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2009), o número de células MAF+ no MAT foi utilizado como um *proxy* da expressão de IL10 pelas células do MAT.

Pacientes portadores do genótipo -1082GG (associado com baixos níveis de *IL10*) e do genótipo -592CC exibiram um menor número de células MAF+ no MAT (mediana: 20 vs. 78 células/mm<sup>2</sup> e 49 vs. 108 células/mm<sup>2</sup>; P=0,012 e P=0,003, respectivamente; teste de *Mann-Whitney*). Além disso, os pacientes portadores do genótipo -1082GG mostraram uma menor

porcentagem de macrófagos CD68+MAF+ no MAT (15,04% vs. 47,26% para os outros genótipos, P=0,017; teste de *Mann-Whitney*) (Fig. 4.2 e 4.3).



Figura 4.2: Macrófagos M2-like (CD68+MAF+) no microambiente tumoral de linfoma de Hodgkin clássico. Caso com alto número de células CD68+MAF+. A identificação celular foi realizada por dupla marcação mediante a técnica de imunohistoquímica, em que a marcação em marrom indica o fator de transcrição MAF e em azul a expressão de CD68. Aumento de 400x.

Em suma, variantes genéticas que determinam altos níveis de *IL10* foram associadas a um maior número de linfócitos e macrófagos que expressam MAF (fator de transcrição de *IL10*), mostrando que o controle genético nos níveis de RNAm se reflete também a nível celular.

Além das associações descritas, foram observadas correlações inversas dos níveis de expressão de *IL10* com o número de células dendríticas (Rho=-0,310; P=0,008; teste de *Spearman*), assim como com o número de linfócitos Th1 (TBET+) (Rho=-0,248; P=0,033) (Fig. 4.4).



**Figura 4.3**: Número de células que expressam o fator de transcrição MAF segundo os genótipos e haplótipos no promotor proximal do gene *IL10*. A: Número de células MAF+ segundo os genótipos na posição -1082 A>G; B: Número de células MAF+ segundo os genótipos na posição -592 C>A; C: Porcentagem de macrófagos CD68+MAF+ segundo os genótipos na posição -1082 A>G; D: Número de células MAF+ segundo o apolótipo ATA quando comparado aos outros haplótipos. A barra central representa a mediana do número de células das avaliações em cada grupo e a barra inferior e superior o interquartil 25% e 75%, respectivamente. n=número de casos em cada categoria.



Figura 4.4: Correlação entre os níveis de RNAm *IL10* e o número de células quantificadas no microambiente tumoral. A: níveis de RNAm *IL10 vs.* número de células dendríticas (langerina+/mm<sup>2</sup>); B: níveis de RNAm *IL10 vs.* número de células TBET+/mm<sup>2</sup>. Cada círculo representa um paciente. A linha diagonal representa o coeficiente de correlação de *Spearman*. Expressão relativa em valores de log2 de  $2^{\Delta Cq}$ . Quantificação celular mediante a técnica de imunohistoquímica.

A presença do EBV é capaz de modular a composição do MAT, como previamente descrito (BARROS *et al.*, 2012a; BARROS *et al.*, 2015). Devido a isto, realizamos análises para testar as interações entre o EBV e os SNPs na composição celular do MAT. Uma razão >1,5 entre células FOXP3+ e MAF+ com CD8+ e TBET+ seriam um indicativo da presença de um MAT Th2/supressor predominante.

Análises de regressão logística linear foram realizadas, utilizando as proporções celulares em valores de log10 como variável dependente. A razão MAF+/TBET+ demonstrou ser inversamente dependente da presença do EBV e de variáveis genéticas associadas à baixa expressão de *IL10* (genótipo -1082GG, P=0,011; -592CC genótipo, P=0,018 e; haplótipo GCC, P=0,023), como mostrado na Tabela 4.1, indicando um efeito significativo tanto do EBV como dos genótipos/haplótipos na modulação do MAT.

		Intervalo de confiança (95%)				
Covariáveis	Εχρ(β)	Inferior	Superior	<i>P</i> -valor		
EBV	0,308	0,034	0,581	0,028		
Genótipo -1082GG	0,422	0,069	0,775	0,020		
Constante	-1,018	-1,791	-0,244	0,011		
EBV	0,314	0,037	0,591	0,027		
Genótipo -592CC	0,305	0,029	0,581	0,031		
Constante	-0,702	-1,277	-0,126	0,018		
EBV	0,327	0,045	0,609	0,024		
Haplótipo GCC	0,302	0,007	0,597	0,045		
Constante	-0,686	-1,277	-0,096	0,023		

**Tabela 4.1:** Regressão logística linear, utilizando como variável dependente a razão de células MAF+/TBET+ em log10 da composição do MAT

Estes resultados representam três modelos testados independentemente.

# 4.1.5 Polimorfismos genéticos e níveis de expressão gênica da *IL10* relacionados às características clínicas e terapêuticas dos pacientes pediátricos com linfoma de Hodgkin clássico

Pacientes com altos níveis de RNAm de *IL10* mostraram uma maior frequência de sintomas-B com 64,3% (27/42) *vs.* 35,7% (15/42) que aqueles que apresentaram baixa expressão (P=0,013; teste de  $\chi^2$ ).

As variantes genéticas do promotor da *IL10* ou os níveis de expressão gênica não mostraram associação com estadiamento de *Ann-Arbor*, subtipo histológico,

comprometimento extranodal, massa no mediastino ou *status* do EBV. Análises de sobrevida foram realizadas na procura de um valor prognóstico relacionado à presença dos SNPs com a SG e SLP. Uma pior SLP foi associada, em análises univariadas, com a presença de leucopenia (50,0% vs. 80,0%; P=0,034, teste de *log-rank*), doença extranodal (54,5% vs. 81,0%, P=0,028), subtipo histológico CM quando comparado aos outros subtipos (61,1% vs. 80,8%, P=0,057) e um alto número de linfócitos GRZB+ (69,6% vs. 90,9%, P=0,045) como descrito em BARROS *et al.* (2012).

Genótipos no promotor proximal da *IL10* influenciaram o prognóstico dos pacientes pediátricos com LHc. Uma pior SLP foi associada à presença do genótipo -592AA (50,0%) quando comparados com os pacientes que apresentavam os genótipos AC (74,2%) e CC (87,0%) (P=0,009, teste de *log-rank*; HR: 2,35 IC 95%: 1,28-4,29). Por outro lado, pacientes que apresentaram o genótipo -1082GG mostraram uma melhor SLP (100,0%) *vs.* AG+AA (72,2%) (P=0,024, teste de *log-rank*; HR: 0,09 IC 95%: 0,00-0,69) (Tabela 4.2 e Fig. 4.5A-D).

Em relação aos haplótipos, pacientes portadores do haplótipo ATA mostraram uma pior SLP (68,3%) quando comparados com pacientes com os outros haplótipos (86,7%) (P=0,035, teste de *log-rank*; HR: 2,60 IC 95%: 1,05-7,12) (Fig. 4.5E). As variantes genéticas estudadas no promotor do gene da *IL10* não apresentaram associação com a SG (Anexo IV, Tabela S4). Níveis de expressão gênica de *IL10* estratificada segundo o valor da mediana do grupo total não foram associadas a um tempo de sobrevida significativamente diferente para SLP ou SG.

Variánal	Número de	HR (Expß)	IC (95	%) univar.	Univar.	HR (Expβ)	IC (95%	6) multivar.	Multivar.
variavel	eventos	univar.	Inferior	Superior		multivar.	Inferior	Superior	<i>P</i> -valor
-1082 <i>IL10</i>									
GG	0/16				0,065#				
AG	10/39	0,495	0,239	0,939	0,031£	0,322	0,095	0,805	0,013£
AA	10/33								
GG	0/16				0,024#				
AG+AA	20/72	0,095	0,001	0,691	0,013£	0,054	0,000	0,511	0,005£
-592 <i>IL10</i>									
AA	5/10				0.009#				
AC	8/31	2.350	1.278	4.291	0.007£	2.362	1.157	4.860	0.019£
CC	6/46	y	<b>,</b>	<b>,</b> -		y	,	,	
CC	6/46				0,032#				
AC+AA	13/41	0,378	0,138	0,932	0,034£	0,328	0,109	0,909	0,032£
Haplótipos									
ACC	9/43				0,721#				
ATA+ GCC	10/43	0,853	0,347	2,068	0,723£	1,505	0,521	4,700	0,454£
ATA	13/41				0,035#				
GCC+ ACC	6/45	2,601	1,055	7,119	0,038£	2,904	1,043	8,759	0,041£
GCC	10/55				0.204#				
ACC+ATA	9/31	0,560	0,231	1,375	0,200£	0,405	0,102	1,361	0,454£

**Tabela 4.2:** Análise de sobrevida livre de progressão (SLP) segundo os genótipos e haplótipos no promotor do gene *IL10* em pacientes pediátricos com diagnóstico de linfoma de Hodgkin clássico

# *P*-valor calculado pelo teste de *log-rank*. £ Razão de chance (HR, do inglês: *hazard ratio*) e *P*-valor calculado mediante a estratégia de correção de *Firth*. Em análise multivariada foram consideradas as seguintes variáveis: número de sítio extranodal, maior número de células granzima B+ (mediana >25% do número de células no microambiente tumoral), presença de leucopenia, subtipo histológico celularidade mista. IC: intervalo de confiança; Univar: univariada; Multivar: multivariada.



Figura 4.5: Curvas de *Kaplan-Meier* para a sobrevida livre de progressão (SLP) em pacientes pediátricos diagnosticados com linfoma de Hodgkin clássico. A: SLP de acordo aos genótipos na posição -1082 do gene *IL10*; B: SLP comparando a SLP dos pacientes portadores -1082GG *vs*. AG+AA C: SLP de acordo aos genótipos na posição -592 do gene *IL10*; D: SLP comparando os pacientes portadores dos genótipos -592CC *vs*. AC+AA; E: SLP segundo a presença do haplótipo ATA *vs*. outros haplótipos. No eixo "X" se encontra o número de pacientes em risco pra cada categoria ao longo do tempo.

Em análises multivariadas, as variáveis clínicas e do MAT com impacto na SLP foram consideradas para realizar novas análises, como mostrado nas análises univariadas, o genótipo GG na posição -1082, o genótipo CC na posição -592 e o haplótipo ATA mantiveram impacto prognóstico como mostrado na Tabela 4.3.

**Tabela 4.3:** Regressão de Cox considerando os genótipos/haplótipos no gene *IL10* com outras variáveis que influenciam a sobrevida livre de progressão em pacientes pediátricos com linfoma de Hodgkin clássico. (A) Modelo I, genótipo GG na posição -1082; (B) Modelo II, genótipo CC na posição -592; (C) Modelo III, haplótipo ATA (A)

	Intervalo de confiança (95%)			
Variável	HR (Expß)	Inferior	Superior	P-valor
Sítio extranodal	6,641	1,820	21,684	0,006
Maior número de células Granzima B+	4,179	1,218	22,122	0,021
Leucopenia	2,822	0,848	7,756	0,086
Subtipo celularidade mista	3,637	1,242	10,076	0,020
Genótipo -10822GG	0,054	0,000	0,511	0,005

Esta análise multivariada foi realizada com 74 pacientes.

**(B)** 

Variável	HR (Expβ)	Inferior	Superior	P-valor
Sítio extranodal	4,451	1,314	12,716	0,019
Maior número de células Granzima B+	6,209	1,504	57,200	0,008
Leucopenia	3,313	0,823	10,535	0,086
Subtipo celularidade mista	2,850	0,978	7,753	0,055
Genótipo -592CC	0,328	0,109	0,909	0,032

Esta análise multivariada foi realizada com 73 pacientes.

( <b>C</b> )				
		Intervalo de confiança (95%)		
Variável	HR (Expβ)	Inferior	Superior	P-valor
Sítio extranodal	4,265	1,260	12,174	0,022
Maior número de células Granzima B+	6,853	1,622	63,888	0,006
Leucopenia	3,265	0,811	10,402	0,089
Subtipo celularidade mista	2,926	1,007	7,923	0,049
Haplótipo ATA	2,904	1,043	8,759	0,041

Esta análise multivariada foi realizada com 72 pacientes.

Em suma, genótipos e haplótipos associados à alta expressão de *IL10* intratumoral e a um maior número de células expressando marcadores de supressão no MAT foram também

associadas a mau prognóstico, reforçando o papel da molécula e suas variantes genéticas na biologia e resposta terapêutica do LHc.

Este grupo de resultados deu origem a um manuscrito, atualmente em processo de submissão intitulado: *"Interleukin 10 (IL10) proximal promoter polymorphisms beyond clinical response in classical Hodgkin lymphoma: Exploring the basis for the genetic control of the tumor microenvironment"* por <u>Gabriela Vera-Lozada</u>, Carolina Minnicelli, Priscilla Segges, Gustavo Stefanoff, Gerald Niedobitek, Mário Henrique M. Barros, Rocio Hassan.

#### 4.1.6 Discussão

As células H-RS produzem citocinas e quimiocinas capazes de modular a composição do MAT de uma maneira supressora, contribuindo no desenvolvimento e progressão tumoral (SKINNIDER; MAK, 2002; ALDINUCCI *et al.*, 2010; STEIDL; CONNORS; GASCOYNE, 2011). Com o objetivo de inferir uma função biológica da citocina IL10, o impacto de polimorfismos do gene *IL10* na resposta terapêutica foi estudado em um grupo de pacientes pediátricos com LHc. Observou-se que os genótipos -1082AA+AG e haplótipo ATA associaram-se a um pior prognóstico. Isto está em concordância com estudos anteriores, em que foi mostrado que pacientes adultos com LHc portadores do genótipo -592AA e haplótipo ATA/ATA mostraram um pior prognóstico (HOHAUS *et al.*, 2007; SCHOOF *et al.*, 2013). Os resultados do nosso grupo pediátrico apoiam a importância do papel das variantes genéticas da *IL10* no LHc, independentemente do grupo etário estudado.

Com o propósito de encontrar uma relação entre as variáveis genéticas e características fenotípicas que possam explicar as associações com o prognóstico desfavorável dos pacientes, foram quantificados os níveis de RNAm de *IL10* e os subtipos celulares no MAT.

Em primeiro lugar, uma alta expressão de *IL10* foi observada em linfonodos de pacientes com LHc quando comparados às HR, reforçando as características supressoras no LHc. Níveis sistêmicos aumentados de IL10 foram associados ao risco desfavorável e a uma pior resposta terapêutica (BLAY *et al.*, 1993; BOHLEN *et al.*, 2000; VIVIANI *et al.*, 2000; VASSILAKOPOULOS *et al.*, 2001; RAUTERT *et al.*, 2008; HOHAUS *et al.*, 2009; GAIOLLA *et al.*, 2011). No nosso estudo, altos níveis de RNAm de *IL10* estiveram correlacionados com a presença de sintomas B, e variáveis genéticas de alta expressão gênica foram associadas a uma diminuição no tempo de sobrevida, reforçando a ideia de que a expressão de IL10 no LHc não é somente um reflexo da carga sistêmica da doença, senão que esta citocina tem um papel importante na patofisiologia e resposta clínica da doença.
Quanto à correlação genótipo-fenótipo nos polimorfismos no promotor proximal da *IL10*, esta não se encontra bem definida ainda. No nosso modelo *in vivo*, que se baseia nos níveis de expressão de células com diferentes níveis de ativação no MAT, foi observado que o polimorfismo na posição -1082A/G é capaz de modular os níveis de RNAm de *IL10*, como exemplificado pela associação da variante alélica A com a alta expressão de *IL10*. Este achado encontra-se em discrepância com as observações realizadas por TURNER *et al.* (1997) e MÖRMANN *et al.* (2004), que descreveram altos níveis de IL10 associados ao genótipo -1082GG em algumas condições de ativação celular, o que pode dever-se às diferentes condições experimentais e à diversidade da composição celular nos modelos utilizados. De fato, foi descrito que a ocupação do promotor de *IL10* varia dependendo do tipo celular (linfócitos, monócitos e macrófagos) (SARAIVA; O'GARRA, 2010).

Ao nível celular, a expressão de MAF+ foi observada em poucas células tumorais, enquanto que nas diferentes células que integram o MAT, esta expressão foi variável. Associações entre as variantes genéticas de *IL10*, níveis de RNAm e a composição celular do MAT permitiu destacar vários aspectos no controle da *IL10* no LHc. As variantes genéticas que foram associadas a altos níveis de *IL10*, também foram relacionadas a um maior número de células inflamatórias MAF+. Partindo da ideia que MAF é fator de transcrição essencial de *IL10* (CAO *et al.*, 2005), o modelo de controle genético no nível de RNAm foi replicado ao nível celular, pelo menos em relação às células não neoplásicas.

Uma vez que as principais associações no MAT foram observadas entre polimorfismos de *IL10* e expressão de MAF nas células inflamatórias, uma possível explicação seria a ação em *cis* de polimorfismos de *IL10* no domínio de ligação de MAF no promotor da *IL10*. O sítio de ligação de MAF, que se assemelha a um elemento de reconhecimento MAF (MARE, do inglês: *MAF recognition element*), se encontra localizado a -196/-184 no promotor *IL10* e tem sido demonstrado através de experimentos *in vitro* (EMSA) e *in vivo* (ensaio ChIP) ser funcional (CAO *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2009). Adicionalmente, é provável que um dos efeitos do polimorfismo no promotor de *IL10*, levando a consequente regulação da taxa de expressão de IL10. Alta expressão de *IL10* no MAT pode mediar um ciclo positivo de enriquecimento de linfócitos e macrófagos intratumorais associados a um fenótipo supressor.

Os macrófagos têm sido caracterizados por apresentar uma capacidade de plasticidade entre funções pró-inflamatórias e supressoras (BISWAS; ALLAVENA; MANTOVANI,

2013). Um maior número de macrófagos no MAT tem sido associado a um pior prognóstico em pacientes adultos com LHc (STEIDL *et al.*, 2010; TZANKOV; MATTER; DIRNHOFER, 2010<sup>;</sup> KAMPER *et al.*, 2011). Em nossa coorte de pacientes pediátricos foi reportado que macrófagos M2-*like*, diferente dos M1-*like*, foram associados a um menor tempo de sobrevida (BARROS *et al.*, 2015). Neste trabalho, foi mostrado que a porcentagem de macrófagos polarizados M2-*like* estiveram correlacionados com os genótipos de *IL10*, sugerindo o papel de fatores genéticos do hospedeiro na susceptibilidade de polarização dos macrófagos intratumorais para um desempenho supressor, indiretamente participando na modulação do MAT.

Adicionalmente, foi observada uma correlação inversa entre a expressão de *IL10* com o número de células TBET+ (Th1) e subpopulações de células dendríticas. Isto poderia refletir a inversa relação numérica na composição celular do MAT segundo um perfil Th1 ou Th2/T regulador (KIDD, 2003; SKAPENKO *et al.*, 2004), sugerindo um papel ainda não comprovado da citocina na diferenciação *in situ* e ativação de linfócitos intratumorais e células dendríticas.

Em relação ao EBV, não foi possível evidenciar uma associação consistente entre sua presença e as variantes genéticas ou expressão de MAF. CHAPMAN *et al.* (2001) sugerem que a expressão de IL10 nas células H-RS contribui na evasão da resposta citotóxica contra o vírus. Assim, IL10 seria capaz de mediar localmente de uma maneira autócrina a evasão imune. Neste estudo, o nível de expressão de *IL10* foi quantificado por RNAm no linfonodo contendo células tumorais e do MAT, representando a contribuição tanto das células H-RS como as infiltrantes. Neste sentido, uma vez que em pacientes pediátricos com LHc a presença do EBV está associado a um MAT com orientação citotóxica/Th1/M1 (BARROS *et al.*, 2012; BARROS *et al.*, 2015), o fato de não encontrar diferenças entre os casos EBV+ e EBV- não é inesperado. Estudos adicionais que possam discriminar melhor os padrões de expressão de IL10 tanto ao nível celular como molecular no tumor, assim como a nível celular específico em relação ao estado de EBV ajudariam a clarificar este ponto, incluindo a interação entre EBV e IL10 na modulação do MAT.

Estes resultados avançam com a hipótese de que possivelmente o *background* genético de um indivíduo tenha influência na forma como o MAT é polarizado, e que isto possa ser base da susceptibilidade e da resposta ao tratamento antineoplásico. Além dos resultados específicos obtidos nesta parte do trabalho, mostrando o papel de IL10 na imunopatologia e resposta clínica do LHc, consideramos que este conceito é original e contribui com elementos

teóricos para a forma como está sendo pensada a susceptibilidade genética ao câncer na atualidade.

# 4.2 Caracterização de moléculas associadas ao *checkpoint* imune e ao perfil de exaustão no linfoma de Hodgkin clássico

Visto o papel que as moléculas *BTLA*, *CTLA4*, *LAG3*, *PDCD1*, *CD274/PDL1*, *HAVCR2/TIM3*, entre outras, têm como reguladoras negativas da resposta imune (PARDOLL, 2012; MAHONEY; RENNERT; FREEMAN, 2015), a falta de avaliação do perfil de expressão destas moléculas no LHc e o interesse que existe em estudar o processo de exaustão imune na doença (VARDHANA; YOUNES, 2016), analisamos essas moléculas através de ensaios de expressão gênica. Adicionalmente, foi avaliada a expressão des fatores de transcrição *TBX21/TBET* e *EOMES* devido ao seu papel na diferenciação e função das subpopulações de linfócitos T CD8+. Genes relacionados ao perfil inflamatório inicialmente escolhidos, *IFNG, CXCL10* e *STAT1*, e genes do perfil supressor, *IL10* e *STAT6* (fator de transcrição de IL4) também foram estudados.

#### 4.2.1 Análise de expressão gênica de moléculas relacionadas ao checkpoint imune

Inicialmente 91 casos provenientes da coorte descrita na Tabela 3.1 foram incluídos nesta etapa do estudo, baseados na quantidade disponível de material FFPE. Cinco amostras não passaram nos controles de qualidade para a realização dos estudos de expressão gênica. Ao final, 86 casos puderam ser estudados com sucesso.

Os níveis de RNAm de *BTLA* (mediana  $\pm$  faixa interquartil: 2,219  $\pm$  1,922) foram os maiores, seguido de *CTLA4* (1,285  $\pm$  1,790), *LAG3* (-0,347  $\pm$  2,713), *PDCD1* (-0,954  $\pm$  2,138), *CD274/PDL1* (-2,496  $\pm$  3,088) e *HAVCR2/TIM3* (-5,281  $\pm$  3,695). Em relação aos fatores de transcrição, em geral *TBX21/TBET* apresentou níveis maiores de expressão (-0,565  $\pm$  2,173) do que *EOMES* (-1,918  $\pm$  4,027) (Fig. 4.6).

A expressão dos genes do *checkpoint* imune avaliados mostrou uma correlação direta (P<0,01, correlação de *Spearman*), com exceção de *CTLA4*. De igual maneira, os níveis de expressão de *TBX21/TBET* e *EOMES* foram correlacionados com os genes do *checkpoint* imune (P<0,05) (Tabela 4.4).



Figura 4.6: Níveis de expressão gênica de moléculas associadas ao *checkpoint* imune e dos fatores de transcrição *TBX21/TBET* e *EOMES* no grupo total de pacientes pediátricos diagnosticados com linfoma de Hodgkin clássico. Cada *box plot* representa os níveis de expressão dos diferentes genes avaliados no grupo de pacientes. A barra dentro da caixa representa a mediana da expressão gênica, os limites da caixa à dispersão dos valores entre os quartis 25 e 75 e os extremos do gráfico o valor mínimo e máximo do conjunto de dados. Expressão relativa em valores de log2 de  $2^{\Delta Cq}$ .

BTLA $P$ -valorCTLA40,170 $P$ -valor0,143LAG30,701***0,145 $P$ -valor0,0010,212PDCD10,568***0,1680,585*** $P$ -valor0,0010,1460,001CD274/PDL10,314**0,0080,477***0,356** $P$ -valor0,0060,946<0,001	GDI	BTLA	CTLA4	LAG3	PDCD1	CD274/PDL1	HAVCR2/TIM3	TBX21/TBET	E
P-valor9,700 $CTLA4$ 0,170 $P$ -valor0,143 $IAG3$ 0,701***0,145 $P$ -valor0,0010,212 $P$ DCD10,568***0,168 $P$ -valor0,010 $Q$ 0010,146 $P$ -valor0,001 $Q$ 0010,146 $P$ -valor0,001 $Q$ 0010,146 $P$ -valor0,001 $Q$ 0010,146 $P$ -valor0,001 $Q$ 0010,002 $P$ -valor0,016 $Q$ 0010,002 $P$ -valor0,017 $Q$ 1430,011 $P$ -valor0,011 $Q$ 0010,011 $P$ -valor0,011 $Q$ 0010,011 $Q$ 0010,011 $Q$ 0010,011 $P$ -valor0,011 $Q$ 0010,011 $Q$ 0010,022 $Q$ 0010,001	BTLA								
CTLA40,170 $P$ -valor0,143LAG30,701***0,145 $P$ -valor $2,001$ $0,145$ $P$ -valor $0,001$ $0,212$ PDCD1 $0,568***$ $0,168$ $0,585***$ $P$ -valor $0,001$ $0,146$ $0,001$ CD274/PDL1 $0,314**$ $0,008$ $0,477***$ $0,356**$ $P$ -valor $0,001$ $0,008$ $0,002$ HAVCR2/TIM3 $0,077$ $0,035$ $0,412***$ $0,388**$ $0,384**$ $P$ -valor $0,514$ $0,755$ $0,001$ $0,001$ $-1$ TBX21/TBET $0,419***$ $0,237$ $0,605***$ $0,542***$ $0,406***$ $0,410***$ $P$ -valor $0,011$ $0,040$ $0,001$ $0,001$ $0,001$ $0,001$ $0,001$ $P$ -valor $0,011$ $0,084$ $0,001$ $0,022$ $0,001$ $0,001$ $0,001$	P-valor								
P-valor0,1430,145 $LAG3$ 0,701***0,145 $P$ -valor<0,0010,212 $PDCD1$ 0,568***0,1680,585*** $P$ -valor<0,0010,146<0,001 $P$ -valor<0,0010,146<0,001 $P$ -valor<0,0060,946<0,001 $P$ -valor0,006<0,946<0,001 $P$ -valor0,017<0,0350,412***0,308** $P$ -valor0,5140,765<0,0010,008 $P$ -valor0,419***0,2370,605***0,542***0,406***0,440*** $P$ -valor<0,001<0,001<0,001<0,001 $P$ -valor0,0010,040<0,001<0,001<0,001 $P$ -valor0,0110,040<0,001<0,001<0,001 $P$ -valor0,0010,084<0,001<0,001<0,001<0,001 $P$ -valor0,0010,084<0,001<0,001<0,001<0,001<0,001	CTLA4	0,170							
LAG30,701***0,145 $P$ -valor<0,0010,212PDCD10,568***0,168 $0,585***$ $P$ -valor<0,001<0,146<0,001CD274/PDL10,314**0,0080,477***0,356** $P$ -valor0,006<0,946<0,001 $P$ -valor0,005<0,412***0,308**0,384** $P$ -valor0,5140,7550,412***0,308**0,406*** $P$ -valor0,5140,2370,605***0,542***0,406***0,440*** $P$ -valor0,001<0,001<0,001<0,001 $P$ -valor0,0010,040<0,001<0,001 $P$ -valor0,0010,040<0,001 $P$ -valor0,0010,040 </td <td>P-valor</td> <td>0,143</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	P-valor	0,143							
P-valor $< 0,001$ $0,212$ $< 0,168$ $< 0,585***$ $< 0,168$ $< 0,585***$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,002$ $< 0,001$ $< 0,002$ $< 0,001$ $< 0,002$ $< 0,001$ $< 0,002$ $< 0,001$ $< 0,002$ $< 0,001$ $< 0,002$ $< 0,001$ $< 0,002$ $< 0,001$ $< 0,002$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$ $< 0,001$	LAG3	0,701***	0,145						
PDCD1       0,568***       0,168       0,585***         P-valor       <0,001	P-valor	<0,001	0,212						
P-valor       <0,001	PDCD1	0,568***	0,168	0,585***					
CD274/PDL1       0,314**       0,008       0,477***       0,356**         P-valor       0,006       0,946       <0,001       0,002         HAVCR2/TIM3       0,077       -0,035       0,412***       0,308**       0,384**         P-valor       0,514       0,765       <0,001       0,008       0,001	P-valor	<0,001	0,146	<0,001					
P-valor       0,006       0,946       <0,001	CD274/PDL1	0,314**	0,008	0,477***	0,356**				
HAVCR2/TIM3       0,077       -0,035       0,412***       0,308**       0,384**         P-valor       0,514       0,765       <0,001	P-valor	0,006	0,946	<0,001	0,002				
P-valor       0,514       0,765       <0,001	HAVCR2/TIM3	0,077	-0,035	0,412***	0,308**	0,384**			
TBX21/TBET       0,419***       0,237       0,605***       0,542***       0,406***       0,440***         P-valor       <0,001	P-valor	0,514	0,765	<0,001	0,008	0,001			
P-valor       <0,001	TBX21/TBET	0,419***	0,237	0,605***	0,542***	0,406***	0,440***		
EOMES         0,373**         0,199         0,504***         0,505***         0,263*         0,415***         0,615***           P-valor         0,001         0,084         <0,001	P-valor	<0,001	0,040	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001		
P-valor 0,001 0,084 <0,001 <0,001 0,022 <0,001 <0,001	EOMES	0,373**	0,199	0,504***	0,505***	0,263*	0,415***	0,615***	
	P-valor	0,001	0,084	<0,001	<0,001	0,022	<0,001	<0,001	

**Tabela 4.4:** Correlação entre os genes de interesse relacionados ao *checkpoint* imune e os fatores de transcrição *TBX21/TBET* e *EOMES* avaliados por RT-qPCR no grupo de pacientes pediátricos diagnosticados com linfoma de Hodgkin clássico

*P-valor* obtido pelo teste de *Spearman.* \* *P*<0,05; \*\* *P*<0,01; \*\*\* *P*<0,001.

### 4.2.2 Níveis de expressão de genes relacionados ao *checkpoint* imune associado ao perfil imune inflamatório e supressor no linfoma de Hodgkin clássico

Dentre os genes do perfil inflamatório *STAT1* apresentou a maior expressão (mediana  $\pm$  faixa interquartil: 2,528  $\pm$  1,336), seguido de *IFNG* (-2,283  $\pm$  2,919) e *CXCL10* (-9,046  $\pm$  6,577), já no grupo do perfil supressor *STAT6* apresentou a maior expressão (2,087  $\pm$  0,797) comparado com *IL10* (-2,255 + 2,024).

Uma correlação positiva foi observada entre todos os genes avaliados do *checkpoint* imune com os genes do perfil inflamatório, com exceção dos níveis de *CTLA4*, assim como com os fatores de transcrição *TBX21/TBET* e *EOMES* (*P*<0,01; correlação de *Spearman*) (Tabela 4.5), indicando que as maiores expressões dos genes do *checkpoint* imune foram observadas nos casos com alta expressão dos genes pró-inflamatórios.

De maneira importante, os níveis de RNAm de *IL10* também mostraram uma correlação direta com *LAG3*, *PDCD1* e *HAVCR2/TIM3* e ambos os fatores de transcrição (*P*<0,05) como mostrado em Tabela 4.5.

		Inflamatórios	Supressão			
GDI	CXCL10	IFNG	STAT1	<i>IL10</i>	STAT6	
BTLA	0,341**	0,157	0,307**	0,099	0,037	
P-valor	0,003	0,180	0,008	0,403	0,753	
CTLA4	-0,175	0,074	0,188	0,177	0,017	
P-valor	0,137	0,529	0,112	0,135	0,888	
LAG3	0,630***	0,309**	0,576***	0,341**	0,079	
P-valor	<0,001	0,007	<0,001	0,003	0,503	
PDCD1	0,478***	0,305**	0,381**	0,288*	0,133	
P-valor	<0,001	0,008	0,001	0,014	0,257	
CD274/PDL1	0,475***	0,126	0,342**	0,227	-0,139	
P-valor	<0,001	0,286	0,003	0,053	0,237	
HAVCR2/TIM3	0,537***	0,146	0,373**	0,379***	0,419***	
P-valor	<0,001	0,179	0,001	<0,001	<0,001	
TBX21/TBET	0,433***	0,327**	0,506***	0,350**	0,241*	
P-valor	<0,001	0,004	<0,001	0,002	0,038	
EOMES	0,337**	0,319**	0,372**	0,454***	0,206	
P-valor	0,003	0,006	0,001	<0,001	0,078	

**Tabela 4.5:** Correlação dos genes do *checkpoint* imune com os perfis de expressão gênica (inflamatório e supressor) avaliados por RT-qPCR no grupo de pacientes pediátricos diagnosticados com linfoma de Hodgkin clássico

*P-valor* obtido pelo teste de *Spearman*. \* *P*< 0,05; \*\* *P*<0,01; \*\*\* *P*<0,001.

### 4.2.3 Identificação e quantificação de células PD1 positivas intratumorais em pacientes pediátricos com linfoma de Hodgkin clássico

Devido à importância da molécula PD1 e seu papel chave na diferenciação e associação com o estado de exaustão dos linfócitos (BARBER *et al.*, 2006), a quantificação de linfócitos PD1+ no MAT foi realizada por marcação imunohistoquímica e posterior contagem assistida por computador, em colaboração com o Dr. Mário Barros.

Linfócitos PD1+ variaram de 0 a 363 cél/mm<sup>2</sup> (média de 37 cél/mm<sup>2</sup>) no MAT. Estes foram distribuídos de maneira uniforme por todo o linfonodo, sendo que em alguns poucos casos foi observada a formação de um padrão em forma de roseta em torno das células H-RS (Fig. 4.7).



**Figura 4.7: Linfócitos PD1+ no microambiente tumoral de linfoma de Hodgkin clássico.** Esta figura representa um caso com células PD1+ distribuídas de maneira uniforme no linfonodo, em que também foi possível observar células PD1+ com padrão em forma de roseta em torno das células Hodgkin e Reed-Sternberg (quadrado). A identificação celular foi realizada pela técnica de imunohistoquímica, em que a identificação de uma coloração marrom na membrana plasmática foi considerada como positiva. Aumento de 400x.

O número de células PD1+/mm<sup>2</sup> foi correlacionado diretamente com o número de células CD4+/mm<sup>2</sup> (Rho=0,266; P=0,018, correlação de *Spearman*), CD8+/mm<sup>2</sup> (Rho=0,254; P=0,022), e CD20+/mm<sup>2</sup> (Rho=0,370; P=0,001) (Fig. 4.8).



Figura 4.8: Correlação entre o número de células PD1+ e o número de linfócitos quantificados no microambiente tumoral. A: número de células PD1+ *vs.* número de células CD4+/mm<sup>2</sup>; B: número de células PD1+ *vs.* número de células CD8+/mm<sup>2</sup>; C: número de células PD1+ *vs.* número de células CD20+/mm<sup>2</sup>. Cada círculo representa um paciente. A linha diagonal representa o coeficiente de correlação de *Spearman.* Expressão relativa em valores de log2 de  $2^{\Delta Cq}$ . Quantificação celular mediante a técnica de imunohistoquímica.

Não houve associações significativas entre o número de células PD1+/mm<sup>2</sup> e as variáveis clínicas e histológicas.

# 4.2.4 Análise da composição do microambiente tumoral em relação à expressão de genes associados ao *checkpoint* imune

Visando identificar se existia uma correlação entre os níveis de RNAm de *PDCD1* e *TBX21/TBET* com o número de células que expressam estas proteínas, quantificadas previamente no MAT, análises de correlação entre ambas as variáveis foram desenvolvidas. Uma correlação positiva foi observada entre os níveis de expressão de *PDCD1* e células PD1+/mm<sup>2</sup> (Rho=0,408, *P*=0,001, correlação de *Spearman*), assim como os níveis de

expressão de *TBX21* e células TBET+/mm<sup>2</sup> (Rho=0,319, P=0,010) (Fig. 4.9), mostrando que a composição de células PD1+ e TBET+ são replicadas ao nível molecular.



Figura 4.9: Correlação entre os níveis de RNAm e o número de células quantificadas no microambiente tumoral expressando a proteína correspondente. A: níveis de RNAm *TBX21/TBET vs.* número de células TBET+/mm<sup>2</sup>; B: níveis de RNAm *PDCD1 vs.* número de células PD1+/mm<sup>2</sup>. Cada círculo representa um paciente. A linha diagonal representa o coeficiente de correlação de *Spearman.* Expressão relativa em valores de log2 de  $2^{\Delta Cq}$ . Quantificação celular mediante a técnica de imunohistoquímica.

Adicionalmente, a expressão de *TBX21/TBET* foi correlacionada positivamente com o número de células citotóxicas/mm<sup>2</sup> (CD8+, TIA1+ e GRZB+) (*P*<0,05), Anexo IV, Tabela S5.

Em relação aos genes associados ao *checkpoint* imune, a expressão de *BTLA* e *PDCD1* esteve correlacionada positivamente com o número de células CD8+/mm<sup>2</sup> (Rho=0,272 e Rho=0,297, respectivamente; P<0,05).

O número de células citotóxicas imaturas TIA1+/mm<sup>2</sup> foi diretamente correlacionado com os níveis de RNAm de *LAG3* (Rho=0,280), *CD274/PDL1* (Rho=0,276) e *BTLA* (Rho=0,260) (P<0,05). Já o número de células GRZB+/mm<sup>2</sup> foi correlacionado com os níveis de expressão de *HAVCR2/TIM3* (Rho=0,395, P<0,001) e *CD274/PDL1* (Rho=0,301, P=0,012), Anexo IV, Tabela S5.

Visando entender se os níveis de expressão de genes associados a um perfil inflamatório, genes associados ao *checkpoint* imune, assim como os fatores de transcrição *TBX21/TBET* e *EOMES* estariam associadas ao número de células GRZB+, uma modelagem através de análises de PLSR (regressão de mínimos quadrados parciais) foi desenvolvida, utilizando o log10 do número de células GRZB+ como variável indicadora. Todos os genes colocados no modelo foram correlacionados positivamente com as células citotóxicas, com

exceção do *IFNG* que mostrou um peso relativo próximo de 0, sendo *CXCL10*, *TBX21/TBET* e *CD274/PDL1* os que apresentaram os maiores valores (Fig. 4.10).



**Figura 4.10:** Gráfico de barras mostrando o peso relativo de genes avaliados por RT-qPCR com o número de células granzima B positivas (log10 de células GRZB+). O peso de cada variável na quantidade de células GRZB+ foi calculado por regressão de mínimos quadrados parciais (PLSR).

#### 4.2.5 Impacto clínico da expressão de genes do checkpoint imune

A Tabela 4.6 apresenta os resultados das associações entre os níveis de expressão de genes relacionados ao *checkpoint* imune e as SLP ou SG do grupo estudado. Para isto, inicialmente os pacientes foram classificados segundo o nível de expressão gênica (alto ou baixo), utilizando dois *cutoffs*, os níveis de expressão do percentil 25 e do percentil 50. Com esta abordagem, a expressão do gene *HAVCR2/TIM3* maior ou menor que o percentil 25 teve impacto na SLP dos pacientes. Não houve associações significativas adicionais entre os níveis de expressão de outros genes relacionados ao *checkpoint* imune e as SLP ou SG.

Ponto de corte >percentil 25%							Ponto de corte >percentil 50%							
Como	Número	SLP	Média	<i>P</i> -	HR	Intervalo o	le confiança	Número	SLP	Média meses	<i>P</i> -	HR	Intervalo de confiança	
Gelle	eventos	(%)	meses	valor		(9	5%)	eventos	(%)		valor		(95	5%)
						Inferior	Superior						Inferior	Superior
BTLA														
Alta	11/54	79,6	97,21	0,303#				8/35	77,1	82,62	0,927#			
Baixa	5/16	68,8	72,87	0,267£	0,55	0,21	1,65	8/35	77,1	94,23	0,925£	0,95	0,36	2,52
CTLA4														
Alta	13/52	75,0	91,98	0,414#				7/35	80,0	95,88	0,538#			
Baixa	3/18	83,3	94,27	0,487£	1,49	0,51	5,79	9/35	74,3	91,13	0,545£	0,74	0,27	1,94
HAVCR2/TIM3														
Alta	17/61	72,1	89,79	0,042#				12/42	71,4	82,68	0,184#			
Baixa	1/18	94,4	121,94	0,037£	4,28	1,08	38,76	6/37	83,8	109,46	0,277£	1,66	0,67	4,37
LAG3														
Alta	13/51	74,5	85,13	0,445#				5/33	84,8	94,43	0,130#			
Baixa	3/19	84,2	100,42	0,526£	1,44	0,49	5,59	11/37	70,3	87,26	0,138£	0,47	0,16	1,26
PDCD1														
Alta	4/18	76,9	92,87	0,965#				7/36	80,6	84,89	0,479#			
Baixa	12/52	77,8	94,33	0,925£	0,95	0,34	3,15	9/34	73,5	90,56	0,484£	0,71	0,26	1,86
CD274/PD1L														
Alta	13/52	75,0	92,97	0,984#				8/33	75,8	91,30	0,771#			
Baixa	3/18	83,3	94,28	0,906£	0,94	0,34	3,11	8/37	78,4	95,98	0,764£	1,16	0,44	3,05
TBX21/TBET														
Alta	13/52	75,0	85,26	0,495#				8/34	76,5	82,18	0,975#			
Baixa	3/18	83,3	100,17	0,586£	1,37	0,47	5,31	8/36	77,8	94,31	0,974£	1,02	0,38	2,68
EOMES														
Alta	12/51	76,5	93,63	0,804#				7/32	78,1	78,55	0,846#			
Baixa	4/19	78,9	94,00	0,903£	1,07	0,39	3,55	9/38	76,3	93,48	0,865£	0,92	0,34	2,40

**Tabela 4.6:** Sobrevida livre de progressão (SLP) de acordo aos níveis de expressão de genes relacionados ao *checkpoint* imune em pacientes pediátricos diagnosticados com linfoma de Hodgkin clássico

Cada paciente foi categorizado pelos valores do percentil 25 ou 50 do grupo total para cada gene avaliado. # *P*-valor calculado pelo teste de *log-rank*. £ *P*-valor e razão de chance (HR, do inglês: *hazard ratio*) calculado com a estratégia de correção de *Firth*.

A análise dos padrões de expressão de *HAVCR2/TIM3* mostrou uma distribuição não homogênea no grupo de pacientes com LHc, com alguns pacientes apresentando níveis muito baixos do RNAm (Fig. 4.11).



Figura 4.11: Gráfico *scatter plot* referente aos níveis de RNAm de *HAVCR2/TIM3* em pacientes pediátricos com linfoma de Hodgkin clássico. Cada círculo representa um paciente avaliado. A linha tracejada representa o percentil 25% (log2 de  $2^{\Delta Cq}$ =-8,053) da expressão do grupo total. Expressão relativa em valores de log2 de  $2^{\Delta Cq}$ .

O percentil 25 (log2 de  $2^{\Delta Cq} <-8,053$ ), usado como ponto de corte na expressão de *HAVCR2/TIM3* identifica um grupo com valores não superpostos de casos: aqueles com baixa expressão (n=20) e aqueles com alta expressão (n=66). Uma melhor SLP foi observada nos pacientes que apresentavam baixa expressão de *HAVCR2/TIM3* (94,4%: 18/79) *vs*. nos que apresentaram alta expressão (72,1%: 61/79) (*P*=0,042, teste de *log-rank;* HR: 4,28, IC 95%: 1,08-38,76), como evidenciado na Fig. 4.12A.

Não foram observadas diferenças significativas nas variáveis clínicas ou epidemiológicas entre os grupos classificados pela expressão de *HAVCR2/TIM3*.

Dado que o número de células GRZB+ no MAT é considerado um biomarcador imune consistentemente associado ao prognóstico desfavorável em diversos estudos (KELLEY *et al.*, 2007; SCHRECK *et al.*, 2009), incluindo o nosso com LHc pediátrico (BARROS *et al.*, 2012), e em vista da correlação direta observada entre o número de células GRZB+/mm<sup>2</sup> e a expressão gênica de *HAVCR2/TIM3*, ambos os dados foram integrados para classificar os pacientes com base nestas duas variáveis.

Utilizando os pontos de corte >percentil 25 tanto para a expressão gênica de *HAVCR2/TIM3* quanto para as células GRZB+/mm<sup>2</sup>, pacientes que apresentaram as duas variáveis aumentadas mostraram uma pior SLP (67,4%: 43/71), quando comparados com os

pacientes que apresentavam uma única variável de risco (84,2%: 19/71) ou nenhuma das variáveis de risco aumentadas (100,0%: 9/71). Esta análise exibiu valores de significância *borderline* (*P*=0,055, teste de *log-rank*; HR: 2,97, IC 95%: 1,23-10,28), provavelmente devido ao baixo número de casos em cada um dos três grupos (Fig. 4.12B); porém, a distribuição das probabilidade de sobrevida observada nas curvas de *Kaplan-Meier* nos faz propor esta associação como promissora na identificação de grupos de pacientes com probabilidades alta, media e baixa de recaída.



**Figura 4.12: Curva de** *Kaplan-Meier***, probabilidade de sobrevida livre de progressão no grupo de pacientes pediátricos com linfoma de Hodgkin clássico.** A: Pacientes categorizados de acordo com a expressão gênica de *HACVR2/TIM3*; B: Pacientes categorizados utilizando a combinação do percentil 25 da expressão gênica *HACVR2/TIM3* e do número de células GRZB+/mm<sup>2</sup>. No eixo "X" encontra-se o número de pacientes em risco para cada categoria ao longo do tempo. SLP: sobrevida livre de progressão.

## 4.2.6 Fatores de transcrição *EOMES* e *TBX21/TBET* associados à resposta terapêutica em pacientes pediátricos com linfoma de Hodgkin clássico

Devido à estreita relação entre os fatores de transcrição *EOMES* e *TBX21/TBET* e a diferenciação dos linfócitos T, e seu papel no balanço entre a função efetora e o estado celular exausto (PALEY *et al.*, 2012), foi construída uma razão entre a expressão de *EOMES* e *TBX21*, utilizando como ponto de corte uma razão  $\geq 1,5$  ou  $\geq 2,0$ ; que indica um predomínio da expressão de *EOMES* sobre *TBX21*  $\geq 1,5$  vezes ou  $\geq 2,0$  vezes. Os pacientes foram categorizados utilizando estes pontos de corte. Pacientes que apresentaram uma razão  $\geq 1,5$  *EOMES/TBX21* foram associados a uma pior SLP (60,0%: 30/70) quando comparados com aqueles que exibiram uma razão <1,5 (90,0%: 40/70) (*P*=0,002, teste de *log-rank*; HR 4,78, IC 95% 1,73-15,91). Esta associação foi mais evidente quando utilizada a razão  $\geq 2,0$  (56,0%: 25/70 *vs.* 88,9%: 45/70; *P*=0,001, teste de *log-rank*; HR 4,86, IC 95% 1,82-14,66) (Tabela 4.7 e Fig. 4.13).

<i>EOMES/IBA21</i> em pacientes pediatricos com informa de Hodgkin classico									
Dazão	Número	SLP	Média	<i>P</i> -	HR	Intervalo de confiança (95%)			
Kazao	eventos	(%)	meses	valor					
						Inferior	Superior		
≥1,5 EOMES/TBX21								•	
Alta	12/30	60,0	71,07	0,002#					
Baixa	4/40	90,0	108,06	0,002£	4,78	1,73	15,91		
≥2,0 EOMES/TBX21									
Alta	11/25	56,0	67,56	0,001#					
Baixa	5/45	88,9	106,62	0,001£	4,86	1,82	14,66		

**Tabela 4.7:** Sobrevida livre de progressão (SLP) de acordo as razões dos níveis de expressão *EOMES/TBX21* em pacientes pediátricos com linfoma de Hodgkin clássico

# *P*-valor calculado pelo teste de *log-rank*. £ *P*-valor e razão de chance (HR, do inglês: *hazard ratio*) calculado mediante a estratégia de correção de *Firth*.



Figura 4.13: Curva de *Kaplan-Meier*, probabilidade de sobrevida livre de progressão segundo a razão da expressão gênica de *EOMES/TBX21* no grupo de pacientes pediátricos com linfoma de Hodgkin clássico. A: razão maior que 1,5; B: razão maior que 2,0. No eixo "X" se encontra o número de pacientes em risco para cada categoria ao longo do tempo. SLP: sobrevida livre de progressão.

O ponto de corte para a razão de *EOMES/TBX21* usado foi validado mediante curva ROC, em que foi obtido o valor de 1,585 com uma sensibilidade de 71,4% e especificidade de 70,6% (Anexo V). Não houve impacto das razões *EOMES/TBX21* na SG.

Em análises multivariadas, considerando as variáveis clínicas e do MAT com impacto na SLP nas análises univariadas, as razões de expressão de *EOMES/TBX21*  $\geq$ 1,5 e  $\geq$ 2,0 mantiveram o impacto prognóstico (HR: 5,99; IC 95% 1,61-23,40; *P*=0,005, e HR: 4,14; IC 95% 1,36-76,45; *P*=0,012, respectivamente) como mostrado na Tabela 4.8.

		Intervalo de co	tervalo de confiança (95%)				
Variáveis	HR (β)	Inferior	Superior	P-valor			
Subtipo celularidade mista	4,563	1,296	15,882	0,019			
Sítios extranodal	8,942	2,292	34,031	0,002			
Células GRZB+/expressão de HAVCR2	5,323	1,089	73,055	0,037			
Razão <i>EOMES/TBX21</i> ≥1,5	5,999	1,614	23,404	0,005			
Subtipo celularidade mista	3,962	1,146	13,428	0,030			
Sítio extranodal	7,903	2,042	29,561	0,004			
Células GRZB+/expressão de HAVCR2	6,464	1,182	15,004	0,028			
Razão <i>EOMES/TBX21</i> ≥2,0	4,143	1,362	76,455	0,012			

**Tabela 4.8**: Análise multivariada de sobrevida livre de progressão (SLP) usando o modelo de regressão de Cox, considerando as variáveis clínicas e os níveis de expressão gênica no grupo de pacientes pediátricos com linfoma de Hodgkin clássico

Esta análise multivariada foi realizada num grupo de 60 pacientes. *P*-valor e razão de chance (HR, do inglês: *hazard ratio*) calculado com a estratégia de correção de *Firth*. Células GRZB+/expressão de *HAVCR2*: pacientes com um aumento (>percentil 25) das variáveis da expressão gênica de *HAVCR2/TIM3* e células GRZB+ quantificadas no microambiente tumoral. Estes resultados representam dois modelos testados independentemente.

Este grupo de resultados deu origem a um manuscrito, atualmente em processo de submissão intitulado: "*TIM3 expression and TBET/EOMES expression ratios are correlated with Granzyme B+ lymphocyte number and impact on the therapeutic response in pediatric patients with classical Hodgkin lymphoma*" por <u>Gabriela Vera-Lozada</u>, Paula Alves, Gerald Niedobitek, Mário Henrique M. Barros, Rocio Hassan.

#### 4.2.7 Discussão

Nas últimas décadas, diferentes imunoterapias com foco nos receptores inibitórios imunes vêm sendo aplicadas com resultados satisfatórios nos pacientes acometidos por diversos tipos de câncer (POSTOW; CALLAHAN; WOLCHOK, 2015; TOPALIAN; DRAKE; PARDOLL, 2015). No LHc, as células H-RS apresentam um aumento da expressão de PDL1 e PDL2 na superfície celular (GREEN *et al.*, 2010; GREEN *et al.*, 2012), permitindo a interação destas células com os linfócitos T intratumorais através do receptor PD1 (CHEMNITZ *et al.*, 2007; YAMAMOTO *et al.*, 2008; MUENST *et al.*, 2009). Alta expressão de CTLA4 também foi reportada nos linfócitos infiltrantes (VANDENBORRE *et al.*, 1998; GANDHI, 2006). Estes achados levaram à avaliação das terapias anti-PD1 (nivolumabe e pembrolizumabe) e anti-CTLA4 (ipilimumabe) na recaída da doença (ANSELL, 2015; BRÖCKELMANN; BORCHMANN; ENGERT, 2016; LULLA; HESLOP, 2016;

TSIRIGOTIS; SAVANI; NAGLER, 2016). O tratamento com nivolumabe mostrou 65% de taxa de resposta objetiva com 58% de remissão parcial e 7% de remissão completa (KASAMON *et al.*, 2017). O uso do tratamento com pembrolizumabe foi associado a uma taxa de resposta objetiva de 65% com 48% de remissão parcial e 16% de remissão completa (ARMAND *et al.*, 2016). Já no tratamento com ipilimumabe, os resultados foram inferiores aos descritos para anti-PD1, mostrando uma taxa de resposta objetiva de 33% com 1 resposta parcial (no total de 7 pacientes) (DAVIDS *et al.*, 2015). Nesta parte do estudo, realizamos análises de expressão gênica de moléculas associadas aos receptores inibitórios e dos fatores de transcrição *TBX21/TBET* e *EOMES* em pacientes pediátricos com LHc. Uma correlação direta entre as moléculas estudas e as células citotóxicas foi observada. Em relação à resposta terapêutica, alta expressão de *HAVCR2/TIM3* e em combinação com as células GRZB+, assim como a expressão de *EOMES* maior que a expressão de *TBX21/TBET* impactaram negativamente o tempo de sobrevida dos pacientes.

TIM3 é uma das principais moléculas no controle da resposta imune, cuja função é inibir a expressão de IFNG (FERRIS; LU; KANE, 2014). Este receptor inibitório é considerado um marcador de células exaustas CD8 em pacientes com infecção viral crônica (JONES et al., 2008; GOLDEN-MASON et al., 2009). A expressão de TIM3 também foi descrita em diferentes tipos de células como T CD8+, Th1, células dendríticas, entre outras, com um papel dual entre os mecanismos de promoção ou inibição da resposta imune, dependendo do modelo estudado (SAKUISHI et al., 2011; DU et al., 2017). Linfócitos T infiltrantes TIM3+ no MAT de diferentes linfomas não-Hodgkin foram associados a pior resposta terapêutica e estadiamentos avançados da doença (YANG et al., 2012; XIAO et al., 2014; ZHANG et al., 2015). Em consonância com o descrito no linfoma não-Hodgkin, descrevemos pela primeira vez a associação entre expressão de HAVCR2/TIM3 e desfecho clínico no LHc. No nosso grupo de pacientes pediátricos, alta expressão de HAVCR2/TIM3 foi associada a uma pior resposta terapêutica, levantando a ideia de HAVCR2/TIM3 ser uma molécula com função supressora importante neste linfoma. Um estudo por imunohistoquímica está em curso para determinarmos quais são as populações que expressam esta molécula no MAT.

Mais ainda, a correlação entre a expressão de *HAVCR2/TIM3* e número de células expressando GRZB alerta para a necessidade de investigar se estas moléculas estariam sendo expressas pela mesma célula, o que forneceria uma pista inicial sobre a natureza das células expressando o marcador citotóxico, que poderiam se tratar de células exaustas. Estudos por

imunofluorescência dupla e microscopia confocal em tecido tumoral ao diagnóstico ajudarão a responder esta questão.

Se confirmada a associação entre TIM3 e prognóstico em estudos independentes, esta molécula poderia ser considerada como futuro alvo terapêutico no LHc. A administração conjunta de anti-TIM3 e anti-PD1 tem gerado resultados promissores na recuperação da função efetora nos linfócitos de pacientes com melanoma e câncer colorretal (FOURCADE *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2016). Além disso, os padrões não sobrepostos de expressão do RNAm de *TIM3* no LHc, em que pacientes exibem ou baixos ou altos níveis, apontam para o potencial desta molécula como biomarcador prognóstico.

Em relação a outras moléculas inibitórias, no presente estudo não encontramos associações significativas, em contraposição a um estudo que encontrou alta expressão de PD1L e PD2L nas células H-RS, determinada por imunohistoquímica, correlacionada com prognóstico desfavorável (ROEMER *et al.*, 2016). As diferenças metodológicas podem ser responsáveis por esta discrepância. No entanto no presente trabalho, encontramos uma correlação positiva entre a expressão de PDL1 e o número de células citotóxicas expressando TIA1+ e GRZB+, confirmando uma associação descrita em um trabalho prévio (MENTER *et al.*, 2016), o que reforça a ideia de da associação funcional entre moléculas inibitórias e a presença de células citotóxicas no MAT.

EOMES e TBET são dois fatores de transcrição com um papel muito importante na diferenciação T efetora e de memória, assim como na diferenciação terminal das células NK (KAECH; CUI, 2012; KNOX *et al.*, 2014; SIMONETTA; PRADIER; ROOSNEK, 2016). Além disso, estes dois fatores de transcrição, em conjunto com a expressão de PD1 foram utilizados para descrever dois tipos de células exaustas em modelos animais, mostrando que não todos os linfócitos CD8 exaustos apresentam capacidade de reverter sua função: i) Tbet<sup>hi</sup>PD1<sup>int</sup> possuem a capacidade de recuperar a função efetora através de bloqueio; ii) Eomes<sup>hi</sup>PD1<sup>hi</sup>, encontram-se numa fase de diferenciação terminal (PALEY *et al.*, 2012; PAUKEN; WHERRY, 2015b).

Os resultados em um modelo animal muito estudado nos levaram a escolher estes dois genes para estudar sua expressão no LHc, e os resultados da análise da sua expressão no conjunto de células do MAT (uma vez que não podíamos identificar a fonte das células de onde a expressão era oriunda) foram surpreendentes. A associação de altos níveis de *EOMES* em relação a *TBET* com prognóstico desfavorável permite nos questionar se altos níveis de

*EOMES* observados estariam associados à existência de uma subpopulação celular linfoide em fase terminal de exaustão imune, com possibilidades diminuídas de exercer uma resposta imune antitumoral.

A validação destas moléculas como marcadores terapêutico e prognóstico, é de extrema importância na identificação de pacientes que se beneficiariam de anticorpos direcionados a moléculas do *checkpoint* imune, sobretudo considerando-se o tratamento em primeira linha. Estudos para melhor caracterizar as células que expressem EOMES devem ser realizados no LHc, assim como seu possível papel no controle do EBV, já que um trabalho mostrando o balanço destas moléculas em pacientes transplantados com órgãos sólidos esteve associada ao controle da infecção por citomegalovírus (POPESCU *et al.*, 2014).

A expressão de genes relacionados aos receptores inibitórios imunes não é limitada às células exaustas, senão que estas moléculas podem ser expressas pelos linfócitos T CD8 durante a resposta imune, atuando no controle da autorreatividade celular (APPAY *et al.*, 2008; FUERTES MARRACO *et al.*, 2015; WHERRY; KURACHI, 2015; ZAMARIN; POSTOW, 2015). O fato de não conseguirmos diferenciar a expressão proveniente de células recém-ativadas das que apresentam o fenótipo exausto é uma limitante deste estudo, uma vez que a expressão gênica foi realizada no conjunto de células que compõe o MAT, e não de células com características específicas. Apesar desta limitação, os resultados observados em nosso grupo de pacientes nos permite hipotetizar, pela primeira vez no LHc, que mecanismos de supressão estão sendo dirigidos pelo balanço dos fatores de transcrição EOMES e TBX21 no MAT.

Adicionalmente, deve ser considerado que estas moléculas mostram um papel fisiológico no controle da autorreatividade celular (CHEN, 2004; CHEN; FLIES, 2013); desta maneira, tratamentos que as tenham como alvos devem ser aplicados com precaução para assim evitar que na reconstituição da resposta antitumoral, ative-se uma doença autoimune, já que as terapias não são tecido-específicas.

No modelo de melanoma foi descrito que o bloqueio da via PD1-PDL1 tem um efeito maior nos linfócitos intratumorais, enquanto que as terapias anti-CTLA4 resultam na geração de uma resposta antitumoral proveniente de células T periféricas (KVISTBORG *et al.*, 2014; SPRANGER *et al.*, 2014). Um acompanhamento das células expressando os receptores do *checkpoint* imune poderia ser realizado ao longo do tratamento dos pacientes com LHc,

visando conhecer possíveis mudanças na composição celular e suas implicâncias na resposta terapêutica.

Uma diminuição da função efetora causada pelo estado celular exausto não se deve unicamente à superexpressão de uma ou várias moléculas inibitórias (como PD1), senão que envolve um conjunto de características como o estado funcional de diferenciação (DOERING *et al.*, 2012), um perfil metabólico específico (BENGSCH *et al.*, 2016) e um programa de expressão gênica (PAUKEN; WHERRY, 2015; SEN *et al.*, 2016). A utilização de imunoterapias combinadas devem ser consideradas para conseguir a recuperação funcional das células exaustas.

Apesar da limitação imposta pelo número de pacientes, nesta parte do trabalho os resultados indiretos vindos da expressão gênica e o impacto mostrado na sobrevida nos permitem propor a hipótese de que as células efetoras presentes no MAT estariam sofrendo a perda parcial/total de sua função, o que explicaria parcialmente a associação de células citotóxicas ao prognóstico negativo da doença. Estudos que foquem na identificação de células citotóxicas expressando os receptores inibitórios imunes através de imunomarcação, sua localização no tumor e do estado funcional destas se fazem necessários para confirmar esta hipótese.

### 4.3 Variantes genéticas no gene *CTLA*4 e níveis de expressão em pacientes pediátricos com linfoma de Hodgkin clássico

CTLA4 (CD152) é um membro da família CD28 expresso nos linfócitos T como receptor inibitório. Fisiologicamente atua como sinal inibitório após a ativação celular competindo com CD28 pela ligação a CD80 e CD86 nas células apresentadoras de antígenos (CHEN; FLIES, 2013). Dois polimorfismos no gene *CTLA4*, os SNPs rs231775 (+49 A>G) e o rs3087243 (CT60 G>A), foram descritos na literatura com efeitos funcionais importantes, amplamente validados (ANJOS, 2002; UEDA *et al.*, 2003). A presença do alelo A tanto nas posições +49 como na CT60, assim como o haplótipo +49A/CT60A foram associadas com um alto poder inibitório, aumentando o limiar de ativação de células T (SCALAPINO; DAIKH, 2008). Os polimorfismos também foram descritos como modulando a produção da isoforma solúvel da molécula (UEDA *et al.*, 2003). A nível transcripcional, duas isoformas tem sido descritas para *CTLA4*: i) a completa (*flCTLA4*: do inglês, *full lenght*), caracterizada por um RNAm de 4 exons e, ii) a solúvel (*sCTLA4*) originada por *splicing* alternativo em que falta o exon 3 (OAKS *et al.*, 2000).

Devido a importância das interações entre células no MAT, avaliamos estes polimorfismos, no grupo de pacientes com LHc, e sua correlação com os níveis de expressão das isoformas *flCTLA4* e *sCTLA4* e com a resposta clínica.

Do grupo total de pacientes pediátricos diagnosticados com LHc, o polimorfismo na posição +49 no gene *CTLA4* foi avaliável em 95 casos, enquanto que a posição CT60 foi possível de ser estudada em 90 casos. Os genótipos do SNP +49 e CT60 se encontravam em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (*P*>0,05, teste de  $\chi^2$ ). Na posição +49, a frequência alélica observada para o alelo A (selvagem) foi de 0,7 e para o alelo G (mutante) de 0,3, em que o genótipo AA apresentou a maior frequência com 46,3% (44/95) seguido do AG com 40,0% (38/95) e do GG com 13,7% (13/95). Em relação à posição CT60, o alelo G (selvagem) mostrou uma frequência alélica de 0,6 e o alelo A (mutante) de 0,4, o genótipo GG foi observado em 40,0% (36/90), a presença do genótipo AG em 43,3% (39/90) e o genótipo AA em 16,7% (15/90) dos casos (Anexo IV, Tabela S8).

Análise de desequilíbrio de ligação foi realizada utilizando o *software Haploview* em que foram obtidos os valores de D'=0,718; LOD=4,63 e  $r^2$ =0,166, mostrando que os dois polimorfismos se encontram em desequilíbrio de ligação, sendo segregados juntos em 71,8% das vezes. Em 89 casos foi possível a reconstrução dos haplótipos para os dois polimorfismos

avaliados no gene *CTLA4* através do *software* PHASE, cujas frequências se encontram descritas no Anexo IV, Tabela S6.

Em referência aos níveis de expressão das isoformas de *CTLA4* e para evitar o sinal negativo em futuras análises, os valores foram expressos como  $2^{\Delta Cq}$ . Considerando que os níveis de expressão gênica das isoformas não apresentaram uma distribuição normal, análises não paramétricas foram efetuadas. A isoforma *flCTLA4* foi majoritariamente expressa nos casos com LHc e em níveis maiores do que a isoforma *sCTLA4* (mediana  $\pm$  amplitude interquartil: 2,506  $\pm$  3,268 e 0,019  $\pm$  0,068, respectivamente). A razão entre as isoformas foi calculada como (*sCTLA4/flCTLA4*), mostrando uma mediana de 0,008  $\pm$  0,029 no grupo total. Não foi observada uma associação entre as variantes genéticas e os níveis de expressão das duas isoformas de *CTLA4*.

#### 4.3.1 Polimorfismos no gene CTLA4 associados às características clínicas

No grupo de 49 pacientes portadores do haplótipo +49A/CT60A (menor ativação de linfócitos T), foi observada uma associação a um maior número de casos classificados com risco desfavorável (estadiamento IIB, IIIB, IV com sintomas B) quando comparado ao grupo favorável (63,3%; 31/49 *vs.* 36,7%; 18/49, P=0,009; teste de  $\chi^2$ ). Não houve outras associações significativas.

## 4.3.2 Polimorfismos no gene *CTLA4* e níveis de expressão das isoformas moleculares na modulação do microambiente tumoral

Visando entender se as variantes genéticas estavam associadas às diferentes subpopulações linfocitárias no MAT, análises foram realizadas categorizando os pacientes segundo o percentil 50 do número de células quantificadas no grupo total. Em um grupo de 81 pacientes, a presença do genótipo CT60GG foi associada com um maior número de células citotóxicas CD8+ [>percentil 50: 64,7% (22/34) *vs.* <percentil 50: 35,3% (12/34); *P*=0,019, teste de  $\chi^2$ ], em contraste com o observado para o haplótipo +49A/CT60A que foi associado a um menor número de CD8+ [>percentil 50: 37,8% (17/45) *vs.* <percentil 50: 62,2% (28/45); *P*=0,020, teste de  $\chi^2$ ]. Além disso, o genótipo CT60AA foi associado a um menor número de cD20+ (23,1%: 3/13 *vs.* 76,9%: 10/13; *P*=0,037, teste exato de *Fisher*), Tabela 4.9.

Variável categórica	Genótipo +49		Genótipo CT60		Haplótipo		Haplótipo		Razão sCTLA4/flCTLA4	
	AA	GG+AG	GG	AA+AG	+49A/CT60A	Outro	+49G/CT60G	Outro	Alta	Baixa
CD8+										
$\geq$ Percentil 50 (143 cél/mm <sup>2</sup> )		NS	22/34 (64,7)*	18/47 (38,3)	17/45 (37,0)*	23/36 (63,9)	NS		Ν	IS
< Percentil 50 (143 cél/mm <sup>2</sup> )			12/34 (35,3)	29/47 (61,7)	28/45 (63,0)	13/36 (36,1)				
FOXP3+/CD8+										
≥1,5		NS	5/13 (38,5)*	29/62 (46,8)	NS	S	NS		Ν	IS
< 1,5			8/13 (61,5)	33/62 (53,2)						
FOXP3+/TBET+										
≥1,5		NS	NS	5	NS	S	NS		14/32 (43,7)	20/29 (69,0)*
< 1,5									18/32 (56,3)	9/29 (31,0)

**Tabela 4.9:** Associações significativas entre as variantes genéticas no gene *CTLA4* e os diferentes subtipos celulares quantificados no do microambiente tumoral em pacientes pediátricos com linfoma de Hodgkin clássico.

Valor de *P* calculado pelo teste de  $\chi^2$ . No caso de que algum cubículo apresentasse <5 casos foi utilizados o teste de Fisher. \* *P*< 0,05. NS: resultado não significativo; cél: células.

Para avaliar a relação entre genótipos/haplótipos e perfis celulares supressor/próinflamatório no MAT foram estabelecidas razões usando como ponto de corte  $\geq$ 1,5, em que as células FOXP3+ e MAF+ foram consideradas como supressoras e as células CD8+ e TBET+ foram consideradas como pro-inflamatórias, a razão  $\geq$ 1,5 corresponderia à quantificação de células supressoras  $\geq$ 1,5 vezes quando comparadas às células pró-inflamatórias no MAT. Adicionalmente uma relação entre linfócitos FOXP3+ e linfócitos B (CD20+) foi realizada.

Em um grupo de 82 pacientes, o genótipo +49GG foi associado a uma relação FOXP3+/CD8+ $\geq$ 1,5 [ $\geq$ 1,5: 5/13 (38,5%) *vs.* <1,5: 8/13 (61,5%%), *P*=0,025; teste de  $\chi^2$ ) (Tabela 4.9). Não houve uma associação estatisticamente significativa entre as outras razões celulares analisadas, assim como para as isoformas do *CTLA4*.

Com estes resultados foi possível evidenciar preliminarmente que as variantes genéticas associadas a um alto poder inibitório se encontram também associadas a um perfil supressor, em contraste com as variantes relacionadas a um maior poder de ativação de linfócitos T, que mostraram associação com um perfil inflamatório.

# 4.3.3 Níveis de expressão das isoformas do gene *CTLA4* associados à resposta terapêutica em pacientes pediátricos com linfoma de Hodgkin clássico

A expressão das isoformas de *CTLA4* foi categorizada em alta ou baixa usando o valor da mediana de quantificação do grupo total (*flCTLA4*: 2,506, *sCTLA4*: 0,019 e *sCTLA4/flCTLA4*: 0,008).

Pacientes com alta expressão de *sCTLA4* mostraram um menor tempo de SLP quando comparados aos que apresentavam baixa expressão (66,7%: 33/65 vs. 90,6%: 32/65; P=0,035, teste de *log-rank*; HR 3,25, IC 95% 1,07-12,79). Quando as análises foram desenvolvidas categorizando os pacientes utilizando o valor da mediana da razão das isoformas, pacientes que apresentavam uma razão >0,008 mostraram um menor tempo de SLP (65,7%: 35/65 vs. 93,3%: 30/65; P=0,012, teste de *log-rank*; HR 4,57, IC 95% 1,37-23,41) (Tabela 4.10 e Fig. 4.14). Diferenças significativas não foram observadas em relação aos níveis de *flCTLA4*. Os níveis de RNAm das isoformas ou suas razões não impactaram na SG.

O ponto de corte para a expressão de *sCTLA* e a razão de *sCTLA4/flCTLA4* utilizado foi validado mediante curva ROC (Anexo V), obtendo o valor de *sCTLA4=*0,039 com sensibilidade de 71,4% e especificidade de 72,5%. Já para a razão *sCTLA4/flCTLA4*, o ponto de corte foi 0,014 com sensibilidade de 78,6% e especificidade de 68,6%. A associação tanto

da isoforma *sCTLA4* como a razão com o tempo SLP foi mais evidente quando utilizada estes pontos de corte (*sCTLA4*: 58,3%: 24/65 vs. 90,2%: 41/65; *P*=0,004, teste de *log-rank*; HR 4,45, IC 95% 1,55-15,08 e *sCTLA4/flCTLA4*: 60,7%: 28/65 vs. 91,9%: 37/65; *P*=0,005, teste de *log-rank*; HR 4,65, IC 95% 1,54-18,27).

Razão	Número eventos	SLP (%)	Média meses	<i>P-</i> valor	HR	Intervalo d (95	le confiança 5%)
					-	Inferior	Superior
flCTLA4							
Alta	7/35	80,0	95,88	0,501#			
Baixa	9/34	73,5	90,47	0,507 £	0,72	0,27	1,89
sCTLA4							
Alta	11/33	66,7	85,70	0,035#			
Baixa	3/32	90,6	105,78	0,037£	3,25	1,07	12,79
sCTLA4/flCTLA4							
Alta	12/35	65,7	84,45	0,012#			
Baixa	2/30	93,3	108,17	0,011£	4,57	1,37	23,41

**Tabela 4.10:** Sobrevida livre de progressão (SLP) de acordo aos níveis de expressão das isoformas de *CTLA4* em pacientes pediátricos com linfoma de Hodgkin clássico

# *P*-valor calculado pelo teste de *log-rank*. £ *P*-valor e razão de chance (HR, do inglês: *hazard ratio*) calculado mediante a estratégia de correção de *Firth*.



Figura 4.14: Curva de *Kaplan-Meier*, probabilidade de sobrevida livre de progressão segundo a expressão gênica das isoformas moleculares de *CTLA4* no grupo de pacientes pediátricos com linfoma de Hodgkin clássico. A: pacientes categorizados segundo o valor da mediana (0,019) da quantificação da isoforma solúvel (*sCTLA4*) no grupo total de pacientes; B: pacientes categorizados segundo o valor da mediana da razão entre a isoforma solúvel e *full lenght (sCTLA/flCTLA4)* (0,008) no grupo total de pacientes. No eixo "X" se encontra o número de pacientes em risco para cada categoria ao longo do tempo. SLP: sobrevida livre de progressão.

#### 4.3.4 Discussão

CTLA4 é uma molécula essencial no controle da ativação e proliferação celular imune, expressa de maneira constitutiva pelos linfócitos T reguladores (TEFT; KIRCHHOF;

MADRENAS, 2006) e foi o primeiro receptor inibitório considerado como alvo imunoterapêutico (PARDOLL, 2012; BOUTROS *et al.*, 2016). Dois polimorfismos no gene *CTLA4* (+49 e CT60) são muito estudados por influir nos níveis de RNAm, na isoforma solúvel e na ativação celular (KOUKI *et al.*, 2000; LIGERS *et al.*, 2001; ANJOS, 2002; UEDA *et al.*, 2003). A presença do alelo A nas posições +49 e CT60, assim como o haplótipo +49A/CT60A foram associados a uma diminuição do risco de doenças autoimunes; e por outro lado, a um risco aumentado para doenças tumorais (KRISTIANSEN; LARSEN; POCIOT, 2000; GOUGH; WALKER; SANSOM, 2005; SUN *et al.*, 2008; SUN *et al.*, 2009). Isto é devido a sua associação, confirmada funcionalmente, com um alto poder inibitório pelo incremento do limiar de ativação das células T (SCALAPINO; DAIKH, 2008). Neste estudo as variantes genéticas nas posições +49 e CT60 e os níveis de expressão das isoformas de RNAm do *CTLA4* foram avaliadas em pacientes pediátricos com LHc. A presença de um alelo A nas posições +49 e CT60 (menor ativação de linfócitos T) foram associadas a um menor número de células citotóxicas. Adicionalmente, alta expressão da isoforma solúvel de *CTLA4* foi relacionada a uma diminuição do tempo de sobrevida.

Pacientes portadores do haplótipo +49A/CT60A (menor ativação de linfócitos T) foram associados ao grupo de risco desfavorável, sugerindo que o *background* genético do indivíduo estaria influenciando a composição celular sistêmica do paciente. A presença de sintomas B e o estadiamento avançado na doença são algumas das variáveis utilizadas na classificação dos pacientes segundo o risco. O papel das citocinas e sua relação a esta categorização ainda não é muito clara, mas existem estudos mostrando uma relação entre interleucinas inflamatórias e presença de sintomas B (SKINNIDER; MAK, 2002; CASASNOVAS *et al.*, 2007; GAIOLLA *et al.*, 2011). Neste sentido, em um estudo realizado em células CD3 circulantes de pacientes com LHc, a alta expressão de CTLA4 foi correlacionada inversamente com a capacidade de proliferação e de produzir citocinas pro-inflamatórias (KOSMACZEWSKA *et al.*, 2002).

Estudos prévios mostraram que em pacientes adultos com LHc, um maior número de células T reguladoras comparadas com o número de células citotóxicas estava associado a um melhor prognóstico (ÁLVARO *et al.*, 2005; KELLEY *et al.*, 2007). Estas observações levaram à pergunta se variáveis genéticas estariam associadas aos níveis de *CTLA4* no MAT de pacientes com LHc, os quais estariam modulando e favorecendo perfis celulares locais.

Neste trabalho, não observamos associação entre a presença das variantes genéticas e os níveis das isoformas de *CTLA4*, em contraste com o relatado para outros tipos de doenças

(LIGERS *et al.*, 2001; UEDA *et al.*, 2003). A isoforma solúvel parece ser exclusivamente expressa por células hematopoiéticas (OAKS *et al.*, 2000), e é raramente detectada no soro de doadores saudáveis (ESPOSITO *et al.*, 2014; SIMONE *et al.*, 2014). Esta falta de associação poderia ser devida à alta complexidade celular presente no MAT em que diferentes subpopulações celulares poderiam ser capazes de expressar CTLA4 e suas isoformas em diferentes níveis.

Neste estudo realizado em pacientes pediátricos com LHc, as variantes genéticas +49GG e CT60GG, cuja função foi descrita na literatura como associadas a uma maior ativação de linfócitos T (KOUKI *et al.*, 2000; SUN *et al.*, 2008) foram relacionadas a um maior número de células citotóxicas no MAT. Em concordância com esta observação, o haplótipo +49A/CT60A foi relacionado a um menor número das mesmas. Apesar de que neste estudo não foram percebidas evidencias entre os genótipos e os níveis de RNAm de *flCTLA4* ou a isoforma solúvel, este resultado aponta que as variáveis genéticas ao nível celular poderiam ser capazes de influenciar a polarização celular no MAT, pelo menos ao nível quantitativo.

Um dos mecanismos descritos para a isoforma solúvel é a capacidade de se ligar a CD80/CD86, atuando como competidor de CD28, interferindo na ativação dos linfócitos T (OAKS *et al.*, 2000) e na proliferação e secreção de moléculas como IL10 e TGFB (SIMONE *et al.*, 2014). Neste estudo, altos níveis da *sCTLA4* foram associadas a um pior prognóstico, sugerindo que esta isoforma estaria sendo secretada no espaço extracelular, colaborando com o desenvolvimento de mecanismos supressores à resposta antitumoral, e possivelmente inibindo subpopulações celulares favoráveis a dita reposta.

Apesar de não existirem relatos de secreção da isoforma solúvel por parte das células H-RS, este poderia ser um dos mecanismos pro-tumorais, já que um aumento da secreção desta isoforma foi descrita em outros tipos de células neoplásicas (SIMONE *et al.*, 2012; LAURENT *et al.*, 2013). Por outro lado, não deve ser desconsiderada a possibilidade de uma regulação via mediadores solúveis por parte das células T reguladoras para com as subpopulações citotóxicas e não somente uma inibição célula-célula. A identificação da origem celular desta isoforma contribuiria para o entendimento do papel desta molécula na patogênese do LHc, além de permitir o desenvolvimento de novas imunoterapias.

Estes resultados são inéditos na literatura uma vez que estudos similares não foram publicados no LHc, mas consideramos que devem ser interpretados com cautela, confirmados em coortes independentes e com maior número de pacientes. Estudos das relações dos polimorfismos com populações T do sangue periférico e do MAT de pacientes com LHc, que incluam abordagens funcionais e de citometria de fluxo multiparamêtrica, poderiam testar as hipóteses advindas do presente estudo.

### 4.4 Perfis de expressão gênica e celulares associados ao vírus Epstein-Barr

Devido ao papel do EBV na patogênese do LHc e à possível modulação do MAT descrita para este vírus, neste capítulo serão mostrados resultados referentes a: i) análises da composição celular do MAT, ii) avaliação da expressão gênica de perfis moleculares relacionados aos perfis imunes e, iii) a procura de uma assinatura gênica que identifica o estado de exaustão nas células de pacientes com LHc em relação à presença viral.

### 4.4.1 Caracterização da associação entre linfoma de Hodgkin clássico e vírus Epstein-Barr

A identificação do EBV nas células tumorais foi realizada por meio de hibridização *in situ* através da detecção dos RNAs pequenos não transcritos *EBERs* e por imunohistoquímica para a oncoproteína viral LMP1. O EBV foi detectada em 42,4% (n=42/95) dos casos avaliados (Tabela 3.1 e Fig. 4.15). Quando o grupo de pacientes foi dividido pelo subtipo histológico, a presença do EBV foi associada a 68,2% (15/22) dos casos de celularidade mista (CM) e a 38,8% (26/67) dos casos de esclerose nodular (EN) (*P*=0,012, teste  $\chi^2$ ). O EBV foi detectado com maior frequência em pacientes com sexo masculino (M: 76,7%; 33/43 *vs*. F: 23,3%; 10/43; *P*=0,015). Não houve associação preferencial entre EBV e idade dos pacientes.



Figura 4.15: Detecção do vírus Epstein-Barr nas células Hodgkin e Reed-Sternberg (H-RS). A: Detecção dos RNAs não codificantes (EBERs), mediante hibridização *in situ* (ISH). Células H-RS associadas ao vírus Epstein-Barr mostraram marcação marrom escura no núcleo celular; B: Detecção da oncoproteína latente de membrana 1 (LMP1) mediante imunohistoquímica. Células neoplásicas expressando LMP1 apresentaram marcação marrom no citoplasma e membrana celular. As fotos apresentam um aumento de 400X.

# 4.4.1.1 Características do microambiente tumoral no linfoma de Hodgkin clássico associados ou não ao vírus Epstein-Barr

Os casos associados ao EBV mostraram um maior número de células citotóxicas (CD8+, EBV+:  $211 \pm 202$  células/mm<sup>2</sup> vs. EBV-: $117 \pm 139$  células/mm<sup>2</sup>; TIA1+:  $137 \pm 178$  células/mm<sup>2</sup> vs.  $52 \pm 92$  células/mm<sup>2</sup>; GRZB+  $30 \pm 69$  células/mm<sup>2</sup> vs.  $5 \pm 19$  células/mm<sup>2</sup>; P<0,01, teste de *Mann-Whitney*); células TBET+ ( $51 \pm 81$  células/mm<sup>2</sup> vs.  $29 \pm 35$  células/mm<sup>2</sup>; P=0,031) e macrófagos M1 (CD68+pSTAT1+:  $73 \pm 111$  células/mm<sup>2</sup> vs.  $32 \pm 71$  células/mm<sup>2</sup>), mostrando que a presença do EBV está associada a um perfil inflamatório no MAT (Fig. 4.17A).

Com a finalidade de refinar a análise da composição celular do MAT realizada em nosso grupo de pacientes pediátricos com LHc (BARROS *et al.*, 2012; BARROS *et al.*, 2015), que tem como limitante a utilização de uma abordagem uniparamétrica, buscamos utilizar a ferramenta CIBERSORT que permite inferir populações imunes a partir de dados de expressão gênica por microarranjo. Para tanto, utilizamos um conjunto de dados de LHc depositado em bancos públicos que apresentava disponibilidade do *status* EBV (grupo de validação) (CHETAILLE *et al.*, 2009).

Brevemente, como descrito pelos autores (CHETAILLE *et al.*, 2009), o subconjunto de dados GSE13996 estava composto por 64 casos com LHc, majoritariamente adultos, em que a EN foi o subtipo histológico mais frequente (65,6%; 42/64), seguido da CM (26,6%; 17/64). A associação com o EBV foi menor que no grupo de estudo (34,0%; 18/53 pacientes), o que é justificado pelo fato da origem geográfica dos pacientes deste grupo (França), Anexo IV, Tabela S7. Embora a presença do EBV foi observada em poucos casos (n=18), o vírus foi associado a um maior número de casos com o subtipo histológico CM (61,1%; 11/18) quando comparado à EN (38,9%; 7/18) (*P*<0,001; teste exato de *Fisher*).

No estudo GSE13996, a subpopulação com maior abundância dentro do MAT foi macrófagos M2 (mediana  $\pm$  amplitude interquartil: 11,52%  $\pm$  7,05), seguida dos linfócitos T CD8+ (10,51%  $\pm$  7,99) e células plasmáticas (9,49%  $\pm$  10,37) (Fig. 4.16).



**Figura 4.16: Quantificação celular relativa de 22 subpopulações imunes no microambiente tumoral no subconjunto de dados GSE13996 de pacientes com linfoma de Hodgkin clássico.** Cada *box plot* representa um subtipo celular imune. A barra dentro da caixa representa a mediana de expressão de cada subtipo celular, os limites da caixa à dispersão dos valores entre os quartis 25 e 75 e os extremos do gráfico o valor mínimo e máximo do conjunto de dados. A quantificação foi realizada a través do *software* CIBERSORT.

Visando uma primeira comparação, e com o objetivo de obter categorias comparativas e realizar uma abordagem similar às análises desenvolvidas por imunohistoquímica quantitativa em nosso grupo de pacientes pediátricos, os resultados das diferentes subpopulações foram inicialmente integrados, o total de células B foi formado pelas B *naïve* + memória, as células T CD4+ pelas *naïve* + de memória *resting* + memória ativada + folicular *helper* + reguladoras, as células NK pelas *resting* + ativadas e o total de macrófagos pela somatória dos M0 + M1 + M2.

Entretanto, como em nosso estudo de pacientes pediátricos a quantificação das células do MAT foi realizada quantitativamente (células/mm<sup>2</sup>) e no grupo de validação (GSE13996) foi realizada mediante quantificação celular relativa (%), apenas análises comparativas descritivas entre os grupos foram realizadas.

Os resultados do CIBERSORT validam o perfil inflamatório associado à presença do EBV, grupo em que foi observado um maior número de células T CD8+ (EBV+ vs. EBV-: 15,67%  $\pm$  7,81 vs. 8,68%  $\pm$  5,27; *P*=0,004) e macrófagos M1 (8,41%  $\pm$  11,94 vs. 2,45%  $\pm$  3,73; *P*=0,018). Adicionalmente, nessa análise, o grupo EBV+ mostrou um menor número de células T CD4+ totais que o EBV- (21,35%  $\pm$  9,19 vs. 34,11%  $\pm$  18,24; *P*=0,003) (Fig. 4.17B).

O uso do CIBERSORT permitiu estender a análise às subpopulações CD4. Dentro destas, foi possível também identificar um menor número das subpopulações T CD4+ *naïve*  $(0,81\% \pm 3,03 \text{ vs. } 3,78\% \pm 5,57; P=0,003)$ , T reguladoras  $(0,77\% \pm 1,35 \text{ vs. } 1,92\% \pm 3,89; P=0,036)$  e T foliculares *helper*  $(7,02\% \pm 4,72 \text{ vs. } 12,53\% \pm 13,34; P=0,031)$  nos casos EBV+ quando comparados com EBV- (Fig. 4.17B).



Figura 4.17: Quantificação celular das subpopulações imunes no microambiente tumoral de pacientes com linfoma de Hodgkin clássico segundo a presença do vírus Epstein-Barr. A: Coorte de estudo (pacientes pediátricos, quantificação absoluta por imunohistoquímica quantitativa); B: Coorte de validação (GSE13996, quantificação relativa mediante o uso do *software* CIBERSORT). Cada barra representa um subtipo celular imune. Os casos EBV positivos (EBV+) encontram-se representados pelas barras cinza; os casos EBV negativos (EBV-), pelas brancas. A barra representa à mediana da quantificação celular e a barra de dispersão a amplitude interquartil dos valores. P-valor obtido pelo teste de *Mann-Whitney*. \* P<0,05; \*\* P<0,01. EBV+: presença do vírus Epstein-Barr; EBV-: ausência do vírus Epstein-Barr; M1: macrófagos tipo M1; TFh: linfócitos T foliculares *helper*; Treg: linfócitos T reguladores.

O trabalho que analisou os perfis de expressão baseado nos resultados do GSE13996 foi um dos primeiros a descrever um perfil gênico inflamatório associado ao EBV, representado pelas vias "*IFNG*/resposta antiviral", assim como "histiócito/células T" (CHETAILLE *et al.*, 2009). No intuito de avaliar genes dessas vias nos casos por nós estudados, comparamos a expressão gênica de *IFNG*, *CXCL10*, *STAT1*, *STAT6* e *IL10* nos casos EBV+ e EBV-.

Os níveis de expressão gênica de *IFNG* foram maiores no grupo EBV+ (mediana  $\pm$  amplitude interquartil: -1,535  $\pm$  2,165 *vs.* -2,669  $\pm$  2,949, *P*=0,029, teste de *Mann-Whitney*). O gene *STAT1* também apresentou-se aumentado nos casos EBV+ (2,717  $\pm$  1,284 *vs.* 2,007  $\pm$  1,514, *P*=0,023), enquanto que o gene *STAT6* esteve diminuído (1,869  $\pm$  1,430 *vs.* 2,219  $\pm$  0,821, *P*=0,036) (Fig. 4.18). Estes resultados confirmam a associação do EBV com um perfil pro-inflamatório no grupo pediátrico estudado aqui. No entanto, não houve diferenças nos níveis de RNAm de *CXCL10* segundo a presença viral (*P*>0,05).



Figura 4.18: Análise dos níveis de expressão gênica de *IFNG*, *STAT1* e *STAT6* no grupo total de pacientes pediátricos diagnosticados com linfoma de Hodgkin clássico. A: Níveis de RNAm de *IFNG*; B: Níveis de RNAm de *STAT1*; C: Níveis de RNAm de *STAT6*. Cada triângulo representa um paciente vírus Epstein-Barr positivo (EBV+) avaliado, e cada losango um paciente vírus Epstein-Barr negativo (EBV-) avaliado. A barra mostra a mediana de expressão de cada gene do conjunto de dados. Expressão relativa em valores de log2 de  $2^{\Delta Cq}$ . n=número de casos em cada categoria.

## 4.4.2 Diferenças nos níveis de expressão de genes relacionados ao *checkpoint* imune segundo a presença do vírus Epstein-Barr

Visto que os casos de LHc EBV+ apresentaram um perfil celular e molecular de tipo inflamatório, e considerando que a análise apresentada na Seção 4.2.2 mostrou uma relação entre perfil de genes inflamatórios e expressão de genes do *checkpoint* imune, decidimos analisar a expressão destes genes comparando os casos EBV+ e EBV-.

A análise evidenciou níveis similares de expressão de RNAm de genes do *checkpoint* imune e dos fatores de transcrição *TBX21/TBET* e *EOMES* nos grupos EBV+ e EBV- (todos os P>0,05). Chamou a atenção a ampla faixa de distribuição dos níveis de expressão de *HAVCR2/TIM3* nos casos EBV+ (Fig. 4.19).

A expressão de PD1 nos linfócitos infiltrantes foi maior nos casos EBV-, porém sem significação estatística devido à ampla distribuição dos dados (EBV+ mediana  $\pm$  amplitude interquartil: 5  $\pm$  52 células/mm<sup>2</sup> vs. EBV-: 14  $\pm$  40 células/mm<sup>2</sup>; *P*=0,779).

Estes resultados em conjunto com os previamente expostos neste trabalho sugerem que o estado de exaustão opera no LHc como neoplasia, independente da presença viral, e que, de haver diferenças nas vias e mediadores da exaustão, esta não seria evidenciada na expressão dos genes do *checkpoint* imune investigados neste trabalho. Estes resultados nos levaram para a próxima etapa.



Figura 4.19: Níveis de expressão gênica de moléculas associadas ao *checkpoint* imune e dos fatores de transcrição *TBX21/TBET* e *EOMES* segundo a presença do vírus Epstein-Barr (EBV) no grupo de pacientes pediátricos diagnosticados com linfoma de Hodgkin clássico (LHc). Cada *box plot* representa a distribuição dos níveis de expressão dos diferentes genes avaliados no grupo de pacientes. *Box plot* cinzas e brancos representam os casos EBV positivos (EBV+) e EBV-, respectivamente. A barra dentro da caixa representa a mediana da expressão gênica, os limites da caixa à dispersão dos valores entre os quartis 25 e 75 e os extremos do gráfico o valor mínimo e máximo do conjunto de dados. Expressão relativa em valores de log2 de  $2^{\Delta Cq}$ .

## 4.4.3 Na busca de uma assinatura de expressão gênica do estado de *exaustão* celular associado ao vírus Epstein-Barr

## 4.4.3.1 Proposta de uma assinatura gênica relacionada ao estado de exaustão nos linfócitos T citotóxicos CD8 positivos

Nesta parte do trabalho, tivemos o objetivo de avaliar se existe uma assinatura gênica de exaustão imune possivelmente vinda da estimulação pelo EBV, utilizando uma abordagem multidimensional.

Para tanto, tomamos como modelo a exaustão imune após estimulação realizada com o vírus LCMV clone 13 em camundongos, que até o momento é considerado o modelo melhor caracterizado do fenômeno de exaustão. Análises bioinformáticas foram desenvolvidas utilizando dados de expressão gênica de células T CD8+ provenientes deste modelo.
A assinatura gênica foi obtida por comparação subtrativa de dados de microarranjo de linfócitos T CD8+ exaustos (dia 30) *vs.* CD8+ *naïve* (dia 0). Foram identificados 483 genes diferencialmente expressos nas células exaustas (*fold change*>2 e FDR<0,05). Destes, 392 genes tiveram homologia com genes humanos, que representaram a assinatura do estado celular de exaustão nos linfócitos T CD8+ (Anexo VI).

Alguns dos genes identificados foram relacionados ao perfil de citocinas e quimiocinas (*IFNG, CXCL10, CCL4, CCL5, CXCL3, CCR2*), receptores do *checkpoint* imune (*PDCD1, CTLA4, LAG3, HAVCR2/TIM3*), ciclo celular (*CDKN1A, BUB1, CCNE2, CCNB2, CCNA2*), interação com a matriz extracelular (*ITGB1, LAMC1, ITGA1, CD44*), adesão celular (*CEACAM1, CHD7, DNAJB6, ENTPD1, ICOS, ITGA1, ITGAX, ITGB1*), fatores de transcrição (*EOMES, TBX21/TBET, CREM, NFKBIA, BATF, RUNX2, FOXO3*), entre outros.

Com o intuito de procurar interações entre os diferentes genes identificados na assinatura, analises de redes foram realizadas com a ferramenta *STRING*, usando um *score* de interação >0,400. Na Fig. 4.20 são mostradas as diferentes interações observadas, nas quais foram identificados 391 nós (genes) com um valor de grau médio de 5,6; 1905 *edges* e média de coeficiente de agrupamento local de 0,364. Nitidamente são identificadas duas fortes interações entre os genes que representam a assinatura de exaustão: i) formada por genes do sistema imune e, ii) genes do processo de ciclo celular.

Na Fig. 4.21 são mostradas as interações dos genes do sistema imune identificados na assinatura. Foi possível identificar genes relacionados à resposta inflamatória (*IFNG*, *CXCL13*, *TBX21*, *CXCL10*), resposta antiviral (*OAS1*, *IFIs*, *CXCL10*), inflamossoma (*CASP1*, *IL1B*, *IL1RB*, *NAI*D), ativação celular (*CD80*, *CD86*, *CTLA4*), apresentação de antígenos (HLAs de classe 2, *KIF22*, *DYNLL2*), entre outras vias.



**Figura 4.20: Rede de interação do grupo de genes identificados na assinatura de exaustão de linfócitos T CD8 positivos.** Cada nó representa um gene; cada aresta (*edge*) representa uma interação proteína-proteína. Cores diferentes nas *edges* representam os tipos de evidência para a associação [turquesa e magenta: interação conhecida de banco de dados curados ou determinação experimental, respectivamente; verde, vermelho e azul: interação predita (genes vizinhos, fusão ou coocorrência); preto e lilás: outras (coexpressão ou proteína homóloga)]. Os resultados foram obtidos mediante a plataforma STRING.



Figura 4.21: Detalhes da rede de interação do grupo de genes do SISTEMA IMUNE identificados na assinatura de exaustão de linfócitos T CD8 positivos. Cada nó representa um gene; cada aresta (edge) representa uma interação proteína-proteína. Cores diferentes nas edges representam os tipos de evidência para a associação [turquesa e magenta: interação conhecida de banco de dados curados experimental, determinação ou respectivamente; verde, vermelho e azul: interação predita (genes vizinhos, fusão ou coocorrência); preto e lilás: (coexpressão ou proteína outras homóloga)]. Os resultados foram obtidos mediante а plataforma STRING.

Análises de enriquecimento foram desenvolvidas para identificar as vias com maior relevância utilizando o banco de dados REACTOME (Anexo VII), que permitiu a identificação de 683 vias com significância estatística (FDR<0,05). A Tabela 4.11 mostra as 10 principais vias hierarquizadas pela análise. Entre as vias identificadas se encontram a via de sinalização da IL10 (*CXCL10, IL10RA, IL1R2, CCL5, IL1B*, entre outros), receptores de quimiocinas e ligantes (*CXCR3, CCL4, CCL5, XCL1, CXCR6, CCR5, CXCL3*), *checkpoint* mitótico (*NCAPG, CCNB2, CENPE, CENPF, KIF18A, BUB1*), sinalização da IL4 e -13 (*ANXA1, IRF4, IL1B, FASLG, RORA, FOXO3*).

Identificação da Nome da via FDR N° entidades N° entidades via encontradas do processo R-HSA-6783783 23 88 Sinalização da interleucina 3,9E-10 10 R-HSA-380108 Receptores de quimiocinas 2.21E-8 16 48 que ligam quimiocinas R-HSA-168256 Sistema imune 5,0E-5 142 2616 R-HSA-68877 Prometafase mitótica 1,92E-4 19 136 Sinalização de IL4 e 13 212 R-HSA-6785807 2,15E-4 24 R-HSA-5663220 **RHO GTPases** 2,15E-4 19 141 Sinalização por interleucinas 688 R-HSA-449147 3,54E-4 50

3,54E-4

4,57E-4

5,46E-4

39

65

17

480

1006

128

**Tabela 4.11:** As 10 vias mais frequentes associadas à assinatura de exaustão nos linfócitos T CD8+

FDR: False discovery rate. Resultados obtidos através do banco de dados REACTOME.

Degranulação de neutrófilos

Sinalização de citocinas no

Resolução da coesão das

sistema imune

cromátides irmãs

R-HSA-6798695

R-HSA-1280215

R-HSA-2500257

4.4.3.2 Identificação de um potencial perfil de expressão gênica associado ao fenômeno de exaustão no linfoma de Hodgkin clássico associado ao vírus Epstein-Barr

Com o intuito de identificar a presença de um potencial perfil de expressão gênico associado à exaustão imune no LHc, uma análise de expressão gênica supervisionada foi desenvolvida partindo da assinatura gênica proposta nos linfócitos T CD8+.

Dos 392 genes que integraram a assinatura "humanizada" de exaustão identificada nos linfócitos T CD8+, 309 genes faziam parte do *chip* utilizado na avaliação do subconjunto de dados GSE13996 de casos com LHc, podendo assim ser avaliado nos pacientes 78,8% da assinatura previamente identificada.

Uma primeira abordagem consistiu em análise de expressão diferencial supervisionada comparando o grupo total de pacientes com LHc (n=64) com um controle externo de proliferação imune não tumoral (linfonodos reativos, n=3). Foram identificados 64/309 genes superexpressos no LHc como neoplasia (*fold change*>2 e FDR<0,05). Entre eles encontramse genes com função de receptores inibitórios (*CTLA4* e *LAG3*), receptores co-estimulatórios (*CD80, CD86*), receptor inibitório de células NK (*KLRB1*), metabolismo (*NUDT4, COQ10B, ADPRM*), entre outros. No Anexo IV, Tabela S8 são mostrados os genes identificados no LHc classificados segundo as diferentes vias moleculares.

Seguidamente foram feitas análises comparando LHc EBV+ (n=18) ou LHc EBV- (n=35) *vs.* hiperplasias reativas (adenites, n=3). No subconjunto de dados LHc EBV+ foram identificados 55 dos 309 genes (17,8%) da assinatura de genes diferencialmente expressos (*fold change*>2 e FDR<0,05). Já no subgrupo de LHc EBV-, 44/309 (14,2%) desses genes foram sobre-expressos considerando os limiares de significação.

Como mostrado na Tabela 4.12 e Fig. 4.22, 35 genes foram compartilhados na potencial assinatura identificada para os casos EBV+ e EBV-, como por exemplo, *CD80*, *CD86*, *IL1R2*, *KLRB1*. Os genes identificados em comum foram associados principalmente ao processo inflamatório, a coestimulação imune e à regulação negativa do sistema imune. A análise dos genes únicos para cada subgrupo viral mostrou que no grupo EBV+, 20 genes foram encontrados superexpressos, dentre eles *CTLA4*, *AIF1*, *CD44*, *FASLG*, *CCL4*, *CASP1*, representando um grupo de genes associados à resposta antiviral, processos de adesão célula-célula e morte celular. No grupo de LHc EBV-, apenas 9 genes foram únicos para este grupo, os quais foram relacionados à síntese de lipoxinas, metabolismo lipídeos, síntese de leucotrienos e eoxinas e síntese de fosfatidil inositol.

**Tabela 4.12**: Genes diferencialmente expressos da potencial assinatura de exaustão imune em pacientes adultos com linfoma de Hodgkin clássico segundo a presença do vírus Epstein-Barr quando comparado à hiperplasia reativa

Símbolo do	Nome do gene	Sonda	Fold change	
gene			EBV+	EBV-
<u>\$10049</u>	S100 Calcium Binding Protein A9	203535 at	5 240	_
PILRA	Paired Immunoalobin Like Type 2 Recentor	2000050 <u>-</u> at	J,240 A 707	_
I ILIUI	Alpha	222210_5_dt	ч,///	_
CD14	CD14 Molecule	2017/3 at	1 503	
CCI4	C C Motif Chemokine Ligand A	$201743_{at}$	4,004	-
	C-C Molif Chemokine Ligund 4 Heat Shock Protein Family A (Hap70)	204105_at	2 0 0 5	-
ΠδΡΑΙδ	Member 12	202558_s_at	3,003	-
UCDA 12	Member 15	202557 at	2 055	
		202337_at	5,055 2 475	-
AIFI	Allograft Inflammatory Factor 1	209901_x_at	3,475	-
		213095_x_at	3,455	-
		215051_x_at	2,729	-
ANXAI	Annexin AI	201012_at	3,355	-
MS4A6A	Membrane Spanning 4-Domains A6A	219666_at	3,184	-
SLC25A24	Solute Carrier Family 25 Member 24	204342_at	3,145	-
SAMSN1	SAM Domain, SH3 Domain And Nuclear	220330_s_at	3,123	-
	Localization Signals 1			
CHN2	Chimerin 2	213385_at	3,060	-
		_		-
CTLA4	Cvtotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4	221331 x at	2.697	-
GNPTAR	N-Acetylalucosamine-1-Phosphate	212959 s at	2,664	_
	Transferase Alpha And Reta Subunits	212))_5_at	2,004	
CASP1	Caspase 1	200070 x at	2 657	
CASI I	Caspase 1	$209970_x_a$	2,057	-
EASIC		211307_s_at	2,037	-
FASLG	Fas Ligana	210865_at	2,538	-
ENTPDI	Ectonucleoside Triphosphate	207691_x_at	2,327	-
	Diphosphohydrolase I			
NR4A3	Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 3	209959_at	2,206	-
<i>CD44</i>	CD44 Molecule (Indian Blood Group)	204489_s_at	2,181	-
		212014_x_at	2,106	-
		204490_s_at	2,069	-
		209835 x at	2,064	-
		210916 s at	2.041	-
PTP4A1	Protein Tyrosine Phosphatase Type IVA	200733 s at	2,165	-
	Member 1	200700_5_u	2,100	
DYNLT3	Dynein Light Chain Tcter-Type 3	203303 at	2 071	_
	Interlaylin 1 Pagantar Type 3	205303_at	2,071	28.08
ILIKZ	mieneukin 1 Kecepior 1 ype 2	$203403_{at}$	10.813	11,066
CNV10	Souting Navin 10	$211372_s_a$	0.242	2 284#
SIVATU	Sorting Nextri 10	218404_at	9,545	2,384#
NFIL3	Nuclear Factor, Interleukin 3 Regulatea	203574_at	1,239	6,442
KLRBI	Killer Cell Lectin Like Receptor BI	214470_at	6,531	10,75#
PERP	PERP, TP53 Apoptosis Effector	217744_s_at	5,994	3,593#
BCL2A1	BCL2-related protein A1	205681_at	5,870	3,226#
CXCR6	C-X-C Motif Chemokine Receptor 6	211469_s_at	5,077	4,063
LY96	Lymphocyte Antigen 96	206584_at	4,879	2,920#
CD86	CD86 Molecule	205686_s_at	4,832	4,893
CD86		210895_s_at	3,751	3,851
SAP30	Sin3A Associated Protein 30	204900 x at	4,725	3,762
LGALS3	Galectin 3	208949 s at	4.056	2.824
GGH	Gamma-Glutamyl Hydrolase	203560 at	3 772	3 268
HISTIHIC	Histone Cluster 1 H1 Family Member C	209308_at	3,666	2 930
Continuação da T	ahola 4 9	207570_dt	5,000	2,750
Símbolo do	Nome do gene#	Sonda	Fold ch	11190
gono	Tome do genen	Sonda	FRV	FRV
gene				EDV-
	Y J Y J J I Z I Z	010150	+	0.075
LILRB4	Leukocyte Immunoglobulin Like Receptor B4	210152_at	3,551	3,052
PHLDA1	Pleckstrin Homology Like Domain Family A	217996_at	3,518	2,960
	Member 1			
PRDX4	Peroxiredoxin 4	201923_at	3,510	3,110
PLSCR1	Phospholipid Scramblase 1	202430_s_at	3,448	2,478
TCEAL9	Transcription Elongation Factor A Like 9	217975_at	3,259	4,005
NUDT4	Nudix Hydrolase 4	206302_s at	3,180	2,632
		212183 at	2,480	2,961
PTGER4	Prostaglandin E Receptor 4	204897_at	3,031	2,274

# Genes encontrados nas duas condições (EBV+ e EBV-), com diferença de expressão de no mínimo 2X *fold change*. FDR<0,05. FDR: *False discovery rate*.



**Figura 4.22: Interseção dos genes diferencialmente expressos em pacientes adultos com linfoma de Hodgkin clássico (LHc) segundo o** *status* **de associação com o vírus Epstein-Barr (EBV) quando comparado a hiperplasias reativas/linfadenites benignas.** O círculo verde representa os genes identificados no LHc EBV+ (n=55). O círculo azul representa os genes identificados no LHc EBV+ (n=55). O círculo azul representa os genes identificados no LHc EBV- (n=44). Trinta e cinco genes foram comuns a ambos os subtipos (interseção), 20 foram únicos para o grupo EBV+ e 9 nos casos EBV-.

O uso de uma referência externa permitiu comparar os subgrupos virais do LHc. Tendo em vista a origem a partir de estimulação viral da assinatura testada, e que as HR/linfadenites benignas constituem um grupo controle em que o processos de ativação imunes e proliferação celular estão ativos, estes resultados mostram, como esperado, a maior especificidade da assinatura para o grupo EBV+, em que outros genes diferentes dos receptores inibitórios aparecem de manifesto. No grupo EBV-, a potencial assinatura perde sua caracterização "imune" e genes associados ao metabolismo, principalmente de lipídeos são postos de relevo. Como segunda abordagem, e no intuito de refinar a assinatura do grupo EBV+, foi realizada uma análise subtrativa da assinatura humanizada entre os grupos LHc EBV+ (n=18) e LHc EBV- (n=35). Através desta análise, foram identificados 12/309 (3,9%) genes superexpressos potencialmente associados à exaustão celular no subgrupo EBV+ (*fold change*>2 e FDR<0,05), os quais são mostrados na Tabela 4.13. Foram identificados genes relacionados à resposta efetora (*IFNG, CXCL10, GZMA, GZMK*), moléculas inibitórias da resposta citotóxica (*SLAMF7* e *PILRA*), *CEACAM1* (ligante de HAVCR2/TIM3, molécula importante na exaustão de células em infecções virais crônicas), genes associados a mecanismos supressores (gene do metabolismo *GCH1* e da via do fibrinogênio *FGL2*), *SNX10* (molécula de trânsito intracelular, regulador da resposta inflamatória), *FASLG* (molécula associado à homeostase imune). Nas duas abordagens utilizadas, apenas os genes *FASLG* e *PILRA* foram comuns. *SNX10* foi encontrado nos dois grupos, com níveis 7 vezes maiores no grupo EBV+.

**Tabela 4.13:** Genes associados à potencial assinatura de exaustão imune diferencialmente expressos em pacientes adultos com linfoma de Hodgkin clássico segundo associação com o vírus Epstein-Barr (EBV+ *versus* EBV-)

Símbolo do	Nome do gene#	Sonda	Função	Fold
gene#				change
IFNG	Interferon Gamma	210354_at	Citocina inflamatória	3,931
SNX10	Sorting Nexin 10	218404_at	Trânsito intracelular	3,560
SLAMF7	SLAM Family Member 7	219159_s_at	Interação célula-célula e modulação resposta imune	3,510
CXCL10	C-X-C Motif Chemokine Ligand 10	204533_at	Citocina inflamatória	3,012
GCH1	GTP Cyclohydrolase 1	204224_s_at	Metabolismo	2,653
GZMA	Granzyme K	205488_at	Efetora	2,447
GZMK	Granzyme A	206666_at	Efetora	2,144
PILRA	Paired Immunoglobin Like	222218_s_at	Receptor inibitório	2,096
	Type 2 Receptor Alpha	219788_at		2,090
CEACAM1	Carcinoembryonic Antigen	209498_at	Adesão celular	2,077
	Related Cell Adhesion Molecule 1			
FASLG	Fas Ligand	210865_at	Morte celular	2,062
FGL2	Fibrinogen Like 2	204834_at	Remodelamento tecidual	2,045
NR4A2	Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 2	204622_x_at	Fator de transcrição	2,028

# De acordo com HUGO (WHITE et al., 1997). FDR<0,05.

## 4.4.4 Discussão

O vírus Epstein-Barr é um patógeno humano antigo, cuja relação de benignidade com o ser humano se baseia no delicado e intrincado controle da sua replicação e persistência pelo sistema imune (RICKINSON; KIEFF, 2001; HISLOP et al., 2007). Na primo-infecção o EBV apresenta um desafio antigénico rico do sistema imune com a geração de uma memória T eficiente, inicialmente contra as proteínas associadas à replicação (líticas) e posteriormente, contra as proteínas expressas durante a persistência (latência) (HISLOP et al., 2007). Os antígenos virais apresentam uma hierarquia reproduzível de imunodominância em relação a diferentes tipos de HLA (RESSING et al., 2008; ROWE; ZUO, 2010). Estes mesmos programas de infecção que estão presentes no portador saudável do vírus são encontrados nas neoplasias associadas ao EBV (TAYLOR et al., 2015), apontando para um desbalanço da resposta imune como fator patogênico principal. A resposta humoral, fundamentalmente contra antígenos do ciclo replicativo viral, está bem desenvolvida após a primo-infecção e protege o hospedeiro da reinfecção (HISLOP et al., 2007). Entretanto é a resposta imune celular que é responsável pelo controle da patogenicidade viral ao longo de todas as interações entre o patógeno e seu hospedeiro (RICKINSON et al., 2014), tanto que a necessidade de linfócitos citotóxicos do hospedeiro pra garantir o sucesso da persistência assintomática é considerado um traço viral característico como hipotetizado (MÜNZ, 2016). As células NK e outros linfócitos do sistema imune inato têm um papel preponderante no controle dos estádios iniciais da infecção pelo EBV (CHIJIOKE et al., 2013; CHIJIOKE; LANDTWING; MÜNZ, 2016; DJAOUD et al., 2017), mas o controle da persistência viral após a primo-infecção (e inclusive do potencial oncogênico do vírus) é de responsabilidade dos linfócitos T (RICKINSON et al., 2014; PALENDIRA; RICKINSON, 2015).

De fato, a intensa resposta contra as proteínas de latência imunodominantes (as do padrão de latência III) é responsável pela mudança para padrões mais "benéficos" de latência. A ausência deste controle predispõe para linfoproliferações malignas no hospedeiro imunocomprometido (TAYLOR *et al.*, 2015). É durante o trânsito para o compartimento de memória e a passagem pelo centro germinativo (CG) que o EBV muda o tipo de interação com o sistema imune, segundo os modelos mais aceitos de persistência viral (THORLEY-LAWSON, 2001; ROUGHAN; THORLEY-LAWSON, 2009; THORLEY-LAWSON *et al.*, 2013). Esta passagem é mediada pela expressão das duas proteínas de membrana LMP1 e LMP2, que em conjunto definem a latência II. Já a expressão, independe do transativador viral EBNA2 (da latência III) depende de fatores de transcrição induzidos pela interação com células T CD4+ do microambiente linfoide e a ação de IL21, principalmente (KIS *et al.*, 2010;

KIS *et al.*, 2011). Nesta etapa, as interações do EBV com as células T CD4 e CD8 parecem diferir.

Em relação as células CD4+, o espectro amplo de antígenos reconhecidos e a resposta tardia a EBNA1 (um antígeno de latência pouco liberado) sugerem um papel dominante para a apresentação cruzada por células apresentadoras de antígenos (APCs) como o principal mecanismo dessas respostas (LONG et al., 2013). Em contraste, as características da resposta mediada por células CD8+ sugerem que essas respostas são predominantemente mediadas por contato célula-célula entre linfócitos T CD8+ e células B infectadas (RICKINSON et al., 2014). Mediadores dessa interação foram identificados a partir do estudo de imunodeficiências primárias que afetam a imunidade celular, com susceptibilidade à infecção fulminante pelo EBV, como por exemplo, a doença linfoproliferativa ligada ao X (XLP) (PURTILO et al., 1975). Esta imunodeficiência surge por mutações no gene SH2D1A (BOOTH et al., 2011) que codifica uma pequena proteína adaptadora denominada SAP, expressa em células T e NKs e, envolvida na interação célula-célula mediada por membros da família SLAM (signalling lymphocyte activation molecule) de receptores de superfície (CANNONS; TANGYE; SCHWARTZBERG, 2011). Estes mesmos mediadores foram descritos nas interações "fisiológicas" do EBV no CG; onde o contato é mediado por CD244-CD48 (RICKINSON et al., 2014; TANGYE; PALENDIRA; EDWARDS, 2017), e o receptor inibitório KLRG1 é expresso por células T CD8 EBV especificas (APPAY et al., 2008).

Voltando à linfomagênese associada ao padrão de latência II do EBV, que é o padrão de latência do LHc, esta ocorre no CG e durante a sua fase preneoplásica é hipotetizada que haja uma longa interação célula-célula entre as precursoras das células tumorais (H-RS), com defeitos na estimulação via o BCR, e populações linfoides específicas com defeitos na manipulação da resposta antiviral associada a alguns alelos HLA (NIENS *et al.*, 2007; HJALGRIM *et al.*, 2010; HUANG *et al.*, 2012) além de outros defeitos como a exploração do eixo inibitório PD1-PD1L estimulado pela oncoproteína LMP1 (GREEN *et al.*, 2012). Estas interações patogênicas finalmente irão levar a doença conhecida como LHc EBV+.

A carga dos antígenos virais e o tempo de exposição a estes nas infecções virais são fatores iniciais no desenvolvimento da exaustão imune (GOEPFERT *et al.*, 2000; BONI *et al.*, 2007; RADZIEWICZ *et al.*, 2007; EL-FAR *et al.*, 2008). O padrão de latência estrito característico do EBV no seu reservatório celular fisiológico, as células B de memória, e sua reativação esporádica, restrita a estruturas linfoides específicas na mucosa das tonsilas, colocam o EBV numa categoria de pouco indutor da exaustão, quando comparado com vírus

de replicação constante e circulação sistêmica como o HIV ou o HCV (KAHAN; WHERRY; ZAJAC, 2015).

Já no LHc EBV+ o vírus encontra-se em baixa carga mas com uma estimulação antigênica constante (KÜPPERS, 2003; KLEIN; KLEIN; KASHUBA, 2010; MURRAY; BELL, 2015; CARBONE *et al.*, 2017) o que poderia gerar um estado de exaustão celular, como fator patogênico da doença.

Com o pano de fundo desses conhecimentos, iniciamos uma pesquisa para identificar perfis imunes potencialmente associados à exaustão no LHc associado ao EBV. A hipótese é que a superposição de, por um lado, uma linfomagênese B caracterizada pelo recrutamento de um infiltrado inflamatório e pela estimulação imune crônica e, por outro, as interações imunes locais características do EBV no CG, ver-se-ia refletida em características particulares em relação às células efetoras.

A presença do EBV foi associada a um enriquecimento de células CD8+ e Th1 em nosso grupo de estudo (BARROS *et al.*, 2012), que foi confirmado em outros estudos GREAVES *et al.* (2013) e WU *et al.* (2016). De igual maneira, no grupo de validação GSE13996 (CHETAILLE *et al.*, 2009) foi possível identificar um incremento de células CD8+. No nível molecular, genes bem caracterizados associados aos perfis pró-inflamatório e supressor mostraram expressões concordantes com um perfil pró-inflamatório na presença do EBV. Esta associação já foi descrita anteriormente em pacientes adultos (MALEC *et al.*, 2004; CHETAILLE *et al.*, 2009; MORALES *et al.*, 2014), contudo estes estudos também descreveram um aumento de *CXCL10* e *IL10* associados à presença viral, a qual não foi evidenciada no nosso grupo de pacientes pediátricos.

Estudos prévios em adultos têm descrito alta expressão de *CTLA4* e *LAG3*, assim como um incremento de linfócitos T LAG3+ associados à presença do EBV (GANDHI, 2006; MORALES *et al.*, 2014). Em contraste com estes achados, no presente trabalho não foram observadas diferenças nos níveis de expressão de genes do *checkpoint* imune segundo a presença viral. LAG3 e CTLA4, além de marcadores de ativação dos linfócitos T, também são considerados marcadores de linfócitos T reguladores tipo 1 (BIREBENT *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2004). O nosso grupo de estudo foi caracterizado por diferenças significativas nas razões entre células citotóxicas e Treg nos casos EBV+ e EBV-, mas não houve diferenças significativas no número de células Treg totais (BARROS *et al.*, 2012). Isto poderia explicar a falta de associação entre os níveis de expressão de *CTLA4* e *LAG3* com o

vírus, já que pelas limitações da nossa abordagem, não é possível identificar a origem do RNAm, e a imunohistoquímica embora específica na sua identificação celular, nos limita quanto ao uso de múltiplos marcadores.

Esta falta de associação entre os níveis de expressão de moléculas do checkpoint imune nos casos EBV+ e EBV- neste estudo que incluiu exclusivamente pacientes pediátrico, levou-nos à procura de outras abordagens para estudar uma potencial assinatura de exaustão imune, através de análises bioinformáticas. A assinatura gênica identificada no modelo animal (DOERING et al., 2012) e posteriormente humanizada foi associada principalmente à resposta imune e processos do ciclo celular. Em relação aos processos do sistema imune, foram identificados genes associados a uma reposta antiviral, citocinas e quimiocinas e alguns relacionados à via do inflamassoma. Esta última, caracterizada neste estudo pela expressão de IL1B, IL1RB2, CASP1 e NAIP; não tinha sido levantada como via associada à exaustão no modelo murino (WHERRY et al., 2007; DOERING et al., 2012). A ligação TIM3-galectina 9 é capaz de ativar a via do inflamassoma, levando às células efetoras para a morte celular (KASHIO et al., 2003; JAYARAMAN et al., 2010). Em pacientes com LHc foi descrita uma alta expressão de galectina 9 (TÜRECI et al., 1997), além disso a expressão desta molécula tem sido associada à proteína LMP1 do EBV no carcinoma de nasofaringe, mostrando capacidade inibitória das células Th1 (PIOCHE-DURIEU et al., 2005; KERYER-BIBENS et al., 2006; KLIBI et al., 2009).

Neste trabalho as moléculas *CASP1* e *IL1R2*, assim como *FASLG* foram identificadas na potencial assinatura de exaustão dos pacientes adultos com LHc EBV+, o que nos permite questionar se o vírus EBV em pacientes com LHc estaria induzindo a produção de galectina 9 como um mecanismo de escape à resposta imune, inibindo e induzindo a morte das células efetoras. Estes dados apontam para a necessidade de melhor entender o contexto em que as proteínas do inflamassoma se expressam na exaustão, e seu papel na resposta antiviral/tumoral específica do EBV e o LHc; conhecimento que somente poderá ser adquirido mediante ensaios de tipo funcional.

No LHc definido como neoplasia, independente da presença do EBV, é possível sugerir que o estado de exaustão encontra-se dirigido por genes relacionados ao processo inflamatório, a coestimulação imune e à regulação negativa do sistema imune. Chama atenção o fato de não se ter identificado as moléculas do *checkpoint* imune (a exceção de *CTLA4* no grupo EBV+), provavelmente devido ao grupo de comparação utilizado para realizar estas análises (HR/linfadenites benignas) que limitou a recuperação destas moléculas, já que estas

decorrem de processos imunopatológicos benignos com uma alta ativação e proliferação celular (GOOD; GASCOYNE, 2009), em que os receptores inibitórios podem estar expressos como parte da sua função homeostática normal.

Dentre os genes identificados na potencial assinatura de exaustão associada ao EBV+, alguns já foram descritos relacionadas a um papel na regulação negativa na resposta antiviral ou presentes em pacientes com câncer, encontram-se: *SLAMF7* (BAE *et al.*, 2012; CHU *et al.*, 2014); CEACAM1 (TAGUCHI; HIRAI-YUKI, 2012; ZHANG *et al.*, 2017), FASLG (PETER *et al.*, 2015) e FGL2 (KHATTAR *et al.*, 2013).

Como mencionado acima, a família SLAM está envolvida na regulação da interação célula-célula entre linfócitos T CD8+ e células B infectadas pelo EBV (RICKINSON *et al.*, 2014; TANGYE; PALENDIRA; EDWARDS, 2017). SLAMF7 é uma molécula essencial na resposta dos linfócitos CD8+ e célula NKs, que atua como seu próprio ligante (CANNONS; TANGYE; SCHWARTZBERG, 2011) e é um dos únicos dois membros da família SLAM que é independente ao adaptador SAP (DE CALISTO *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2017). Um estudo recente em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico mostrou que células CD8 de memória efetora e de memória efetora terminalmente diferenciadas expressam altos níveis desta molécula, adicionalmente descrevendo que o bloqueio desta molécula permite recuperar a função efetora dos linfócitos T CD8+ em resposta a antígenos virais (EBV, citomegalovírus e influenza) (COMTE *et al.*, 2017). Entretanto, esta molécula não foi descrita ainda no contexto da infecção primária pelo EBV e não existem estudos sobre ela nos linfomas, o que a torna um alvo interessante para futuras pesquisas.

Na busca de uma potencial assinatura de exaustão no LHc EBV+, três genes em particular, *FASLG, PILRA e SNX10*, chamaram a atenção por ser identificados através das duas abordagens de análises utilizadas. Previamente foi descrito que células exaustas são caracterizadas por expressar FASLG (WHERRY *et al.*, 2007; DOERING *et al.*, 2012; BARATHAN *et al.*, 2015), mas pouco se conhece sobre seu papel efetivo no fenômeno de exaustão. No modelo animal com infecção crônica (gamaherpesvírus murino e LCMV) foi descrito que, células CD8 exaustas antígeno-específico que expressam FAS são levadas à morte celular via BIM e FAS-FASLG (HUGHES *et al.*, 2008; VARANASI; KHAN; CHERVONSKY, 2014).

Neste trabalho, CEACAM1 foi associada à assinatura de exaustão na presença do EBV em pacientes adultos. CEACAM1 é o segundo ligante de HAVCR2 (TIM3), que atua facilitando a maduração e expressão desta molécula (HUANG *et al.*, 2014). TIM3 tem sido descrito por apresentar papel funcional na inibição da resposta antiviral, mediando a exaustão celular na presença de infecções virais crônicas (JONES *et al.*, 2008; GOLDEN-MASON *et al.*, 2009; NEBBIA *et al.*, 2012; SAKHDARI *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2012). Apesar de não ter identificado TIM3 associado ao *status* do EBV, encontramos no grupo inteiro uma associação entre os níveis de expressão de TIM3 e o desfecho clínico. O estudo de seus ligantes pode lançar luz sobre a regulação da disfunção efetora diferencial nos casos EBV+ e EBV-.

O *software* CIBERSORT foi usado com sucesso por nós na quantificação relativa de diferentes subpopulações imunes. TOSOLINI *et al.* (2016) propõem a utilização desta ferramenta integrada com uma abordagem de identificação de perfis de expressão gênica (33 genes), entre os que se encontravam genes relacionado ao *checkpoint* imune (*CTLA4, LAG3, HAVCR2, PD1*) e citocinas/quimiocinas (*CCL2, CCL22, IL10, IL23A*), permite produzir 4 *score* gênicos para discriminar os quatro estádios de edição imune em linfomas não-Hodgkin B.

A combinação da quantificação celular como descrita no presente trabalho, com a assinatura potencial de exaustão identificada no LHc é uma ação em curso que poderia contribuir com novo conhecimento sobre o escape imune no LHc, uma vez que permitiria identificar os quatro estádios da imunoedição na neoplasia (conceitos não muito explorados no LHc) e possivelmente permitiria classificar os pacientes segundo o desfecho clínico.

Neste trabalho, no grupo pacientes adultos com LHc EBV- foram identificados genes relacionados ao metabolismo principalmente de lipídeos. O metabolismo celular apresenta um papel diferencial na ativação, diferenciação e função dos linfócitos T (MACIVER; MICHALEK; RATHMELL, 2013; BUCK; O'SULLIVAN; PEARCE, 2015; ALMEIDA *et al.*, 2016). Diferentes estudos têm descrito que as vias metabólicas encontram-se desreguladas nas células exaustas, em que o metabolismo oxidativo parece dominar nesta células (WHERRY *et al.*, 2007; DOERING *et al.*, 2012; DELGOFFE; POWELL, 2015; BENGSCH *et al.*, 2016), com requerimentos metabólicos diferentes dependendo da célula T CD8 vírus-específica (SCHURICH *et al.*, 2016). Além disso, foi descrito que PD1 é capaz de reprogramar as vias metabólicas, inibindo a glicólise e promovendo a lipólise e oxidação de ácidos graxos (PATSOUKIS *et al.*, 2015). Os microambientes tumorais são caracterizados por apresentar restrições metabólicas que mediam as funções efetoras (SISKA; RATHMELL, 2015; HERBEL *et al.*, 2016), e estudos que visem avaliar genes relacionados às vias

metabólicas no microambiente do LHc, embora de difícil execução, contribuiriam com conhecimento potencialmente importante.

Em suma, neste estudo uma potencial assinatura de exaustão associada à presença viral foi identificada no casos de pacientes adultos com LHc, a qual foi representada majoritariamente por genes da resposta imune antiviral como *IFNG*, *CXCL10*, *GRZs*, *SLAMF7*, *PILRA*. Foi descrito que células CD8 EBV específicas são caracterizadas por secretar IFNG e GRZK (APPAY *et al.*, 2002; APPAY *et al.*, 2008). Por outro lado, a interação entre CEACAM1-TIM3 é capaz de gerar exaustão nas células efetoras, majoritariamente associada as infecções virais crônicas (HUANG *et al.*, 2014). Estas observações nos permitem levantar a hipótese de que a presença do EBV é capaz de gerar um estado de exaustão diferencial entre os pacientes com LHc EBV+ e EBV-, pelo menos em pacientes adultos. Porém, é necessário uma melhor caracterização destas moléculas nas células do MAT do LHc, em conjunto com estudos funcionais que consigam identificar a capacidade de secreção e proliferação das células efetoras.

Os resultados obtidos sugerem que no LHc operam mecanismos relacionados à exaustão imune, independente da presença do EBV, já que foi observado que no LHc como neoplasia atuam mecanismos relacionados à ativação celular e inibição do processo inflamatório (MATSUKI; YOUNES, 2015; ALDINUCCI; CELEGATO; CASAGRANDE, 2016). Quando as análises são realizadas segundo o *status* viral, na presença do EBV foram observados genes relacionados majoritariamente à inibição de uma resposta imune antiviral e interação célula-célula que permitiriam acercar características da infecção viral ao processo linfomagênico, condição essencial para pensar em terapias ou marcadores específicos da condição viral.

## 5 DISCUSSÃO

Resultados prévios de nossa equipe em um grupo de pacientes pediátricos com LHc mostraram que a presença do EBV influencia a composição do MAT. Um predomínio de um perfil citotóxico/Th1 é encontrado nos casos EBV+, enquanto que um perfil mais supressor é observado no grupo EBV-. Nesses trabalhos iniciais propomos que as associações observadas entre a composição do MAT - especialmente nas populações citotóxicas e Treg-, a presença do EBV e o desfecho clínico refletiriam a presença de um microambiente com processo de imunoedição que ainda apresentava uma resposta imune antitumoral e antiviral funcional, atenuada, entretanto, por mecanismos supressores atuantes no MAT (BARROS *et al.*, 2012; BARROS; HASSAN; NIEDOBITEK, 2012; BARROS *et al.*, 2015).

O sucesso terapêutico de duas drogas anti-PD1 no tratamento de pacientes com LHc em segunda linha (ARMAND *et al.*, 2016; KASAMON *et al.*, 2017) é baseado no reconhecimento do papel do eixo PD1-PDL1 na manutenção do estado neoplásico neste linfoma (GLIMELIUS; DIEPSTRA, 2016; YOUNES; ANSELL, 2016) e abre a porta para explorar imunoterapias que tenham como objetivo a recuperação da função efetora de uma resposta antitumoral local. Entretanto, a falha inicial dos ensaios clínicos com CTLA4 (DAVIDS *et al.*, 2015) levanta uma nota de atenção e reforça a necessidade de se entender melhor os fatores e mecanismos supressores no desenvolvimento e progressão tumoral. Neste trabalho, iniciamos a descrição de características supressoras no MAT do LHc, e nos perguntamos qual seria a contribuição do EBV neste contexto e se o *background* genético do hospedeiro seria um fator que influenciaria a composição celular do tumor.

O uso de imunoterapias no câncer traz a necessidade não somente de entender as interações imunes em cada um dos tipos de câncer candidatos a estas terapias, senão também de desenvolver biomarcadores preditivos de benefício terapêutico (MAHONEY; RENNERT; FREEMAN, 2015; (SMYTH *et al.*, 2015). No caso das terapias com alvo na reversão do processo de exaustão imune, cabe o questionamento se haveria células no MAT com capacidade diferenciada para recuperar suas funções efetoras e se estas poderiam ser quantificadas através de técnicas aplicáveis à clínica. Isto seria de particular importância para a aplicação das imunoterapias em primeira linha, com distinção de pacientes que iriam se beneficiar com estas novas drogas, daqueles que responderiam bem ao tratamento convencional.

Nossa primeira abordagem nesse sentido foi a avaliação da expressão de diferentes genes associados aos receptores inibitórios. Altos níveis de expressão de moléculas associadas ao *checkpoint* imune foram identificados no LHc e correlacionados com as células citotóxicas no MAT. Mais ainda, alta expressão de *HAVCR2/TIM3, sCTLA4* e as razões *EOMES/TBX21* e *sCTLA4/flCTLA4* foram associadas a uma pior resposta terapêutica nos pacientes pediátricos com LHc. Estes resultados permitem levantar a hipótese de que os níveis de expressão dos mencionados genes refletem, ao menos em parte, diferenças funcionais nas células que integram o MAT em relação a um estado funcional exausto. Apesar da limitação imposta pelo número de pacientes e metodologias empregadas, estes genes apresentam um atrativo para sua utilização como biomarcadores clínicos, que devem ser validados de maneira independente e prospectiva num maior número de pacientes e no contexto de imunoterapias específicas. Mais ainda, a identificação das células responsáveis pela expressão dos receptores inibitórios e o estado funcional destas células, permitiria caracterizar melhor estas moléculas e sua possível associação com mecanismos supressores presente na neoplasia.

A infecção viral crônica é capaz de induzir um estado celular de exaustão (WHERRY; KURACHI, 2015). Embora o EBV não se encontre entre os vírus persistentes com alta carga ou taxa de infecção produtiva, associados com alta capacidade de indução da exaustão imune (KAHAN; WHERRY; ZAJAC, 2015). No grupo estudado aqui não houve diferenças entre os níveis de expressão das moléculas do checkpoint imune nos casos de LHc EBV+ e EBV-. Isto não é surpreendente, pois neste linfoma características patogênicas centrais mostraram serem mantidas por mecanismos compensatórios genéticos/epigenéticos nos casos EBV- e induzidos por proteínas virais nos EBV+ (GREEN et al., 2010; GREEN et al., 2012; WENIGER; KÜPPERS, 2016). Uma abordagem bioinformática permitiu identificar um conjunto de genes provenientes de uma assinatura de exaustão associados a uma resposta antiviral e relacionados ao contato célula-célula nos casos de adultos com LHc EBV+. É plausível pensar que o EBV no LHc seria capaz de gerar um estado de exaustão, através do contato necessário entre as células CD8 e células B infectadas (CD244-CD48 e NKG2D-NKG2DL) (RICKINSON et al., 2014) e à estimulação da via PD1-PD1L, esta última mediada pela proteína LMP1 nas células H-RS (GREEN et al., 2012). Uma validação destes resultados e mais pesquisas sobre alguns dos alvos identificados permitiria diferenciar vias diferentes pelas quais se daria o fenômeno de exaustão imune no LHc, abrindo portas para intervenções terapêuticas diferenciadas.

A IL10 é uma citocina não redundante central no desenvolvimento imune (SARAIVA; O'GARRA, 2010), e seu papel supressor no câncer é objeto de muita atenção (MANNINO *et al.*, 2015; GEGINAT *et al.*, 2016). Estabelecemos neste trabalho um modelo de interação genótipo-fenótipo para a *IL10* no sistema complexo LHc, traçado a partir de características estáveis, porém variáveis interindividuais, como os principais polimorfismos funcionais do promotor proximal do gene *IL10*, passando pela expressão gênica tumoral que recolhe o estado global de ativação das populações imunes no MAT, pela composição celular, especialmente de macrófagos com marcadores de polarização de tipo M2 e terminando no comportamento clínico do indivíduo portador desses polimorfismos estudados. Nesse caminho, pela primeira vez é levantada a ideia de que o *background* genético do hospedeiro poderia influenciar a composição do MAT e, como consequência, influir na resposta clínica do paciente. Esta observação muda o modo de pensar o papel dos polimorfismos e as associações de risco, fornecendo ademais uma possível explicação para as associações publicadas.

A alta dependência que as células tumorais do LHc tem em relação às células do MAT tem impedido a obtenção de modelos (*in vitro* ou *in vivo*) que recapitulem a estrutura tumoral. A abordagem proposta *in silico* mediante o uso do *software* CIBERSORT e de análises bioinformáticas fornece novas ferramentas para abordar a complexidade do LHc, que já fora validada para diferentes tipos de câncer, como de mama, cólon, pulmão e linfomas não-Hodgkin (ALI *et al.*, 2016; ARAUJO *et al.*, 2016; WEN *et al.*, 2016; BENSE *et al.*, 2017; LAGINESTRA *et al.*, 2017; TOSOLINI *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2017). A utilização deste tipo de abordagem no futuro permitirá integrar de uma maneira simples dados transcriptômicos com a composição celular.

A pesar das limitações impostas pelo número de pacientes e a falta de estudos funcionais para a caracterização do estado celular de exaustão imune no LHc, em conjunto os resultados obtidos neste estudo permitiram avançar sobre o entendimento da linfomagênese no LHc, em especial sobre os diferentes mecanismos supressores que poderiam estar atuando no MAT. Adicionalmente, propomos novos biomarcadores terapêuticos relacionados aos receptores inibitórios que precisam agora ser testados em estudos prospectivos.

## 6 CONCLUSÕES

Variantes genéticas do promotor do gene IL10 impactam na resposta terapêutica dos pacientes pediátricos com LHc. Uma pior SLP foi observada em pacientes portadores dos genótipos -1082AA+AG e -592AA e do haplótipo ATA. Esses polimorfismos na posição - 1082A/G e o haplótipo ATA foram associados a altos níveis de RNAm de *IL10* no MAT. Variantes genéticas associadas a altos níveis de *IL10*, também foram relacionadas a um maior número de células inflamatórias MAF+, demonstrando que o modelo de controle genético no nível de RNAm foi replicado no nível celular no MAT.

Variantes genéticas no gene *CTLA4* associadas à ativação de linfócitos T não foram associadas aos níveis de expressão do RNAm nem nos níveis das isoformas de RNAm (*full lenght* e solúvel). O tempo de sobrevida dos pacientes também não foi associado aos polimorfismos estudados. Os genótipos +49GG e CT60GG (maior ativação de linfócitos T) foram associados a um maior número de células citotóxicas no MAT, assim como o haplótipo +49A/CT60A a um menor número das mesmas. Além disso foi observado que alta expressão de *sCTLA4* e a razão de *sCTLA4* sobre *flCTLA4* foram associadas a um menor tempo de SLP, sugerindo um papel supressor tumoral parácrino desta molécula no LHc.

Pela primeira vez é levantado o conceito da contribuição do *background* genético de cada indivíduo na influência da composição e polarização celular do MAT, através das observações das variantes genéticas associadas às subpopulações celulares intratumorais.

Os níveis de expressão de genes associados ao *checkpoint* imune (*CTLA4, PDCD1, HAVCR2/TIM3*, entre outros) estiveram correlacionados positivamente com um perfil inflamatório do MAT no nível molecular e celular (CD8+, GRZB+ e TIA1+) em linfonodos diagnosticados com LHc de crianças e adolescentes.

Pela primeira vez é descrito que altos níveis de *HAVCR2/TIM3*, assim como do fator de transcrição *EOMES* sobre *TBX21/TBET* tem um papel na resposta terapêutica do LHc, com impacto negativo na SLP de pacientes pediátricos com LHc. Foi detectada uma relação consistente entre *HAVCR2/TIM3* e células GRZB+, cuja associação com parâmetros clínicos sugere que poderia ser um dos mecanismos de escape à resposta antitumoral e uma explicação da associação de células citotóxicas ao desfecho clínico.

Altos níveis de expressão de genes pró-inflamatórios foram associados à presença do EBV, acompanhando a composição celular inflamatória intratumoral (citotóxica/Th1). A

associação foi também observada em uma coorte independente de pacientes através da ferramenta bioinformática CIBERSORT. O método mostrou ser aplicável em amostras com alta heterogeneidade celular, capaz de replicar no nível celular a assinatura molecular previamente identificada, sugerindo que o EBV poderia atuar como antígeno local com papel diferencial na modulação celular.

No LHc independente da presença do EBV, foi caracterizada a expressão de genes relacionados à exaustão imune, sugerindo que no LHc estariam operando mecanismos supressores complexos que estariam contribuindo ao escape da resposta imune.

Genes relacionados à resposta antiviral foram identificados nos pacientes adultos com LHc EBV+ a partir de uma assinatura do fenômeno de exaustão, insinuando que o EBV poderia mediar um estado celular de exaustão nas células efetoras através do contato célulacélula necessário no controle da reativação viral pelos receptores inibitórios.

## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, R. J. M. *et al.* CD8+ T Cell Responses to Lytic EBV Infection: Late Antigen Specificities as Subdominant Components of the Total Response. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 11, p. 5398–5409, 1 dez. 2013.

ABDELRAZIK, N. *et al.* Serum level of intercellular adhesion molecule-1 in children with malignant lymphoma. **Medical Principles and Practice: International Journal of the Kuwait University, Health Science Centre**, v. 17, n. 3, p. 233–238, 2008.

ALDINUCCI, D. *et al.* The classical Hodgkin's lymphoma microenvironment and its role in promoting tumour growth and immune escape. **The Journal of Pathology**, v. 221, n. 3, p. 248–263, jul. 2010.

ALDINUCCI, D.; CELEGATO, M.; CASAGRANDE, N. Microenvironmental interactions in classical Hodgkin lymphoma and their role in promoting tumor growth, immune escape and drug resistance. **Cancer Letters**, v. 380, n. 1, p. 243–252, 28 set. 2016.

ALMEIDA, L. *et al.* Metabolic pathways in T cell activation and lineage differentiation. **Seminars in Immunology**, v. 28, n. 5, p. 514–524, out. 2016.

ÁLVARO, T. *et al.* Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 4, p. 1467–1473, 2005.

ANJOS, S. A Common Autoimmunity Predisposing Signal Peptide Variant of the Cytotoxic T-lymphocyte Antigen 4 Results in Inefficient Glycosylation of the Susceptibility Allele. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 48, p. 46478–46486, 22 nov. 2002.

ANSELL, S. Novel agents in the therapy of Hodgkin lymphoma. American Society of Clinical Oncology Educational Book. American Society of Clinical Oncology. Meeting, p. e479-482, 2015.

APCHER, S. *et al.* mRNA Translation Regulation by the Gly-Ala Repeat of Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1. Journal of Virology, v. 83, n. 3, p. 1289–1298, 1 fev. 2009.

APPAY, V. *et al.* Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. **Nature Medicine**, v. 8, n. 4, p. 379–385, abr. 2002.

APPAY, V. *et al.* Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: Consensus and issues: Phenotype and Function of Human T Lymphocyte Subsets: Consensus and Issues. **Cytometry Part A**, v. 73A, n. 11, p. 975–983, nov. 2008.

ARENS, R.; SCHOENBERGER, S. P. Plasticity in programming of effector and memory CD8+ T-cell formation. **Immunological reviews**, v. 235, n. 1, p. 190–205, 2010.

ARMAND, P. Immune checkpoint blockade in hematologic malignancies. **Blood**, v. 125, n. 22, p. 3393–3400, 28 maio 2015.

ARMAND, P. *et al.* Programmed Death-1 Blockade With Pembrolizumab in Patients With Classical Hodgkin Lymphoma After Brentuximab Vedotin Failure. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 31, p. 3733–3739, nov. 2016.

ARMSTRONG, A. A. *et al.* Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: further evidence for the three disease hypothesis. **Leukemia**, v. 12, n. 8, p. 1272–1276, ago. 1998.

BAE, J. *et al.* A novel immunogenic CS1-specific peptide inducing antigen-specific cytotoxic T lymphocytes targeting multiple myeloma. **British Journal of Haematology**, v. 157, n. 6, p. 687–701, jun. 2012.

BALFOUR, H. H.; DUNMIRE, S. K.; HOGQUIST, K. A. Infectious mononucleosis. **Clinical & Translational Immunology**, v. 4, n. 2, p. e33, 27 fev. 2015.

BARATHAN, M. *et al.* Chronic hepatitis C virus infection triggers spontaneous differential expression of biosignatures associated with T cell exhaustion and apoptosis signaling in peripheral blood mononucleocytes. **Apoptosis**, v. 20, n. 4, p. 466–480, abr. 2015.

BARBER, D. L. *et al.* Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. **Nature**, v. 439, n. 7077, p. 682–687, 9 fev. 2006.

BARROS, M. H. M. *et al.* Prognostic Factors in Pediatric Classical Hodgkin Lymphoma: Concepts, Questions and Perspectives. **Journal of pediatric sciences**, v. 2, n. 3, p. e25, 2010a.

BARROS, M. H. M. *et al.* Cell cycle characteristics and Epstein-Barr virus are differentially associated with aggressive and non-aggressive subsets of Hodgkin lymphoma in pediatric patients. **Leukemia & lymphoma**, v. 51, n. 8, p. 1513–1522, ago. 2010b.

BARROS, M. H. M. *et al.* Tumor microenvironment composition in pediatric classical Hodgkin lymphoma is modulated by age and Epstein-Barr virus infection. **International journal of cancer**, v. 131, n. 5, p. 1142–1152, 1 set. 2012.

BARROS, M. H. M. *et al.* Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e80908, 2013.

BARROS, M. H. M. *et al.* Macrophage Polarization Reflects T Cell Composition of Tumor Microenvironment in Pediatric Classical Hodgkin Lymphoma and Has Impact on Survival. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0124531, 15 maio 2015.

BARROS, M. H. M.; HASSAN, R.; NIEDOBITEK, G. Disease patterns in pediatric classical Hodgkin lymphoma: a report from a developing area in Brazil. **Hematological oncology**, v. 29, n. 4, p. 190–195, dez. 2011.

BARROS, M. H. M.; HASSAN, R.; NIEDOBITEK, G. Tumor-Associated Macrophages in Pediatric Classical Hodgkin Lymphoma: Association with Epstein-Barr Virus, Lymphocyte Subsets, and Prognostic Impact. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 14, p. 3762–3771, 15 jul. 2012.

BAUMFORTH, K. R. N. *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. **The American Journal of Pathology**, v. 173, n. 1, p. 195–204, jul. 2008.

BECHTEL, D. *et al.* Transformation of BCR-deficient germinal-center B cells by EBV supports a major role of the virus in the pathogenesis of Hodgkin and posttransplantation lymphomas. **Blood**, v. 106, n. 13, p. 4345–4350, 15 dez. 2005.

BECK, A. *et al.* Expression of cytokine and chemokine genes in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma: comparison with Hodgkin's disease. **The Journal of Pathology**, v. 194, n. 2, p. 145–151, jun. 2001.

BENBARUCH, A. Inflammation-associated immune suppression in cancer: The roles played by cytokines, chemokines and additional mediators. **Seminars in Cancer Biology**, v. 16, n. 1, p. 38–52, fev. 2006.

BENGSCH, B. *et al.* Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8(+) T Cell Exhaustion. **Immunity**, v. 45, n. 2, p. 358–373, 16 ago. 2016.

BIEN, E. *et al.* Pre-treatment serum levels of interleukin-10, interleukin-12 and their ratio predict response to therapy and probability of event-free and overall survival in childhood soft tissue sarcomas, Hodgkin's lymphomas and acute lymphoblastic leukemias. **Clinical Biochemistry**, v. 42, n. 10–11, p. 1144–1157, jul. 2009.

BINDEA, G. *et al.* The prognostic impact of anti-cancer immune response: a novel classification of cancer patients. **Seminars in Immunopathology**, v. 33, n. 4, p. 335–340, jul. 2011.

BIREBENT, B. *et al.* Suppressive properties of human CD4+CD25+ regulatory T cells are dependent on CTLA-4 expression. **European Journal of Immunology**, v. 34, n. 12, p. 3485–3496, dez. 2004.

BISWAS, S. K.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. **Seminars in Immunopathology**, v. 35, n. 5, p. 585–600, set. 2013.

BLAY, J. Y. *et al.* Serum interleukin-10 in non-Hodgkin's lymphoma: a prognostic factor. **Blood**, v. 82, n. 7, p. 2169–2174, 1 out. 1993.

BOHLEN, H. *et al.* Poor clinical outcome of patients with Hodgkin's disease and elevated interleukin-10 serum levels. Clinical significance of interleukin-10 serum levels for Hodgkin's disease. **Annals of hematology**, v. 79, n. 3, p. 110–113, mar. 2000.

BOLSTAD, B. M. *et al.* Quality assessment of Affymetrix GeneChip data. In: **Bioinformatics and computational biology solutions using R and bioconductor**. [s.l.] Springer, 2005. p. 33–47.

BONI, C. *et al.* Characterization of Hepatitis B Virus (HBV)-Specific T-Cell Dysfunction in Chronic HBV Infection. **Journal of Virology**, v. 81, n. 8, p. 4215–4225, 15 abr. 2007.

BOOTH, C. *et al.* X-linked lymphoproliferative disease due to SAP/SH2D1A deficiency: a multicenter study on the manifestations, management and outcome of the disease. **Blood**, v. 117, n. 1, p. 53–62, 6 jan. 2011.

BOUTROS, C. *et al.* Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies alone and in combination. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 13, n. 8, p. 473–486, 4 maio 2016.

BRÖCKELMANN, P. J.; BORCHMANN, P.; ENGERT, A. Current and future immunotherapeutic approaches in Hodgkin lymphoma. **Leukemia & Lymphoma**, v. 57, n. 9, p. 2014–2024, set. 2016.

BUCK, M. D.; O'SULLIVAN, D.; PEARCE, E. L. T cell metabolism drives immunity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 212, n. 9, p. 1345–1360, 24 ago. 2015.

BUI, J. D.; SCHREIBER, R. D. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? **Current Opinion in Immunology**, v. 19, n. 2, p. 203–208, abr. 2007.

BURDIN, N.; ROUSSET, F.; BANCHEREAU, J. B-cell-derived IL-10: production and function. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 11, n. 1, p. 98–111, jan. 1997.

BURGER, J. A. *et al.* The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. **Blood**, v. 114, n. 16, p. 3367–3375, 15 out. 2009.

BUSTIN, S. A. *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 1 abr. 2009.

CADER, F. Z. *et al.* The contribution of the Epstein-Barr virus to the pathogenesis of childhood lymphomas. **Cancer Treatment Reviews**, v. 36, n. 4, p. 348–353, jun. 2010.

CALLAN, M. F. The evolution of antigen-specific CD8+ T cell responses after natural primary infection of humans with Epstein-Barr virus. **Viral immunology**, v. 16, n. 1, p. 3–16, 2003.

CANNONS, J. L.; TANGYE, S. G.; SCHWARTZBERG, P. L. SLAM Family Receptors and SAP Adaptors in Immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 29, n. 1, p. 665–705, 23 abr. 2011.

CAO, S. *et al.* The protooncogene c-Maf is an essential transcription factor for IL-10 gene expression in macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 6, p. 3484–3492, 2005.

CARBONE, A. *et al.* The Role of Inflammation in Lymphoma. In: AGGARWAL, B. B.; SUNG, B.; GUPTA, S. C. (Eds.). . **Inflammation and Cancer**. Basel: Springer Basel, 2014. v. 816p. 315–333.

CARBONE, A. *et al.* The impact of EBV and HIV infection on the microenvironmental niche underlying Hodgkin lymphoma pathogenesis: The impact of EBV and HIV on CHL pathogenesis. **International Journal of Cancer**, v. 140, n. 6, p. 1233–1245, 15 mar. 2017.

CARBONE, P. P. *et al.* Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. **Cancer Research**, v. 31, n. 11, p. 1860–1861, nov. 1971.

CARLSON M. org.Hs.eg.db: Genome wide annotation for Human. [s.l: s.n.].

CARLSON M. org.Mm.eg.db: Genome wide annotation for Mouse. [s.l: s.n.].

CASASNOVAS, R.-O. *et al.* Plasma Cytokine and Soluble Receptor Signature Predicts Outcome of Patients With Classical Hodgkin's Lymphoma: A Study From the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 13, p. 1732–1740, maio 2007.

CASTELLINO, S. M. *et al.* Morbidity and mortality in long-term survivors of Hodgkin lymphoma: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. **Blood**, p. blood–2010, 2010.

CATAKOVIC, K. *et al.* T cell exhaustion: from pathophysiological basics to tumor immunotherapy. **Cell Communication and Signaling**, v. 15, n. 1, dez. 2017.

CHABAY, P. A. *et al.* Pediatric Hodgkin lymphoma in 2 South American series: a distinctive epidemiologic pattern and lack of association of Epstein-Barr virus with clinical outcome. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 30, n. 4, p. 285–291, abr. 2008.

CHAPMAN, A. L. *et al.* Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocyte responses in the blood and tumor site of Hodgkin's disease patients: implications for a T-cell-based therapy. **Cancer Research**, v. 61, n. 16, p. 6219–6226, 15 ago. 2001.

CHEMNITZ, J. M. *et al.* RNA fingerprints provide direct evidence for the inhibitory role of TGF and PD-1 on CD4+ T cells in Hodgkin lymphoma. **Blood**, v. 110, n. 9, p. 3226–3233, 1 nov. 2007.

CHEN, J. *et al.* SLAMF7 is critical for phagocytosis of haematopoietic tumour cells via Mac-1 integrin. **Nature**, v. 544, n. 7651, p. 493–497, 19 abr. 2017.

CHEN, J.; BYRNE JR, G. E.; LOSSOS, I. S. Optimization of RNA extraction from formalinfixed, paraffin-embedded lymphoid tissues. **Diagnostic molecular pathology**, v. 16, n. 2, p. 61–72, 2007.

CHEN, L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. **Nature Reviews. Immunology**, v. 4, n. 5, p. 336–347, maio 2004.

CHEN, L.; FLIES, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 4, p. 227–242, 8 mar. 2013.

CHETAILLE, B. *et al.* Molecular profiling of classical Hodgkin lymphoma tissues uncovers variations in the tumor microenvironment and correlations with EBV infection and outcome. **Blood**, v. 113, n. 12, p. 2765–3775, 19 mar. 2009.

CHIJIOKE, O. *et al.* Human natural killer cells prevent infectious mononucleosis features by targeting lytic Epstein-Barr virus infection. **Cell Reports**, v. 5, n. 6, p. 1489–1498, 26 dez. 2013.

CHIJIOKE, O.; LANDTWING, V.; MÜNZ, C. NK Cell Influence on the Outcome of Primary Epstein-Barr Virus Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 323, 2016.

CHU, J. *et al.* Genetic Modification of T Cells Redirected toward CS1 Enhances Eradication of Myeloma Cells. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 15, p. 3989–4000, 1 ago. 2014.

COMTE, D. *et al.* Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family Member 7 Engagement Restores Defective Effector CD8+ T Cell Function in Systemic Lupus Erythematosus: SLAMF7 ENHANCES SLE CD8+ T CELL FUNCTION. Arthritis & Rheumatology, v. 69, n. 5, p. 1035–1044, maio 2017.

COUPER, K. N.; BLOUNT, D. G.; RILEY, E. M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), v. 180, n. 9, p. 5771–5777, 1 maio 2008.

CRAWFORD, D. H. Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 356, n. 1408, p. 461–473, 29 abr. 2001.

DAS, M.; ZHU, C.; KUCHROO, V. K. Tim-3 and its role in regulating anti-tumor immunity. **Immunological Reviews**, v. 276, n. 1, p. 97–111, mar. 2017.

DAVIDS, M. *et al.* A Multicenter Phase I/Ib Study of Ipilimumab for Relapsed Hematologic Malignancies after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Blood**, v. 126, p. 860, 2015.

DE CALISTO, J. *et al.* SAP-Dependent and -Independent Regulation of Innate T Cell Development Involving SLAMF Receptors. **Frontiers in Immunology**, v. 5, 23 abr. 2014.

DE OLIVEIRA, K. A. P. *et al.* A roadmap of constitutive NF- $\kappa$ B activity in Hodgkin lymphoma: Dominant roles of p50 and p52 revealed by genome-wide analyses. **Genome Medicine**, v. 8, n. 1, dez. 2016.

DELGOFFE, G. M.; POWELL, J. D. Feeding an army: The metabolism of T cells in activation, anergy, and exhaustion. **Molecular Immunology**, v. 68, n. 2, p. 492–496, dez. 2015.

DIEFENBACH, C. S. *et al.* Hodgkin Lymphoma: Current Status and Clinical Trial Recommendations. Journal of the National Cancer Institute, v. 109, n. 4, p. djw249, abr. 2017.

DIEPSTRA, A. *et al.* Association with HLA class I in Epstein-Barr-virus-positive and with HLA class III in Epstein-Barr-virus-negative Hodgkin's lymphoma. Lancet (London, England), v. 365, n. 9478, p. 2216–2224, 25 jul. 2005.

DIEPSTRA, A. *et al.* HLA class II expression by Hodgkin Reed-Sternberg cells is an independent prognostic factor in classical Hodgkin's lymphoma. Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology, v. 25, n. 21, p. 3101–3108, 20 jul. 2007.

DIEPSTRA, A. *et al.* HLA-G protein expression as a potential immune escape mechanism in classical Hodgkin's lymphoma. **Tissue Antigens**, v. 71, n. 3, p. 219–226, mar. 2008.

DIEPSTRA, A. *et al.* Latent Epstein-Barr virus infection of tumor cells in classical Hodgkin's lymphoma predicts adverse outcome in older adult patients. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 27, n. 23, p. 3815–3821, 10 ago. 2009.

DINAND, V. *et al.* Proliferative index and CD15 expression in pediatric classical Hodgkin lymphoma. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 50, n. 2, p. 280–283, fev. 2008.

DJAOUD, Z. *et al.* Two alternate strategies for innate immunity to Epstein-Barr virus: One using NK cells and the other NK cells and  $\gamma\delta$  T cells. **The Journal of Experimental Medicine**, 3 maio 2017.

DOERING, T. A. *et al.* Network Analysis Reveals Centrally Connected Genes and Pathways Involved in CD8+ T Cell Exhaustion versus Memory. **Immunity**, v. 37, n. 6, p. 1130–1144, dez. 2012.

DOLCETTI, R. *et al.* Interplay among viral antigens, cellular pathways and tumor microenvironment in the pathogenesis of EBV-driven lymphomas. **Seminars in Cancer Biology**, v. 23, n. 6, p. 441–456, dez. 2013.

DOLCETTI, R. Cross-talk between Epstein-Barr virus and microenvironment in the pathogenesis of lymphomas. **Seminars in Cancer Biology**, maio 2015.

DRAKE, C. G. Combined Immune Checkpoint Blockade. **Seminars in Oncology**, v. 42, n. 4, p. 656–662, ago. 2015.

DU, W. *et al.* TIM-3 as a Target for Cancer Immunotherapy and Mechanisms of Action. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, p. 645, 16 mar. 2017.

DUNN, G. P. *et al.* Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nature Immunology**, v. 3, n. 11, p. 991–998, nov. 2002.

DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The Three Es of Cancer Immunoediting. Annual Review of Immunology, v. 22, n. 1, p. 329–360, abr. 2004.

EL-FAR, M. *et al.* T-cell exhaustion in HIV infection. Current HIV/AIDS reports, v. 5, n. 1, p. 13–19, fev. 2008.

ELLI, M. *et al.* Serum osteopontin and CD44 levels in lymphoreticular malignancies in children. **Bratislavske Lekarske Listy**, v. 113, n. 9, p. 534–538, 2012.

ESKDALE, J. *et al.* Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 16, p. 9465–9470, 4 ago. 1998.

ESKDALE, J.; KUBE, D.; GALLAGHER, G. A second polymorphic dinucleotide repeat in the 5' flanking region of the human IL10 gene. **Immunogenetics**, v. 45, n. 1, p. 82–83, 1996.

ESPOSITO, L. *et al.* Investigation of Soluble and Transmembrane CTLA-4 Isoforms in Serum and Microvesicles. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 2, p. 889–900, 15 jul. 2014.

FARRELL, K.; JARRETT, R. F. The molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. **Histopathology**, v. 58, n. 1, p. 15–25, 2011.

FAULKNER, G. C.; KRAJEWSKI, A. S.; CRAWFORD, D. H. The ins and outs of EBV infection. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 185–189, abr. 2000.

FERREIRA, J. M. DE O. *et al.* Lymphoma subtype incidence rates in children and adolescents: first report from Brazil. **Cancer Epidemiology**, v. 36, n. 4, p. e221-226, ago. 2012.

FERRIS, R. L.; LU, B.; KANE, L. P. Too Much of a Good Thing? Tim-3 and TCR Signaling in T Cell Exhaustion. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 4, p. 1525–1530, 15 ago. 2014.

FIGUEIRA-SILVA, C. M.; PEREIRA, F. E. Prevalence of Epstein-Barr virus antibodies in healthy children and adolescents in Vitória, State of Espírito Santo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 5, p. 409–412, 2004.

FLANAGAN, J. Localization of the Epstein-Barr virus protein LMP 1 to exosomes. Journal of General Virology, v. 84, n. 7, p. 1871–1879, 1 jul. 2003.

FORAN, A. E. *et al.* Nivolumab in the Treatment of Refractory Pediatric Hodgkin Lymphoma. Journal of Pediatric Hematology/Oncology, 10 nov. 2016.

FOURCADE, J. *et al.* Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 10, p. 2175–2186, 27 set. 2010.

FRYER, C. J. *et al.* Efficacy and toxicity of 12 courses of ABVD chemotherapy followed by low-dose regional radiation in advanced Hodgkin's disease in children: a report from the Children's Cancer Study Group. Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology, v. 8, n. 12, p. 1971–1980, dez. 1990.

FUERTES MARRACO, S. A. *et al.* Inhibitory Receptors Beyond T Cell Exhaustion. **Frontiers in Immunology**, v. 6, 26 jun. 2015.

GABRIEL, S. B. *et al.* The structure of haplotype blocks in the human genome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 296, n. 5576, p. 2225–2229, 21 jun. 2002.

GAIOLLA, R. D. *et al.* Serum levels of interleukins 6, 10, and 13 before and after treatment of classic Hodgkin lymphoma. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 135, n. 4, p. 483–489, abr. 2011.

GAJEWSKI, T. F.; MENG, Y.; HARLIN, H. Immune suppression in the tumor microenvironment. Journal of immunotherapy, v. 29, n. 3, p. 233–240, 2006.

GAJEWSKI, T. F.; SCHREIBER, H.; FU, Y.-X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. **Nature Immunology**, v. 14, n. 10, p. 1014–1022, 18 set. 2013.

GALON, J. *et al.* Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 313, n. 5795, p. 1960–1964, 29 set. 2006.

GANDHI, M. K. Expression of LAG-3 by tumor-infiltrating lymphocytes is coincident with the suppression of latent membrane antigen-specific CD8+ T-cell function in Hodgkin lymphoma patients. **Blood**, v. 108, n. 7, p. 2280–2289, 1 out. 2006.

GAUTIER, L. *et al.* affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. **Bioinformatics**, v. 20, n. 3, p. 307–315, 12 fev. 2004.

GEGINAT, J. *et al.* The light and the dark sides of Interleukin-10 in immune-mediated diseases and cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 30, p. 87–93, ago. 2016.

GLASER, S. L. *et al.* Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease: epidemiologic characteristics in international data. **International Journal of Cancer**, v. 70, n. 4, p. 375–382, 7 fev. 1997.

GLIMELIUS, I.; DIEPSTRA, A. Novel treatment concepts in Hodgkin lymphoma. Journal of Internal Medicine, dez. 2016.

GLOGHINI, A.; BONGARZONE, I. Cell-secreted signals shape lymphoma identity. **Seminars in Cancer Biology**, mar. 2015.

GOEPFERT, P. A. *et al.* A Significant Number of Human Immunodeficiency Virus Epitope-Specific Cytotoxic T Lymphocytes Detected by Tetramer Binding Do Not Produce Gamma Interferon. **Journal of Virology**, v. 74, n. 21, p. 10249–10255, 1 nov. 2000.

GOLDEN-MASON, L. *et al.* Negative Immune Regulator Tim-3 Is Overexpressed on T Cells in Hepatitis C Virus Infection and Its Blockade Rescues Dysfunctional CD4+ and CD8+ T Cells. **Journal of Virology**, v. 83, n. 18, p. 9122–9130, 15 set. 2009.

GOODMAN, A.; PATEL, S. P.; KURZROCK, R. PD-1–PD-L1 immune-checkpoint blockade in B-cell lymphomas. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 14, n. 4, p. 203–220, 2 nov. 2016.

GOUGH, S. C.; WALKER, L. S.; SANSOM, D. M. CTLA4 gene polymorphism and autoimmunity. **Immunological reviews**, v. 204, n. 1, p. 102–115, 2005.

GREAVES, P. *et al.* Defining characteristics of classical Hodgkin lymphoma microenvironment T-helper cells. **Blood**, v. 122, n. 16, p. 2856–2863, 17 out. 2013.

GREEN, M. R. *et al.* Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. **Blood**, v. 116, n. 17, p. 3268–3277, 28 out. 2010.

GREEN, M. R. *et al.* Constitutive AP-1 activity and EBV infection induce PD-L1 in Hodgkin lymphomas and posttransplant lymphoproliferative disorders: implications for targeted therapy. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 18, n. 6, p. 1611–1618, 15 mar. 2012.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. Cell, v. 140, n. 6, p. 883–899, mar. 2010.

GRYWALSKA, E.; ROLINSKI, J. Epstein-Barr Virus–Associated Lymphomas. Seminars in **Oncology**, v. 42, n. 2, p. 291–303, abr. 2015.

GUPTA, S. *et al.* The prognostic impact of tumour-associated macrophages and Reed-Sternberg cells in paediatric Hodgkin lymphoma. **European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)**, v. 49, n. 15, p. 3255–3261, out. 2013.

HALL, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, v. 41, p. 95–98, 1999.

HARKER-MURRAY, P. D. *et al.* Stratification of treatment intensity in relapsed pediatric Hodgkin lymphoma. **Pediatric blood & cancer**, v. 61, n. 4, p. 579–586, abr. 2014.

HASSAN, R. *et al.* Epstein-Barr virus (EBV) detection and typing by PCR: a contribution to diagnostic screening of EBV-positive Burkitt's lymphoma. **Diagnostic Pathology**, v. 1, p. 17, 2006.

HERBEL, C. *et al.* Clinical significance of T cell metabolic reprogramming in cancer. **Clinical and Translational Medicine**, v. 5, n. 1, dez. 2016.

HERBST, H. *et al.* Frequent expression of interleukin-10 by Epstein-Barr virus-harboring tumor cells of Hodgkin's disease. **Blood**, v. 87, n. 7, p. 2918–2929, 1 abr. 1996.

HERTEL, C. B. *et al.* Loss of B cell identity correlates with loss of B cell-specific transcription factors in Hodgkin/Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma. **Oncogene**, v. 21, n. 32, p. 4908–4920, 25 jul. 2002.

HINZ, M. *et al.* Nuclear Factor  $\kappa$ B–dependent Gene Expression Profiling of Hodgkin's Disease Tumor Cells, Pathogenetic Significance, and Link to Constitutive Signal Transducer and Activator of Transcription 5a Activity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 196, n. 5, p. 605–617, 2 set. 2002.

HISLOP, A. D. *et al.* Cellular Responses to Viral Infection in Humans: Lessons from Epstein-Barr Virus. **Annual Review of Immunology**, v. 25, n. 1, p. 587–617, abr. 2007.

HJALGRIM, H. *et al.* Risk of Hodgkin's disease and other cancers after infectious mononucleosis. Journal of the National Cancer Institute, v. 92, n. 18, p. 1522–1528, 2000.

HJALGRIM, H. *et al.* Infectious mononucleosis, childhood social environment, and risk of Hodgkin lymphoma. **Cancer research**, v. 67, n. 5, p. 2382–2388, 2007.

HJALGRIM, H. *et al.* HLA-A alleles and infectious mononucleosis suggest a critical role for cytotoxic T-cell response in EBV-related Hodgkin lymphoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 14, p. 6400–6405, 6 abr. 2010.

HOHAUS, S. *et al.* Polymorphism in cytokine genes as prognostic markers in Hodgkin's lymphoma. **Annals of Oncology**, v. 18, n. 8, p. 1376–1381, 1 ago. 2007.

HOHAUS, S. *et al.* Clinical significance of interleukin-10 gene polymorphisms and plasma levels in Hodgkin lymphoma. **Leukemia Research**, v. 33, n. 10, p. 1352–1356, out. 2009.

HUANG, C.-T. *et al.* Role of LAG-3 in regulatory T cells. **Immunity**, v. 21, n. 4, p. 503–513, out. 2004.

HUANG, X. *et al.* HLA-A\*02:07 is a protective allele for EBV negative and a susceptibility allele for EBV positive classical Hodgkin lymphoma in China. **PloS One**, v. 7, n. 2, p. e31865, 2012.

HUANG, Y. *et al.* CD4+ and CD8+ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. **Oncotarget**, v. 6, n. 19, p. 17462–17478, 10 jul. 2015.

HUANG, Y.-H. *et al.* CEACAM1 regulates TIM-3-mediated tolerance and exhaustion. **Nature**, v. 517, n. 7534, p. 386–390, 26 out. 2014.

HUDE, I. *et al.* The emerging role of immune checkpoint inhibition in malignant lymphoma. **Haematologica**, v. 102, n. 1, p. 30–42, jan. 2017.

HUGHES, P. D. *et al.* Apoptosis Regulators Fas and Bim Cooperate in Shutdown of Chronic Immune Responses and Prevention of Autoimmunity. **Immunity**, v. 28, n. 2, p. 197–205, fev. 2008.

HURWITZ, S. N. *et al.* CD63 Regulates Epstein-Barr Virus LMP1 Exosomal Packaging, Enhancement of Vesicle Production, and Noncanonical NF-κB Signaling. Journal of Virology, v. 91, n. 5, p. e02251-16, 1 mar. 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. [s.l.] Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2015.

IRIZARRY, R. A. *et al.* Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. **Biostatistics (Oxford, England)**, v. 4, n. 2, p. 249–264, abr. 2003.

JAMESON, S. C.; MASOPUST, D. Diversity in T Cell Memory: An Embarrassment of Riches. **Immunity**, v. 31, n. 6, p. 859–871, dez. 2009.

JAYARAMAN, P. *et al.* Tim3 binding to galectin-9 stimulates antimicrobial immunity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 11, p. 2343–2354, 25 out. 2010.

JOHNSON, P. C. D. *et al.* Modeling HLA associations with EBV-positive and -negative Hodgkin lymphoma suggests distinct mechanisms in disease pathogenesis. **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, 3 fev. 2015.

JONES, R. B. *et al.* Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 12, p. 2763–2779, 24 nov. 2008.

KADIN, M. E. *et al.* Immunohistochemical evidence of a role for transforming growth factor beta in the pathogenesis of nodular sclerosing Hodgkin's disease. **The American Journal of Pathology**, v. 136, n. 6, p. 1209–1214, jun. 1990.

KAECH, S. M.; CUI, W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 11, p. 749–761, 19 out. 2012.

KAHAN, S. M.; WHERRY, E. J.; ZAJAC, A. J. T cell exhaustion during persistent viral infections. **Virology**, v. 479–480, p. 180–193, maio 2015.

KAMPER, P. *et al.* Tumor-infiltrating macrophages correlate with adverse prognosis and Epstein-Barr virus status in classical Hodgkin's lymphoma. **Haematologica**, v. 96, n. 2, p. 269–276, 1 fev. 2011.

KASAMON, Y. L. *et al.* FDA Approval Summary: Nivolumab for the Treatment of Relapsed or Progressive Classical Hodgkin Lymphoma. **The Oncologist**, v. 22, n. 5, p. 585–591, maio 2017.

KASHIO, Y. *et al.* Galectin-9 induces apoptosis through the calcium-calpain-caspase-1 pathway. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 170, n. 7, p. 3631–3636, 1 abr. 2003.

KEEGAN, T. H. M. Epstein-Barr Virus As a Marker of Survival After Hodgkin's Lymphoma: A Population-Based Study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 30, p. 7604–7613, 26 set. 2005.

KELLEY, T. *et al.* 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. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 128, n. 6, p. 958–965, 1 dez. 2007.

KELLY, K. M. Management of children with high-risk Hodgkin lymphoma. **British Journal** of Haematology, v. 157, n. 1, p. 3–13, abr. 2012.

KELLY, K. M. Hodgkin lymphoma in children and adolescents: improving the therapeutic index. **Blood**, v. 126, n. 22, p. 2452–2458, 26 nov. 2015.

KERKAR, S. P.; RESTIFO, N. P. Cellular Constituents of Immune Escape within the Tumor Microenvironment. **Cancer Research**, v. 72, n. 13, p. 3125–3130, 1 jul. 2012.

KERYER-BIBENS, C. *et al.* Exosomes released by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells convey the viral Latent Membrane Protein 1 and the immunomodulatory protein galectin 9. **BMC Cancer**, v. 6, n. 1, dez. 2006.

KHATRI, V. P.; CALIGIURI, M. A. A review of the association between interleukin-10 and human B-cell malignancies. **Cancer immunology, immunotherapy: CII**, v. 46, n. 5, p. 239–244, jul. 1998.

KHATTAR, R. *et al.* Targeted Deletion of FGL2 Leads to Increased Early Viral Replication and Enhanced Adaptive Immunity in a Murine Model of Acute Viral Hepatitis Caused by LCMV WE. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e72309, 11 out. 2013.

KIDD, P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. **Alternative Medicine Review**, v. 8, n. 3, p. 223–246, 2003.

KIS, L. L. *et al.* IL-21 imposes a type II EBV gene expression on type III and type I B cells by the repression of C- and activation of LMP-1-promoter. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 2, p. 872–877, 12 jan. 2010.

KIS, L. L. *et al.* STAT6 signaling pathway activated by the cytokines IL-4 and IL-13 induces expression of the Epstein-Barr virus-encoded protein LMP-1 in absence of EBNA-2: implications for the type II EBV latent gene expression in Hodgkin lymphoma. **Blood**, v. 117, n. 1, p. 165–174, 6 jan. 2011.

KLEIN, G.; KLEIN, E.; KASHUBA, E. Interaction of Epstein-Barr virus (EBV) with human B-lymphocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 396, n. 1, p. 67–73, maio 2010.

KLIBI, J. *et al.* Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9–containing exosomes released by Epstein-Barr virus–infected nasopharyngeal carcinoma cells. **Blood**, v. 113, n. 9, p. 1957–1966, 2009.

KNOX, J. J. *et al.* Characterization of T-Bet and Eomes in Peripheral Human Immune Cells. **Frontiers in Immunology**, v. 5, 14 maio 2014.

KOSMACZEWSKA, A. *et al.* Correlation of blood lymphocyte CTLA-4 (CD152) induction in Hodgkin's disease with proliferative activity, interleukin 2 and interferon-gamma production. **British Journal of Haematology**, v. 118, n. 1, p. 202–209, jul. 2002.

KOUKI, T. *et al.* CTLA-4 Gene Polymorphism at Position 49 in Exon 1 Reduces the Inhibitory Function of CTLA-4 and Contributes to the Pathogenesis of Graves' Disease. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 11, p. 6606–6611, 1 dez. 2000.

KREHER, S. *et al.* Cytokine and proinflammatory gene expression in classical Hodgkin lymphoma: Its more than NF- $\kappa$ B! Cytokine, v. 72, n. 1, p. 115–117, mar. 2015.

KREN, L. *et al.* Multifunctional immune-modulatory protein HLA-E identified in classical Hodgkin lymphoma: Possible implications. **Pathology - Research and Practice**, v. 208, n. 1, p. 45–49, jan. 2012.

KRISTIANSEN, O. P.; LARSEN, Z. M.; POCIOT, F. CTLA-4 in autoimmune diseases-a general susceptibility gene to autoimmunity? **Genes and immunity**, v. 1, n. 3, p. 170, 2000.

KÜPPERS, R. *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. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 23, p. 10962–10966, 1994.

KÜPPERS, R. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein–Barr virus. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 10, p. 801–812, out. 2003.

KÜPPERS, R. The biology of Hodgkin's lymphoma. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 1, p. 15–27, jan. 2009.

KÜPPERS, R.; ENGERT, A.; HANSMANN, M.-L. Hodgkin lymphoma. Journal of Clinical Investigation, v. 122, n. 10, p. 3439–3447, 1 out. 2012.

KUPPERS, R.; YAHALOM, J.; JOSTING, A. Advances in Biology, Diagnostics, and Treatment of Hodgkin's Disease. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 12, n. 1, p. 66–76, jan. 2006.

KURREEMAN, F. A. S. Transcription of the IL10 gene reveals allele-specific regulation at the mRNA level. **Human Molecular Genetics**, v. 13, n. 16, p. 1755–1762, 15 jun. 2004.

KVISTBORG, P. *et al.* Anti-CTLA-4 therapy broadens the melanoma-reactive CD8+ T cell response. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 254, p. 254ra128, 17 set. 2014.

LAMPRECHT, B. *et al.* Aberrant expression of the Th2 cytokine IL-21 in Hodgkin lymphoma cells regulates STAT3 signaling and attracts Treg cells via regulation of MIP-3alpha. **Blood**, v. 112, n. 8, p. 3339–3347, 15 out. 2008.

LARSSON, L.; RYMO, L.; BERGLUNDH, T. Sp1 binds to the G allele of the- 1087 polymorphism in the IL-10 promoter and promotes IL-10 mRNA transcription and protein production. **Genes and immunity**, v. 11, n. 2, p. 181–187, 2010.

LAURENT, S. *et al.* The engagement of CTLA-4 on primary melanoma cell lines induces antibody-dependent cellular cytotoxicity and TNF- $\alpha$  production. **Journal of Translational Medicine**, v. 11, p. 108, 1 maio 2013.

LEVITSKAYA, J. *et al.* Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein–Barr virus nuclear antigen 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 23, p. 12616–12621, 1997.

LEWONTIN, R. C. The Interaction of Selection and Linkage. I. General Considerations; Heterotic Models. **Genetics**, v. 49, n. 1, p. 49–67, jan. 1964.

LIGERS, A. *et al.* CTLA-4 gene expression is influenced by promoter and exon 1 polymorphisms. **Genes and immunity**, v. 2, n. 3, p. 145, 2001.

LIU, J. *et al.* Targeting PD-1 and Tim-3 Pathways to Reverse CD8 T-Cell Exhaustion and Enhance Ex Vivo T-Cell Responses to Autologous Dendritic/Tumor Vaccines. Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997), v. 39, n. 4, p. 171–180, maio 2016.

LIU, Y. *et al.* The microenvironment in classical Hodgkin lymphoma: An actively shaped and essential tumor component. **Seminars in Cancer Biology**, v. 24, p. 15–22, fev. 2014.

LONBERG, N.; KORMAN, A. J. Masterful Antibodies: Checkpoint Blockade. Cancer Immunology Research, v. 5, n. 4, p. 275–281, abr. 2017.

LONG, H. M. *et al.* MHC II tetramers visualize human CD4+ T cell responses to Epstein-Barr virus infection and demonstrate atypical kinetics of the nuclear antigen EBNA1 response. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 5, p. 933–949, 6 maio 2013.

LULLA, P.; HESLOP, H. E. Checkpoint inhibition and cellular immunotherapy in lymphoma. **Hematology**, v. 2016, n. 1, p. 390–396, 1 dez. 2016.

LUZURIAGA, K.; SULLIVAN, J. L. Infectious Mononucleosis. New England Journal of Medicine, v. 362, n. 21, p. 1993–2000, 27 maio 2010.

MACIVER, N. J.; MICHALEK, R. D.; RATHMELL, J. C. Metabolic Regulation of T Lymphocytes. **Annual Review of Immunology**, v. 31, n. 1, p. 259–283, 21 mar. 2013.

MAHONEY, K. M.; RENNERT, P. D.; FREEMAN, G. J. Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 8, p. 561–584, 31 jul. 2015.
MALEC, M. *et al.* Real-time polymerase chain reaction determination of cytokine mRNA expression profiles in Hodgkin's lymphoma. **haematologica**, v. 89, n. 6, p. 679–685, 2004.

MANCAO, C. *et al.* Rescue of "crippled" germinal center B cells from apoptosis by Epstein-Barr virus. **Blood**, v. 106, n. 13, p. 4339–4344, 15 dez. 2005.

MANNINO, M. H. *et al.* The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. **Cancer Letters**, v. 367, n. 2, p. 103–107, out. 2015.

MANTOVANI, A. *et al.* Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling: Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. **The Journal of Pathology**, v. 229, n. 2, p. 176–185, jan. 2013.

MARAFIOTI, T. *et al.* Hodgkin and Reed-Sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. **Blood**, v. 95, n. 4, p. 1443–1450, 2000.

MARSHALL, N. A. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. **Blood**, v. 103, n. 5, p. 1755–1762, 1 mar. 2004.

MASSINI, G.; SIEMER, D.; HOHAUS, S. EBV in Hodgkin Lymphoma. Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases, 2009.

MATHAS, S.; HARTMANN, S.; KÜPPERS, R. Hodgkin lymphoma: Pathology and biology. **Seminars in Hematology**, v. 53, n. 3, p. 139–147, jul. 2016.

MATSUKI, E.; YOUNES, A. Lymphomagenesis in Hodgkin lymphoma. Seminars in Cancer Biology, fev. 2015.

MAUZ-KÖRHOLZ, C. *et al.* Pediatric Hodgkin Lymphoma. Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology, v. 33, n. 27, p. 2975–2985, 20 set. 2015.

MBULAITEYE, S. M. *et al.* High levels of Epstein-Barr virus DNA in saliva and peripheral blood from Ugandan mother-child pairs. **Journal of Infectious Diseases**, v. 193, n. 3, p. 422–426, 2006.

MCKINNEY, E. F.; SMITH, K. G. T-cell exhaustion: understanding the interface of chronic viral and autoinflammatory diseases. **Immunology and Cell Biology**, v. 94, n. 10, p. 935–942, nov. 2016.

MECKES, D. G. *et al.* Modulation of B-cell exosome proteins by gamma herpesvirus infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 31, p. E2925–E2933, 30 jul. 2013.

MENTER, T. *et al.* Evaluation of the diagnostic and prognostic value of PDL1 expression in Hodgkin and B-cell lymphomas. **Human Pathology**, v. 54, p. 17–24, ago. 2016.

MINNICELLI, C. *et al.* Relationship of Epstein-Barr virus and interleukin 10 promoter polymorphisms with the risk and clinical outcome of childhood Burkitt lymphoma. **PloS One**, v. 7, n. 9, p. e46005, 2012.

MOORE, K. W. *et al.* Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual review of immunology**, v. 19, n. 1, p. 683–765, 2001.

MORALES, O. *et al.* Epstein-Barr virus infection induces an increase of T regulatory type 1 cells in Hodgkin lymphoma patients. **British Journal of Haematology**, v. 166, n. 6, p. 875–890, set. 2014.

MÖRMANN, M. *et al.* Mosaics of gene variations in the Interleukin-10 gene promoter affect interleukin-10 production depending on the stimulation used. **Genes and Immunity**, v. 5, n. 4, p. 246–255, jun. 2004.

MUENST, S. *et al.* Increased programmed death-1+ tumor-infiltrating lymphocytes in classical Hodgkin lymphoma substantiate reduced overall survival. **Human Pathology**, v. 40, n. 12, p. 1715–1722, dez. 2009.

MÜNZ, C. (ED.). Epstein Barr Virus Volume 2. Cham: Springer International Publishing, 2015. v. 391

MÜNZ, C. Epstein Barr virus - a tumor virus that needs cytotoxic lymphocytes to persist asymptomatically. **Current Opinion in Virology**, v. 20, p. 34–39, out. 2016.

MURRAY, P.; BELL, A. Contribution of the Epstein-Barr Virus to the Pathogenesis of Hodgkin Lymphoma. In: MÜNZ, C. (Ed.). . **Epstein Barr Virus Volume 1**. Cham: Springer International Publishing, 2015. v. 390p. 287–313.

MURRAY, P. G. *et al.* Analysis of major histocompatibility complex class I, TAP expression, and LMP2 epitope sequence in Epstein-Barr virus-positive Hodgkin's disease. **Blood**, v. 92, n. 7, p. 2477–2483, 1 out. 1998.

NADALI, G. *et al.* Serum level of the soluble form of the CD30 molecule identifies patients with Hodgkin's disease at high risk of unfavorable outcome. **Blood**, v. 91, n. 8, p. 3011–3016, 15 abr. 1998.

NAGPAL, P. *et al.* Pediatric Hodgkin lymphoma: biomarkers, drugs, and clinical trials for translational science and medicine. **Oncotarget**, v. 7, n. 41, p. 67551–67573, 11 2016.

NEBBIA, G. *et al.* Upregulation of the Tim-3/galectin-9 pathway of T cell exhaustion in chronic hepatitis B virus infection. **PloS One**, v. 7, n. 10, p. e47648, 2012.

NEWMAN, A. M. *et al.* Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. **Nature Methods**, v. 12, n. 5, p. 453–457, 30 mar. 2015.

NG, T. H. S. *et al.* Regulation of Adaptive Immunity; The Role of Interleukin-10. **Frontiers in Immunology**, v. 4, 2013.

NIEDOBITEK, G. *et al.* Frequent expression of the Epstein-Barr virus (EBV)-induced gene, EBI3, an IL-12 p40-related cytokine, in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. **The Journal of Pathology**, v. 198, n. 3, p. 310–316, nov. 2002.

NIENS, M. *et al.* HLA-A\*02 is associated with a reduced risk and HLA-A\*01 with an increased risk of developing EBV+ Hodgkin lymphoma. **Blood**, v. 110, n. 9, p. 3310–3315, 1 nov. 2007.

OAKS, M. K. *et al.* A native soluble form of CTLA-4. **Cellular Immunology**, v. 201, n. 2, p. 144–153, 1 maio 2000.

ORTAÇ, R. *et al.* Prognostic role of natural killer cells in pediatric mixed cellularity and nodular sclerosing Hodgkin's disease. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, v. 24, n. 5, p. 249–253, out. 2002.

OUDEJANS, J. J. *et al.* Analysis of major histocompatibility complex class I expression on Reed-Sternberg cells in relation to the cytotoxic T-cell response in Epstein-Barr virus-positive and -negative Hodgkin's disease. **Blood**, v. 87, n. 9, p. 3844–3851, 1 maio 1996.

PALENDIRA, U.; RICKINSON, A. B. Primary immunodeficiencies and the control of Epstein-Barr virus infection: Primary immunodeficiencies and Epstein-Barr virus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1356, n. 1, p. 22–44, nov. 2015.

PALEY, M. A. *et al.* Progenitor and terminal subsets of CD8+ T cells cooperate to contain chronic viral infection. **Science (New York, N.Y.)**, v. 338, n. 6111, p. 1220–1225, 30 nov. 2012.

PARDOLL, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 4, p. 252–264, 22 mar. 2012.

PATSOUKIS, N. *et al.* PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. **Nature Communications**, v. 6, p. 6692, 26 mar. 2015.

PAUKEN, K. E.; WHERRY, E. J. Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. **Trends in Immunology**, v. 36, n. 4, p. 265–276, abr. 2015a.

PAUKEN, K. E.; WHERRY, E. J. SnapShot: T Cell Exhaustion. Cell, v. 163, n. 4, p. 1038–1038.e1, nov. 2015b.

PETER, M. E. *et al.* The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, n. 4, p. 549–559, abr. 2015.

PIOCHE-DURIEU, C. *et al.* In Nasopharyngeal Carcinoma Cells, Epstein-Barr Virus LMP1 Interacts with Galectin 9 in Membrane Raft Elements Resistant to Simvastatin. **Journal of Virology**, v. 79, n. 21, p. 13326–13337, 1 nov. 2005. POPESCU, I. *et al.* T-bet:Eomes Balance, Effector Function, and Proliferation of Cytomegalovirus-Specific CD8 <sup>+</sup> T Cells during Primary Infection Differentiates the Capacity for Durable Immune Control. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 11, p. 5709–5722, 1 dez. 2014.

POPPEMA, S. Immunobiology and pathophysiology of Hodgkin lymphomas. **ASH Education Program Book**, v. 2005, n. 1, p. 231–238, 2005.

POSTOW, M. A.; CALLAHAN, M. K.; WOLCHOK, J. D. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 17, p. 1974–1982, 10 jun. 2015.

PUI, C. H. *et al.* Serum interleukin-2 receptor levels in Hodgkin disease and other solid tumors of childhood. **Leukemia**, v. 7, n. 8, p. 1242–1244, ago. 1993.

PURTILO, D. T. *et al.* X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency (Duncan's disease). **Lancet (London, England)**, v. 1, n. 7913, p. 935–940, 26 abr. 1975.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature Medicine**, v. 19, n. 11, p. 1423–1437, 7 nov. 2013.

RADZIEWICZ, H. *et al.* Liver-Infiltrating Lymphocytes in Chronic Human Hepatitis C Virus Infection Display an Exhausted Phenotype with High Levels of PD-1 and Low Levels of CD127 Expression. **Journal of Virology**, v. 81, n. 6, p. 2545–2553, 15 mar. 2007.

RAUTERT, R. *et al.* Elevated pretreatment interleukin-10 serum level is an International Prognostic Score (IPS)-independent risk factor for early treatment failure in advanced stage Hodgkin lymphoma. **Leukemia & lymphoma**, v. 49, n. 11, p. 2091–2098, nov. 2008.

REICH, M. et al. GenePattern 2.0. Nature Genetics, v. 38, n. 5, p. 500–501, maio 2006.

REICHEL, J. *et al.* Flow sorting and exome sequencing reveal the oncogenome of primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells. **Blood**, v. 125, n. 7, p. 1061–1072, 2015.

RESSING, M. E. *et al.* Epstein-Barr virus evasion of CD8(+) and CD4(+) T cell immunity via concerted actions of multiple gene products. **Seminars in Cancer Biology**, v. 18, n. 6, p. 397–408, dez. 2008.

REUSS, E. *et al.* Differential regulation of interleukin-10 production by genetic and environmental factors--a twin study. **Genes and Immunity**, v. 3, n. 7, p. 407–413, nov. 2002.

RICKINSON, A. B. *et al.* Cellular immune controls over Epstein–Barr virus infection: new lessons from the clinic and the laboratory. **Trends in Immunology**, v. 35, n. 4, p. 159–169, abr. 2014.

RICKINSON, A.; KIEFF, E. Epstein-Barr virus. In: **Fields' virology**. 4th. ed. Philadelphia: Lippincott–Williams and Wilkins: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, 2001. p. 2575–2627.

ROEMER, M. G. M. *et al. PD-L1* and *PD-L2* Genetic Alterations Define Classical Hodgkin Lymphoma and Predict Outcome. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 23, p. 2690–2697, 10 ago. 2016.

ROUGHAN, J. E.; THORLEY-LAWSON, D. A. The intersection of Epstein-Barr virus with the germinal center. **Journal of Virology**, v. 83, n. 8, p. 3968–3976, abr. 2009.

ROWE, M.; ZUO, J. Immune responses to Epstein-Barr virus: molecular interactions in the virus evasion of CD8+ T cell immunity. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 3, p. 173–181, mar. 2010.

SAKHDARI, A. *et al.* Tim-3 negatively regulates cytotoxicity in exhausted CD8+ T cells in HIV infection. **PloS One**, v. 7, n. 7, p. e40146, 2012.

SAKUISHI, K. *et al.* Emerging Tim-3 functions in antimicrobial and tumor immunity. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 8, p. 345–349, ago. 2011.

SAMBROOK J, FRITSCHI EF, MANIATIS T. **Molecular cloning: a laboratorymanual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANCHEZ G. plsdepot: Partial Least Squares (PLS) Data Analysis Methods. R package version 0.1.17. [s.l: s.n.].

SARAIVA, M.; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 3, p. 170–181, mar. 2010.

SCALAPINO, K. J.; DAIKH, D. I. CTLA-4: a key regulatory point in the control of autoimmune disease. **Immunological reviews**, v. 223, n. 1, p. 143–155, 2008.

SCHELLONG, G. *et al.* High cure rates and reduced long-term toxicity in pediatric Hodgkin's disease: the German-Austrian multicenter trial DAL-HD-90. The German-Austrian Pediatric Hodgkin's Disease Study Group. Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology, v. 17, n. 12, p. 3736–3744, dez. 1999.

SCHOOF, N. *et al.* Interleukin-10 Gene Polymorphisms are Associated With Freedom From Treatment Failure for Patients With Hodgkin Lymphoma. **The Oncologist**, v. 18, n. 1, p. 80–89, 1 jan. 2013.

SCHRECK, S. *et al.* Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma. **Hematological Oncology**, v. 27, n. 1, p. 31–39, mar. 2009.

SCHURICH, A. *et al.* Distinct Metabolic Requirements of Exhausted and Functional Virus-Specific CD8 T Cells in the Same Host. **Cell Reports**, v. 16, n. 5, p. 1243–1252, ago. 2016.

SCHWERING, I. *et al.* Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. **Blood**, v. 101, n. 4, p. 1505–1512, 15 fev. 2003.

SEN, D. R. *et al.* The epigenetic landscape of T cell exhaustion. Science, v. 354, n. 6316, p. 1165–1169, 2 dez. 2016.

SHAIN, K. H.; DALTON, W. S.; TAO, J. The tumor microenvironment shapes hallmarks of mature B-cell malignancies. **Oncogene**, 2 fev. 2015.

SIMONE, R. *et al.* A soluble form of CTLA-4 is present in paediatric patients with acute lymphoblastic leukaemia and correlates with CD1d+ expression. **PloS One**, v. 7, n. 9, p. e44654, 2012.

SIMONE, R. *et al.* The soluble form of CTLA-4 from serum of patients with autoimmune diseases regulates T-cell responses. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 215763, 2014.

SIMONETTA, F.; PRADIER, A.; ROOSNEK, E. T-bet and Eomesodermin in NK Cell Development, Maturation, and Function. **Frontiers in Immunology**, v. 7, 20 jun. 2016.

SISKA, P. J.; RATHMELL, J. C. T cell metabolic fitness in antitumor immunity. **Trends in Immunology**, v. 36, n. 4, p. 257–264, abr. 2015.

SKAPENKO, A. *et al.* Generation and regulation of human Th1-biased immune responses in vivo: a critical role for IL-4 and IL-10. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 172, n. 10, p. 6427–6434, 15 maio 2004.

SKINNIDER, B. F.; MAK, T. W. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. **Blood**, v. 99, n. 12, p. 4283–4297, 15 jun. 2002.

SMYTH, M. J. *et al.* Combination cancer immunotherapies tailored to the tumour microenvironment. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 13, n. 3, p. 143–158, 24 nov. 2015.

SPRANGER, S. *et al.* Mechanism of tumor rejection with doublets of CTLA-4, PD-1/PD-L1, or IDO blockade involves restored IL-2 production and proliferation of CD8+ T cells directly within the tumor microenvironment. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 2, n. 1, p. 3, 2014.

STEIDL, C. *et al.* Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 10, p. 875–885, 2010.

STEIDL, C. *et al.* MHC class II transactivator CIITA is a recurrent gene fusion partner in lymphoid cancers. **Nature**, v. 471, n. 7338, p. 377–381, 17 mar. 2011.

STEIDL, C. *et al.* Gene expression profiling of microdissected Hodgkin Reed-Sternberg cells correlates with treatment outcome in classical Hodgkin lymphoma. **Blood**, v. 120, n. 17, p. 3530–3540, 25 out. 2012.

STEIDL, C.; CONNORS, J. M.; GASCOYNE, R. D. Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma: increasing evidence of the importance of the microenvironment. Journal of

**clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 29, n. 14, p. 1812–1826, 10 maio 2011.

STEIN, L. D. Using the Reactome database. Current Protocols in Bioinformatics, v. Chapter 8, p. Unit 8.7, out. 2004.

STEPHENS, M.; SCHEET, P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. **American Journal of Human Genetics**, v. 76, n. 3, p. 449–462, mar. 2005.

STEPHENS, M.; SMITH, N. J.; DONNELLY, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. **American Journal of Human Genetics**, v. 68, n. 4, p. 978–989, abr. 2001.

SUN, T. *et al.* Functional genetic variations in cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 and susceptibility to multiple types of cancer. **Cancer Research**, v. 68, n. 17, p. 7025–7034, 1 set. 2008.

SUN, T. *et al.* Genetic Polymorphisms in Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 and Cancer: The Dialectical Nature of Subtle Human Immune Dysregulation. **Cancer Research**, v. 69, n. 15, p. 6011–6014, 1 ago. 2009.

SWERDLOW SH. International Agency for Research on Cancer., World Health Organization. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th. ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2008.

SZKLARCZYK, D. *et al.* The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D362–D368, 4 jan. 2017.

TACYILDIZ, N. *et al.* Serum levels and differential expression of intercellular adhesion molecule-1 in childhood leukemia and malignant lymphoma: prognostic importance and relationship with survival. **Pediatric Hematology and Oncology**, v. 16, n. 2, p. 149–158, abr. 1999.

TAÇYILDIZ, N. *et al.* Serum levels and differential expression of CD44 in childhood leukemia and malignant lymphoma: correlation with prognostic criteria and survival. **Pediatrics International: Official Journal of the Japan Pediatric Society**, v. 43, n. 4, p. 354–360, 2001.

TAGUCHI, F.; HIRAI-YUKI, A. Mouse Hepatitis Virus Receptor as a Determinant of the Mouse Susceptibility to MHV Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, 2012.

TAYLOR, G. S. *et al.* The Immunology of Epstein-Barr Virus–Induced Disease. **Annual Review of Immunology**, v. 33, n. 1, p. 787–821, 21 mar. 2015.

TEFT, W. A.; KIRCHHOF, M. G.; MADRENAS, J. A MOLECULAR PERSPECTIVE OF CTLA-4 FUNCTION. **Annual Review of Immunology**, v. 24, n. 1, p. 65–97, abr. 2006.

TEICHMANN, M. *et al.* Expression of the interferon-inducible chemokine IP-10 (CXCL10), a chemokine with proposed anti-neoplastic functions, in Hodgkin lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. **The Journal of Pathology**, v. 206, n. 1, p. 68–75, maio 2005.

TELLAM, J. *et al.* Regulation of protein translation through mRNA structure influences MHC class I loading and T cell recognition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 27, p. 9319–9324, 2008.

THORLEY-LAWSON, D. A. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. **Nature Reviews. Immunology**, v. 1, n. 1, p. 75–82, out. 2001.

THORLEY-LAWSON, D. A. *et al.* The pathogenesis of Epstein-Barr virus persistent infection. **Current Opinion in Virology**, v. 3, n. 3, p. 227–232, jun. 2013.

TIACCI, E. *et al.* Analyzing primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells to capture the molecular and cellular pathogenesis of classical Hodgkin lymphoma. **Blood**, v. 120, n. 23, p. 4609–4620, 29 nov. 2012.

TOPALIAN, S. L.; DRAKE, C. G.; PARDOLL, D. M. Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy. **Cancer Cell**, v. 27, n. 4, p. 450–461, abr. 2015.

TOSOLINI, M. *et al.* Clinical Impact of Different Classes of Infiltrating T Cytotoxic and Helper Cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in Patients with Colorectal Cancer. **Cancer Research**, v. 71, n. 4, p. 1263–1271, 15 fev. 2011.

TOSOLINI, M. *et al.* Large-scale microarray profiling reveals four stages of immune escape in non-Hodgkin lymphomas. **OncoImmunology**, v. 5, n. 7, p. e1188246, 2 jul. 2016.

TSIRIGOTIS, P.; SAVANI, B. N.; NAGLER, A. Programmed death-1 immune checkpoint blockade in the treatment of hematological malignancies. **Annals of Medicine**, v. 48, n. 6, p. 428–439, 17 ago. 2016.

TÜRECI, Ö. *et al.* Molecular definition of a novel human galectin which is immunogenic in patients with Hodgkin's disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 10, p. 6416–6422, 1997.

TURNER, D. M. *et al.* An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **European journal of immunogenetics: official journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics**, v. 24, n. 1, p. 1–8, fev. 1997.

TZANKOV, A.; MATTER, M. S.; DIRNHOFER, S. Refined Prognostic Role of CD68-Positive Tumor Macrophages in the Context of the Cellular Micromilieu of Classical Hodgkin Lymphoma. **Pathobiology**, v. 77, n. 6, p. 301–308, 2010.

UEDA, H. *et al.* Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. **Nature**, v. 423, n. 6939, p. 506–511, 2003.

VANDENBORRE, K. *et al.* Human CTLA-4 is expressed in situ on T lymphocytes in germinal centers, in cutaneous graft-versus-host disease, and in Hodgkin's disease. **The American Journal of Pathology**, v. 152, n. 4, p. 963–973, abr. 1998.

VARANASI, V.; KHAN, A. A.; CHERVONSKY, A. V. Loss of the death receptor CD95 (Fas) expression by dendritic cells protects from a chronic viral infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 23, p. 8559–8564, 10 jun. 2014.

VARDHANA, S.; YOUNES, A. The immune microenvironment in Hodgkin lymphoma: T cells, B cells, and immune checkpoints. **Haematologica**, v. 101, n. 7, p. 794–802, 1 jul. 2016.

VASSILAKOPOULOS, T. P. *et al.* Serum interleukin-10 levels are an independent prognostic factor for patients with Hodgkin's lymphoma. **Haematologica**, v. 86, n. 3, p. 274–281, mar. 2001.

VASSILAKOPOULOS, T. P. *et al.* Development and validation of a clinical prediction rule for bone marrow involvement in patients with Hodgkin lymphoma. **Blood**, v. 105, n. 5, p. 1875–1880, 1 mar. 2005.

VERA-LOZADA, G. *et al.* Analysis of biological and technical variability in gene expression assays from formalin-fixed paraffin-embedded classical Hodgkin lymphomas. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 97, n. 3, p. 433–439, 16 set. 2014.

VERWEIJ, F. J. *et al.* LMP1 association with CD63 in endosomes and secretion via exosomes limits constitutive NF- $\kappa$ B activation. **The EMBO journal**, v. 30, n. 11, p. 2115–2129, 2011.

VIVIANI, S. *et al.* Elevated pretreatment serum levels of Il-10 are associated with a poor prognosis in Hodgkin's disease, the milan cancer institute experience. **Medical Oncology** (Northwood, London, England), v. 17, n. 1, p. 59–63, fev. 2000.

WENIGER, M. A.; KÜPPERS, R. NF-κB deregulation in Hodgkin lymphoma. Seminars in Cancer Biology, v. 39, p. 32–39, ago. 2016.

WENINGER, W.; MANJUNATH, N.; VON ANDRIAN, U. H. Migration and differentiation of CD8+ T cells. **Immunological reviews**, v. 186, n. 1, p. 221–233, 2002.

WHERRY, E. J. *et al.* Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. **Journal of Virology**, v. 77, n. 8, p. 4911–4927, abr. 2003.

WHERRY, E. J. *et al.* Molecular Signature of CD8+ T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection. **Immunity**, v. 27, n. 4, p. 670–684, out. 2007.

WHERRY, E. J.; KURACHI, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 8, p. 486–499, 24 jul. 2015.

WHITE, J. A. *et al.* Guidelines for human gene nomenclature (1997). HUGO Nomenclature Committee. **Genomics**, v. 45, n. 2, p. 468–471, 15 out. 1997.

WHITESIDE, T. L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. **Oncogene**, v. 27, n. 45, p. 5904–5912, 6 out. 2008.

WINSLER, A. *et al.* Mother-child interaction, private speech, and task performance in preschool children with behavior problems. Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines, v. 40, n. 6, p. 891–904, set. 1999.

WU, R. *et al.* The microenvironment of classical Hodgkin lymphoma: heterogeneity by Epstein–Barr virus presence and location within the tumor. **Blood Cancer Journal**, v. 6, n. 5, p. e417, 6 maio 2016.

WU, W. *et al.* Blockade of Tim-3 signaling restores the virus-specific CD8 <sup>+</sup> T-cell response in patients with chronic hepatitis B: Immunity to infection. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 5, p. 1180–1191, maio 2012.

XIAO, T. *et al.* Tim-3 expression is increased on peripheral T cells from diffuse large B cell lymphoma. **Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 35, n. 8, p. 7951–7956, ago. 2014.

XU, J. *et al.* c-Maf Regulates IL-10 Expression during Th17 Polarization. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 10, p. 6226–6236, 15 maio 2009.

YAMAMOTO, R. *et al.* PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma. **Blood**, v. 111, n. 6, p. 3220–3224, 15 mar. 2008.

YANG, Z.-Z. *et al.* IL-12 upregulates TIM-3 expression and induces T cell exhaustion in patients with follicular B cell non-Hodgkin lymphoma. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 4, p. 1271–1282, 2 abr. 2012.

YOUNES, A.; ANSELL, S. M. Novel agents in the treatment of Hodgkin lymphoma: Biological basis and clinical results. **Seminars in Hematology**, v. 53, n. 3, p. 186–189, jul. 2016.

ZAMARIN, D.; POSTOW, M. A. Immune checkpoint modulation: Rational design of combination strategies. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 150, p. 23–32, jun. 2015.

ZHANG, L. *et al.* Prognostic value of PD-1 and TIM-3 on CD3+ T cells from diffuse large B-cell lymphoma. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 75, p. 83–87, out. 2015.

ZHANG, N.; BEVAN, M. J. CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. **Immunity**, v. 35, n. 2, p. 161–168, ago. 2011.

ZHANG, Y. *et al.* Co-expression of TIM-3 and CEACAM1 promotes T cell exhaustion in colorectal cancer patients. **International Immunopharmacology**, v. 43, p. 210–218, fev. 2017.

#### ANEXO I

Carta de aprovação do comitê de ética em pesquisa.

MINISTÉRIO DA SAÚDE Instituto Nacional de Câncer Comitê de Ética em Pesquisa-INCA IN Rio de Janeiro, 5 de setembro de 2005 Ao: Dr. Mário Henrique Magalhães Barros Pesquisador Principal ÷ Ref.: Prot. 37/05 - Prevalência do vírus Epstein-Barr no Linfoma de Hodgkin na infância na cidade do Rio de Janeiro Prezado Doutor, Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa do INCA após re-análise aprovou o Protocolo intitulado: Prevalência do vírus Epstein-Barr no Linfoma de Hodgkin na infância na cidade do Rio de Janeiro em 5 de setembro de 2005. Estamos encaminhando a documentação pertinente para a CONEP, com vistas a registro e arquivamento .. Atenciosamente, Dra. Adriana Scheliga Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa CEP-INCA

#### ANEXO II







#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação do papel de fatores genéticos e do vírus Epstein-Barr nos linfomas: na busca de um modelo multifatorial de susceptibilidade genética e resposta imune no linfoma de Hodgkin clássico

Pesquisador: Claudia Esther Alicia Rocio Hassan

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 3

CAAE: 56999916.5.0000.5274

Instituição Proponente: Centro de Transplante de Medula Óssea Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.752.286

Apresentação do Projeto:

Conforme descrito no Parecer Consubstanciado do CEP-INCA número 1.632.168, datado de 12 de julho de 2016.

#### Objetivo da Pesquisa:

Conforme descrito no Parecer Consubstanciado do CEP-INCA número 1.632.168, datado de 12 de julho de 2016.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme descrito no Parecer Consubstanciado do CEP-INCA número 1.632.168, datado de 12 de julho de 2016.

#### Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (CEP-INCA), de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12 e na Norma Operacional № 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Ressalto o(a) pesquisador(a) responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu estudo.

#### ANEXO III

## INFORMAÇÃO MÍNIMA PARA PUBLICAÇÃO EM EXPERIMENTOS DE QUANTIFICAÇÃO EM PCR EM TEMPO REAL (MIQE), SUGERIDAS POR BUSTIN *et al.* (2009).

#### **1** Desenho experimental

- <u>Grupo experimental</u>: linfonodos de crianças e adolescentes com linfoma de Hodgkin clássico (LHc), linfonodos com mononucleose infecciosa (MNI) e linfonodos com hiperplasia folicular reativa (HR)
- <u>Número de pacientes</u>: 91 LHc e 20 HR

#### 2 Amostras

- <u>Descrição:</u> linfonodos fixados e impregnados em parafina (FFPE)
- Quantidade de amostra processada: 5 cortes de parafina de 3 µm cada um
- <u>Procedimento do processamento de fixação:</u> formol 10% por 24 horas.
- <u>Tempo e condições de armazenamento das amostras:</u> 6-12 anos a 20-22°C em ambiente fechado
- 3 Extração do RNA
  - <u>Kits utilizados:</u> Máster Pure<sup>TM</sup> RNA purification kit (MP) (Epicentre<sup>®</sup>, Madison, WI) com 480 μL de solução de lise celular e de tecido e 60 μL de proteinase K 60 mg/dL a 65°C por 20 horas.
  - <u>Reagentes adicionais usados</u>: proteinase K (Invitrogen por Life Technologies<sup>TM</sup>, Carlsbad, CA) a 60 mg/dL.
  - <u>Tratamento com DNase</u>: 200 μL da solução *DNase* I (5 μL de *DNAse* I e 200 μL de 1X de tampão de DNAse) supridos pelo kit a 37°C por 30 minutos
  - <u>Avaliação de contaminação por DNA</u>: não se aplica
  - Quantificação do RNA:
    - Método e aparelho: espectrofotometria no Nanodrop<sup>®</sup> (ND-1000 Spectrophotometer, Wilmington, USA).
    - Pureza: λ260/280: 1,80 ± 0,14

 $\lambda 260/230: 1,39 \pm 0,66$ 

- Integridade do RNA:
- Método e aparelho: análise de RNA pela metodologia microfluídica na plataforma 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies)

- ➢ RIN:1,2 − 3,6
- Eletroforese: gel de agarose 1,2% em tampão fosfato (Na2HPO4 0,01M) com Gelred<sup>TM</sup> (Biotium, Inc; Hayward, CA).
- <u>Teste de inibição:</u> não realizado. Problema de inibição abordado na análise de qPCR.
- <u>Armazenamento do RNA:</u> -70°C

#### 4 Transcrição reversa

- <u>Condições da reação</u>: 2 μL tampão RT 10X, 0,8 μL dNTPs 25X, 2 μL iniciadores randômicos 10X, 1 μL de MultiScribe RT 50U/μL, 4,2 μL água livre de nucleases.
- <u>Quantidade de RNA e volume da reação</u>: 0,5 μg de RNA diluído em 10μL de água para um volume final da reação de 20μL.
- <u>Estratégia de iniciadores:</u> Uso de iniciadores hexaméricos randômicos
- Transcritase reversa e concentração: MultiScribe™ Reverse Transcriptase em 50 U/μL.
- <u>Temperatura e tempo:</u> 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos.
- <u>Fabricante e número de catálogo</u>: Applied por Life Technologies<sup>™</sup>, Carlsbad, CA com o número 4368814.
- Estocagem do cDNA: -70°C

Símbolo Gene*	# Acesso sequência	Localiz amplicon	Iniciador exon	ID do ensaio	Tam amp (pb)
CXCL10	NM_001565.3	383	3 - 4	Hs_01124251_g1	83
IFNG	NM_000619.2	495	3 - 4	Hs00989291_m1	73
IL10	NM_000572.2	510	4 - 5	Hs00961622_m1	74
STAT1	NM_000239.2	1171	9 - 10	Hs00234829_m1	79
	NM_007315.3	1171	9 - 10		
STAT6					
GUSB	NM_139266.2	1925	11 - 12	Hs99999908_m1	81
HMBS	NM_000181.3	186	1 - 2	Hs00609297_m1	64
	NM_000190.3	186	1 - 2		

## 5 Alvos de PCR em ensaios simples

\* De acordo com HUGO (WHITE *et al.*, 1997). Localiz amplicon: localização do amplicon segundo o RefSeq; Tam amp: tamanho do amplicon.

Símbolo do Gene*	# Acesso sequência	Sequência	Localiz amplicon	Iniciador exon	Ampl (pb)	Eficiência (%)	Temperatura de <i>melting</i>
	NIM 101700 2		247	1 0	60	08.2	(°C)
BILA	NM_181780.3		247	1 - 2	69	98,3	/6,94
	ND4 0050144	R: GETGTACATCACATGATTCTTTCC	504	0 0	70	101 50	70.00
flCTLA4	NM_005214.4		594	2 - 3	/9	101,52	/8,80
		ACCCAGATITATGTAATIGATCCAGA					
		R: CCGAACTAACTGCTGCAAGG					
sCTLA4	NM_001037631.2	F:	604	2 - 3	93	95,89	80,1
		ATGTAATTGCTAAAGAAAAGAAGCC					
		R: TCACATTCTGGCTCTGTTGG					
		GGCTTCTTTTCTTTAGCAATTACATA					
HAVCR2/TIM3	NM_032782.4	F: CCTGAAGTTGGTCATCAAACC	655	2 - 3	91	98,7	81,10
		R: GGTGGTAAGCATCCTTGGAA					
LAG3#	NM_002286.5	F: TGGCTTCAACGTCTCCATCA	1090	5	59	100,71	82,15
		R: CCCACCCTGGAACCTGCT					
PDCD1	NM_005018.2	F: GCACGAGGGACAATAGGAG	654	4 - 5	88	103,41	85,29
		R: CCCCATAGTCCACAGAGAACA					
CD274/PDL1	NM_014143.3	F: GCATTCCAGAAAGATGAGGA	96	2 - 3	101	100,26	78,61
		R: CCACATATAGGTCCTTGGGAA					
TBX21/TBET	NM_013351.1	F: CCAACAATGTGACCCAGATG	963	3 - 4	86	100,58	79,20
		R: CTCTCCGTCGTTCACCTCA					
EOMES	NM_001278182.1	F: GGCAAAGCCGACAATAACAT	1433	2 - 3	101	96,96	76,55
		R: TTCCCGAATGAAATCTCCTG					
GUSB	NM_000181.3	F: CCTGTGACCTTTGTGAGCAA	1563	9 - 10	70	99,67	80,0
		R: AACAGATCACATCCACATACGG					
HMBS	NM_000190.3	F: CCATGTCTGGTAACGGCAAT	156	1 - 2	63	98,27	81,30
		R: TCACTCTCATCTTTGGGCTGT					

\* De acordo com HUGO (WHITE *et al.*, 1997). #Sequência de iniciadores publicada em MORALES *et al.* (2014). Localiz amplicon: localização do amplicon segundo o RefSeq; Tam amp: tamanho do amplicon.

- <u>Screening</u> de especificidade *in silico* (BLAST): para iniciadores utilizados na metodologia de corantes intercalantes
- Variantes de *splicing* nos alvos: não se aplica

#### 6 Oligonucleotideos da qPCR

- <u>Sequência do iniciador</u>: Descrito de acordo com a localização na RefSeq
- <u>Sequência da sonda</u>: Descrito de acordo com a localização na RefSeq
- Localização e identidade de alguma modificação: não se aplica
- <u>Fabricante dos oligonucleotideos:</u> Applied por Life Technologies<sup>TM</sup>, Carlsbad, CA para a metodologia TaqMan® e Integrated DNA Technologies, Inc. na metodologia de corantes intercalantes.

#### 7 Protocolo de qPCR

- <u>Condições completa da reação:</u> no ensaio TaqMan®: volume final da reação de 15 μL: 7,5 μL TaqMan universal PCR Máster Mix 2X (cat 4304437), 0,75 μL Iniciador/Sonda 20X, 2,75 μL água livre de nucleases e 4 μL cDNA pré-amplificado. No ensaio corante intercalante por: 7,5 μL de SYBR Green Master Mix 2X (cat. 4309155), 400-900 nM de iniciadores, 1,5 μL de enhancer 5X e 3 μL de cDNA diluído 1:5.
- <u>Volume da reação e quantidade de cDNA</u>: volume final de 15 μL com 4 μL cDNA específico pré-amplificado previamente diluído 1:20 em água livre de nucleases ou 3 μL de cDNA diluído 1:5.
- <u>Concentração de iniciadores, sonda, Mg<sup>++</sup> e dNTP</u>: padrão no reagente TaqMan universal PCR Máster Mix e SYBR Green Master Mix (Applied, Life Technologies<sup>TM</sup>). Iniciadores nos ensaios corantes intercalantes entre 400 e 900 nM.
- <u>Identificação e concentração da polimerase:</u> padrão no reagente TaqMan universal PCR Máster Mix e SYBR Green Master Mix (Applied, Life Technologies<sup>TM</sup>)
- <u>Aditivos:</u> no ensaio corante intercalante, 1,5 µL de enhancer 5X constituído pelas concentrações finais de 2,7 M de betaina (Sigma B-0300), 6,7 mM de DTT (Invitrogen) e 6,7% de DMSO (Sigma D-8418).
- <u>Fabricante das placas e número de catálogo</u>: Applied Biosystems, número de catálogo 4346907

<u>Parâmetros completos da termociclagem:</u> ensaios TaqMan®: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos. 50 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Ensaios corante intercalante: 95°C por 10 minutos. 50 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto e finalmente, uma etapa de dissociação e avaliação de curva de *melting*.

• <u>Fabricante do instrumento de qPCR:</u> Viia<sup>TM</sup> 7, Applied Biosystems.

## 8 Validação de qPCR

- <u>Especificidade:</u> gel de agarose 3%
- <u>NTC:</u> Cq >40
- <u>Curva Standard com pendente e intercepção em y</u>: ensaios TaqMan<sup>®</sup>, Cqs 17,0 19,3 Ensaios corantes intercalante: Cts 17,4 – 24,34.
- <u>PCR eficiência (inclinação):</u> ensaios corantes intercalante, entre 95,89% 103,41%.
- $\underline{R^2}$  da curva standard: ensaios corantes intercalante entre 0,994 0,999.
- <u>Faixa dinâmica linear</u>: 5 log<sub>10</sub>
- <u>Variação do Cq no limite baixo:</u> DP≤0,5
- <u>Evidencia para o limite de detecção:</u> não determinado
- <u>Multiplex, eficiência e LOD para cada ensaio:</u> não determinado

### 9 Data analise

- <u>Programa de análise de qPCR (fonte, versão)</u>: Genex enterprise (MultiD analyses)
- <u>Método de determinação Cq:</u> Ct (ciclo de *threshold*)
- <u>Identificação e disposição dos outliers:</u> teste Grubbs
- <u>Resultados dos NTCs:</u> Cq>40
- Justificação do número de genes de referência selecionados: foram selecionados os dois genes mais estável descritos para LHc reportado por Sanchez-Espiridion *et al*, Clin Cancer Res 2009;1367:15(4).
- <u>Calibração:</u> não se aplica
- <u>Descrição do método de normalização</u>: Ct<sub>GENE</sub> DE REFERÊNCIA</sub> Ct<sub>GENE</sub> DE INTERESSE</sub>; em que o Ct de referência foi a média de dois genes de referência
- <u>Número e estado (qPCR) de replicatas técnicas:</u> 2 qPCR
- <u>Métodos estatísticos para a significância dos resultados:</u> teste de *T-student* ou *Mann-Whitney* para 2 amostras independentes e teste *Spearman* para correlações bivariadas.
- <u>Software (fonte e versão):</u> SPSS 20.0

#### ANEXO IV

#### TABELAS SUPLEMENTARES

- Tabela S1: Características epidemiológicas e infecção do vírus Epstein-Barr em um grupo de linfonodos de pacientes controles diagnosticados com Hiperplasia folicular reativa incluídos em parafina, que ingressaram aos laboratórios do CEMO entre os anos 2002-2007
- **Tabela S2:** Anticorpos usados na caracterização por imunohistoquímica das células do microambiente tumoral
- Tabela S3: Frequência dos genótipos no promotor da *IL10* em pacientes pediátricos diagnosticados com linfoma de Hodgkin clássico e em um grupo controle de Hiperplasias reativas foliculares
- **Tabela S4:** Análises da sobrevida global (SG) em pacientes pediátricos diagnosticados com linfoma de Hodgkin clássico de acordo aos genótipos e haplótipos construídos a partir dos SNPs avaliados no promotor do gene *IL10*
- Tabela S5: Correlação dos genes do *checkpoint* imune avaliados por RT-qPCR com a composição celular linfocitária do microambiente tumoral no grupo de pacientes pediátricos diagnosticados com linfoma de Hodgkin clássico
- **Tabela S6:** Frequência dos genótipos e haplótipos no gene *CTLA4* em pacientes pediátricos diagnosticados com linfoma de Hodgkin clássico
- Tabela S7: Características clínicas, epidemiológicas e do *status* do vírus Epstein-Barr do grupo de pacientes diagnosticados com linfoma de Hodgkin clássico do subconjunto de dados GSE13996
- **Tabela S8:** Genes relacionados à assinatura de exaustão celular superexpressos no linfoma de Hodgkin clássico

**Anexo IV, Tabela S1**: Características epidemiológicas e infecção do vírus Epstein-Barr em um grupo de linfonodos de pacientes controles diagnosticados com hiperplasia folicular reativa incluídos em parafina, que ingressaram aos laboratórios do CEMO entre os anos 2002-2007

Características	Casos analisados	Valor percentual (%)
Idade (Anos)		
Faixa: 4-83 anos		
<u>≤</u> 18 anos	5/20	25,0%
> 18 anos	15/20	75,0%
Sexo		
Feminino	11/20	55,0%
Masculino	9/20	45,0%

Anticorpo	Clone	Fabricante	Diluição	Tampão	Marcação	Tipo celular
CD3	Policlonal	DakoCytomation	1:50	EDTA	Membrana	Linfócitos T
CD4	1F6	Novocastra	1:50	EDTA	Membrana	Linfócitos T
CD8	C8/144B	DakoCytomation	1:50	EDTA	Membrana	Linfócitos T citotóxicos
CD14	7	Novocastra	1:50	Citrato	Membrana	Monócitos – precursores mieloides
CD20	L-26	DakoCytomation	1:1000	Citrato	Membrana	Linfócitos B
CD68	PG-M1	DakoCytomation	1:250	EDTA	Membrana	Macrófagos
CD83	1H4b	Novocastra	1:20	EDTA	Membrana	Dendríticas
CD163	10D6	Novocastra	1:400	Citrato	Membrana	Macrófagos
CD207	12D6	Abcam	1:100	EDTA	Membrana	Dendríticas
FOXP3	22510	Abcam	1:150	EDTA	Nuclear	Linfócitos T reguladores
GRZB	GrB-7	DakoCytomation	1:90	Citrato	Citoplasma	Linfócitos T citotóxicos
MAF	M-153	Santa Cruz	1:50	EDTA	Nuclear	Células que expressam IL10
PD1	RMP1-14	Abcam	1:200	EDTA	Membrana	Células exaustas
TBET	4B10	Santa Cruz	1:50	EDTA	Nuclear	Linfócitos Th1
TIA1	TIA1	Abcam	1:150	Citrato	Citoplasma	Linfócitos T Citotóxicos

Anexo IV, Tabela S2: Anticorpos usados na caracterização por imunohistoquímica das células do microambiente tumoral

Genótipo	Casos	Porcentagem	Casos	Porcentagem
	analisados		analisados	
LHc			HR	
Posição -1082 A>G				
AA	37/98	37,8%	7/20	15,0%
AG	44/98	44,9%	10/20	50,0%
GG	17/98	17,3%	3/20	35,0%
Posição -592 C>A				
CC	52/97	53,6%	13/20	65,0%
AC	33/97	34,2%	7/20	35,0%
AA	12/97	12,4%	0/20	00,0%
Haplótipos				
GCC	61/96	63,5%	13/20	65,0%
ACC	48/96	50,0%	12/20	60,0%
ATA	45/96	46,9%	7/20	35,0%

**Anexo IV, Tabela S3:** Frequência dos genótipos no promotor da *IL10* em pacientes pediátricos diagnosticados com linfoma de Hodgkin clássico e em um grupo controle de Hiperplasias reativas foliculares

O haplótipo foi construído a partir das posições -1082A/G, -819C/T e -592C/A do promotor proximal no gene de *IL10*. LHc: Linfoma de Hodgkin clássico; HR: Hiperplasia folicular reativa.

	Número de	HR (Expβ)	IC (9	5%) univar.	Univar.	HR (Expβ)	IC (95	5%) multivar.	Multivar.
variavel	eventos	univar.	Inferior	Superior	<i>P</i> -valor	multivar.	Inferior	Superior	<i>P</i> -valor
-1082IL10									
GG	1/17				<i>P</i> =0,671#				
AG	5/41	0,703	0,282	1,597	$P = 0,408 \text{\pounds}$	0,957	0,346	2,286	$P = 0,926 \text{\pounds}$
AA	5/36								
GG	1/17				<i>P</i> =0,429#				
AG+AA	10/77	0,635	0,068	2,729	P=0,584£	0,901	0,093	4,135	$P = 0,907 \text{\pounds}$
-592IL10									
AA	6/50				<i>P</i> = 0,369#				
AC	2/32	1.078	0.410	2.521	$P = 0.870 \pounds$	1.210	0.414	3.156	P = 0.707 £
CC	2/11	<b>y</b>	-, -	7-		<b>y</b> -	- 7	- /	- 7
CC	6/50				<i>P</i> =0,585#				
AC+AA	4/43	1,368	0,414	4,944	P=0,607£	1,445	0,381	6,295	<i>P</i> =0,590£
Haplótipos									
ACC	6/46				<i>P</i> =0,524#	1,393	0,344	6,698	$P = 0.647 \text{\pounds}$
ATA+ GCC	4/46	1,448	0,439	5,233	P=0,543£		,	,	,
ATA	4/43				<i>P</i> = 0,590#	0,623	0,138	2,426	<i>P</i> =0,497£
GCC+ ACC	6/49	0,735	0,203	2,424	<i>P</i> =0,612£	,	,	, -	<b>7</b>
GCC	6/58				P = 0.722 #	1.192	0.285	5.572	$P = 0.809 \text{\pounds}$
ACC+ATA	4/34	0,765	0,232	2,768	P = 0.666 £	-,	-,+	- ,	,

Anexo IV, Tabela S4. Análises de sobrevida global (SG) em pacientes pediátricos com linfoma de Hodgkin clássico, segundo os genótipos e haplótipos no promotor do gene *IL10*.

# *P*-valor calculado pelo teste de *log-rank*. £ Razão de chance (HR, do inglês: *hazard ratio*) e *P*-valor calculado mediante a estratégia de correção de Firth. Em análise multivariada foram consideradas as seguintes variáveis: número de sítios extranodal, maior número de células granzima B+ (mediana >25% do número de células no microambiente tumoral), presencia de leucopenia, subtipo histológico celularidade mista. IC: intervalo de confiança; Univar: univariada; Multivar: multivariada.

					Célu	llas/mm <sup>2</sup>				
GDI	PD1	CD3	CD4	FOXP3	CD8	TIA1	GRZB	TBET	MAF	CD20
BTLA	0,277*	0,413**	0,259*	-0,016	0,272*	0,260*	0,079	0,132	-0,057	0,278*
P-valor	0,026	0,001	0,039	0,899	0,025	0,035	0,521	0,295	0,660	0,024
CTLA4	-0,118	0,309*	0,019	0,221	0,012	0,066	-0,053	-0,257*	0,040	0,147
P-valor	0,348	0,012	0,880	0,070	0,922	0,597	0, 673	0,040	0,757	0,237
LAG3	0,131	0,285*	0,184	-0,090	0,166	0,280*	0,098	0,248*	0,085	0,054
P-valor	0,297	0,020	0,147	0,466	0,175	0,023	0,427	0,046	0,510	0,665
PDCD1	0,408**	0,205	0,313*	-0,088	0,297*	0,185	0,237	0,181	0,332**	0,073
P-valor	0,001	0,099	0,012	0,474	0,014	0,138	0,051	0,149	0,008	0,559
CD274/PDL1	-0,093	0,006	0,132	0,084	0,032	0,276*	0,301*	0,216	0,139	-0,300*
P-valor	0,459	0,961	0,298	0,498	0,793	0,025	0,012	0,084	0,283	0,015
HAVCR2/TIM3	0,119	-0,11	0,152	-0,005	0,171	0,186	0,395***	0,228*	0,494***	-0,133
P-valor	0,307	0.342	0,189	0.968	0,131	0,108	<0,001	0,050	<0,001	0,250
TBX21/TBET	0,104	0,117	0,296*	0,078	0,269*	0,323**	0,362**	0,319**	0,178	-0,004
P-valor	0,412	0,351	0,018	0,529	0,027	0,008	0,002	0,010	0,165	0,975
EOMES	0,236	0,153	0,143	-0,220	0,187	0,218	0,210	0,157	0,138	-0,035
P-valor	0,059	0,220	0,259	0,071	0,127	0,079	0,086	0,211	0,284	0,778

Anexo IV, Tabela S5: Correlação dos genes do *checkpoint* imune avaliados por RT-qPCR com a composição celular linfocitária do microambiente tumoral no grupo de pacientes pediátricos diagnosticados com linfoma de Hodgkin clássico

*P-valor* obtido pelo teste de *Spearman*. \* *P*< 0,05; \*\* *P*<0,01; \*\*\* *P*<0,001.

Variante genética	Casos analisados	Porcentagem
Genótipo		
Posição +49 A>G		
AA	44/95	46,3%
AG	38/95	40,0%
GG	13/95	13,7%
Posição CT60 G>A		
GG	36/90	40,0%
AG	39/90	43,3%
AA	15/90	16,7%
Haplótipos		
+49A/CT60A	51/89	57,3%
+49A/CT60G	46/89	51,7%
+49G/CT60G	46/89	51,7%
+49G/CT60A	5/89	5,6%

**Anexo IV, Tabela S6:** Frequência dos genótipos e haplótipos no gene *CTLA4* em pacientes pediátricos diagnosticados com linfoma de Hodgkin clássico

O haplótipo foi construído a partir das posições +49A/G e CT60A/G, através do software PHASE.

Características clínicas e	Casas analisadas	Valor porcontual (%)
epidemiológicas	Casos anansauos	valor percentuar (70)
Idade		
Crianças	10/64	15,6
Adultos	54/64	84,4
Subtipo histológico		
Esclerose nodular	42/64	65,6
Celularidade mista	17/64	26,6
Depleção linfocitária	1/64	1,6
Inclassificável	4/64	6,3
Desfecho		
Favorável	21/62	33,9
Desfavorável	41/62	66,1
Status do EBV		
Positivo	18/53	34,0
Negativo	35/53	66,0

**Anexo IV, Tabela S7**: Características clínicas, epidemiológicas e do *status* do vírus Epstein-Barr do grupo de pacientes diagnosticados com linfoma de Hodgkin clássico do subconjunto de dados GSE13996

Dados obtidos através do geo2r (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/).

Simbola J-			Símbolo do				
SIMD010 <b>0</b> 0	Sonda	Fold change	SIMDOIO do	Sonda	Fold change		
gene		0	gene#		0		
Receptores inibita	órios		Citocinas, quimo	quinas e fatores de	crescimento		
LAG3	206486_at	3,581	CCL4	204103_at	3,401		
CTLA4	221331_x_at	3,184	IFNG	210354_at	2,671		
PTGER4	204897_at	2,630	XCL1	206366_x_at	2,450		
ΡΠ ΡΔ	222218 s at	3 373	Canais de				
	222210_5_dt	5,525	cálcio				
	219788_at	2,068	PTPN13	204201_s_at	4,861		
Receptores de sup	perfície celular e lig	gantes	S100A9	203535_at	3,863		
IL1R2	205403_at	31,121	AIF1	209901_x_at	2,612		
	211372_s_at	11,279	S100A8	214370_at	2,419		
KLRB1	214470_at	9,554	SLC25A24	204342_at	2,393		
CD86	205686_s_at	4,920	Apoptose, morte	celular, caspases e	anexinas		
	210895_s_at	3,941	ANXA1	201012_at	2,766		
	205685_at	2,484	ANXA4	201301_s_at	2,77		
CXCR6	211469_s_at	4,644		201302_at	2,601		
	206974_at	4,135	PERP	217744_s_at	4,362		
LY96	206584_at	3,511	BCL2A1	205681_at	4,200		
LILRB4	210152_at	3,433	PHLDA1	217996_at	3,193		
CD80	207176_s_at	3,096	Biologia da mem	brana e transporte	de vesículas		
CD14	201743_at	3,317	SNX10	218404_at	4,668		
CD44	212014 x at	2,055	EMP1	201324 at	3,640		
	210916 s at	2,049		201325 s at	2,006		
	204490 s at	2,046		201325 s at	2,006		
	204490 s at	2.046	PLSCR1	202430 s at	2.787		
	204489 s at	2.039	Ciclo celular		,		
SIRPA	202897 at	2.065	BTG3	205548 s at	2.659		
PGRMC1	201121 s at	2.676	Metabolismo		,		
	201121_s_at	2.374	GGH	203560 at	3.437		
Fatores de transc	ricão	_,	0011	200000 <u>_</u>	PRDX4		
NFIL3	203574 at	7 002	NUDT4	212183 at	2.822		
SAP30	20207at	4 083	COOI0B	219397 at	2,639		
HOPX	201500_A_at	3 615	ADPRM	220606 s at	2,035		
NAR1	209272 at	3 232	GCH1	200000 <u>s_</u> at	2,131		
	$209272_{\rm at}$	2 047	DHRS7	$20+22+_5_a$	2,400		
	$211139_{s_at}$	2,047	Outras	210700_3_dt	2,002		
GARPR1	201618 s at	2,047	I YN	218729 at	3 98/		
7FR2	204018_s_at	2,505		210729_at	3,730		
LED2 MVCRD	203003_8_at	2,320	HISTIHIC	$217975_at$	3,737		
	$203339_8_{at}$	2,274		$209398_{at}$	3,122 2,591		
	$210302_8_a$	2,202		$201645_s_a$	2,561		
I GIF I CDEM	203313_8_at	2,214		202337_at	2,339		
CKEM	209907_s_at	2,104	UNED1	215585_at	2,490		
	$20/030_{s_at}$	∠,094 2,072		213/93_8_at	2,489		
<i>a</i> , , , <i>,</i>	214508_x_at	2,073	DINAJBO	209015_s_at	2,302		
Glicosilação	2000.40	0.045	MS4A6A	219666_at	2,277		
LGALS3	208949_s_at	3,347	GABARAPL2	209046_s_at	2,270		
Protease			GNPTAB	212959_s_at	2,222		
SERPINI1	205352_at	2,321	-	-	-		

**Anexo IV, Tabela S8:** Genes relacionados à assinatura de exaustão celular superexpressos no linfoma de Hodgkin clássico

A lista de genes encontra-se integrada por 64 genes. # De acordo com HUGO (WHITE et al., 1997).

#### ANEXO V



**Curvas ROC referentes aos níveis de RNAm em relação ao** *status* **de recaída em pacientes pediátricos com linfoma de Hodgkin clássico.** A: razão dos níveis de expressão de *EOMES* e *TBX21 (TBET) (EOMES/TX21)*; B: Níveis de RNAm da isoforma solúvel *CTLA4 (sCTLA4)*; C: razão dos níveis de expressão das isoformas solúvel e *full lenght* de *CTLA4 (sCTLA4/flCTLA4)*. A seta representa o melhor ponto de corte obtido através da análise. A linha preta representa a curva ROC. A linha cinza representa a linha referência diagonal.

## ANEXO VI

# Assinatura de expressão gênica associada à exaustão celular de linfócitos T CD8+ em humanos

Símbolo	Código no banco de genes	FDR	Fold change
FGL2	NM_008013	0,00108	17,86471
PLEK	NM_019549	0,00108	16,77474
ZDHHC2	NM_178395	0,00108	16,56957
NFIL3	NM_017373	0,00108	15,49532
ENTPD1	NM_009848	0,00108	15,24354
IL18RAP	NM_010553	0,00108	14,53757
CASP4	NM_007609	0,00108	14,45850
ZEB2	NM_015753	0,00108	14,28250
AREG	NM_009704	0,00108	14,16838
LILRB4	NM_013532	0,00108	13,86318
SLAMF7	NM_144539	0,00108	13,70658
NR4A2	NM_001139509	0,00108	13,45335
IFNG	NM_008337	0,00108	13,43167
GEM	NM_010276	0,00108	12,02065
CXCL10	NM_021274	0,00108	11,80755
GZMK	NM_008196	0,00108	11,67524
DDX43	NM_001191044	0,00108	11,52570
CYSLTR2	NM_133720	0,00108	11,33830
RGS16	NM_011267	0,00108	11,00622
CXCL3	NM_009140	0,00108	10,74225
SERPINB9	NM_009256	0,00108	10,63941
EEA1	NM_001001932	0,00108	10,28947
OCIAD2	NM_026950	0,00108	9,63943
CD200R1L	NM_207244	0,00108	9,50354
TRPS1	NM_032000	0,00108	9,30274
DENND4A	NM_001162917	0,00108	9,09780
PDCD1	NM_008798	0,00108	8,79800
CCL4	NM_013652	0,00108	8,67628

Símbolo	Código no banco de genes	FDR	Fold change
CX3CR1	NM_009987	0,00108	8,66924
PRDM1	NM_007548	0,00108	8,65794
SETBP1	NM_053099	0,00108	8,64221
CCL5	NM_013653	0,00108	8,33603
SIRPB1	NM_001002898	0,00108	7,54783
RGS1	NM_015811	0,00108	7,45144
CCR2	NM_009915	0,00108	7,36121
CAMK2N1	NM_025451	0,00108	7,32542
CD38	NM_007646	0,00108	7,26126
MYADM	NM_001093765	0,00108	7,22006
CTLA4	NM_009843	0,00108	7,20087
CD244	NM_018729	0,00108	7,16254
GPX8	NM_027127	0,00108	7,04406
SYTL2	NM_001040085	0,00108	6,76495
INSL6	NM_013754	0,00108	6,71630
IFI16	NM_008329	0,00108	6,69867
LY96	NM_016923	0,00108	6,56551
JCHAIN	NM_152839	0,00108	6,49133
APOBEC2	NM_009694	0,00108	6,46978
CXorf21	NM_001163539	0,00108	6,42674
PIK3AP1	NM_031376	0,00108	6,26689
CA5B	NM_181315	0,00108	6,25449
GZMA	NM_010370	0,00108	6,24912
CENPK	NM_021790	0,00108	6,24845
ELL2	NM_138953	0,00108	6,23005
ALCAM	NM_009655	0,00108	6,03655
PTPRJ	NM_008982	0,00108	6,03152
PTPN13	NM_011204	0,00108	5,99015
TIGIT	NM_001146325	0,00108	5,97247
CXCR3	NM_009910	0,00108	5,90170
SMIM3	NM_134133	0,00108	5,80035
TRDN	NM_029726	0,00108	5,77451
CHST11	NM_021439	0,00108	5,75796
KLRG1	NM_016970	0,00108	5,64873

Continuação da lista anterior

Símbolo	Código no banco de genes	FDR	Fold change	Símbolo	Código no banco de genes	FDR	Fold change
ARSB	NM_009712	0,00108	5,63240	ATXN7L1	NM_028139	0,00108	4,65400
S1PR5	NM_053190	0,00108	5,59774	CLGN	NM_009904	0,00108	4,63663
CD80	NM_009855	0,00108	5,59642	NCAPG	NM_019438	0,00108	4,57685
ESM1	NM_023612	0,00108	5,59106	DOCK5	NM_177780	0,00108	4,50623
CENPE	NM_173762	0,00108	5,54846	BORCS7	BC027506	0,00108	4,49971
PLSCR1	NM_011636	0,00108	5,35643	PHLDA1	NM_009344	0,00108	4,48517
SHCBP1	NM_011369	0,00108	5,31949	OAS1	NM_145211	0,00108	4,46492
RAP2A	NM_029519	0,00108	5,30932	KIF11	NM_010615	0,00108	4,45871
GCH1	NM_008102	0,00108	5,26199	CRYBG3	NM_174848	0,00108	4,45870
MKI67	NM_001081117	0,00108	5,25804	SAMSN1	NM_023380	0,00108	4,43050
IL1R2	NM_010555	0,00108	5,23909	LITAF	NM_019980	0,00108	4,41936
DAPK2	NM_010019	0,00108	5,23227	GGH	NM_010281	0,00108	4,41458
PLEKHF1	NM_024413	0,00108	5,17377	KLRB1	NM_001159904	0,00108	4,37355
LOC728392	NM_134022	0,00108	5,16626	MARCKSL1	NM_010807	0,00108	4,36357
ANXA2	NM_007585	0,00108	5,11673	LGALSL	NM_173752	0,00108	4,35234
RORA	NM_013646	0,00108	5,10977	SPRY2	NM_011897	0,00108	4,31881
CHPT1	NM_144807	0,00108	5,10671	BUB1	NM_001113179	0,00108	4,28188
DEPDC1	NM_001172092	0,00108	5,06247	S100A8	NM_013650	0,00108	4,26571
LAG3	NM_008479	0,00108	4,99813	CKS2	NM_025415	0,00108	4,21431
COQ10B	NM_001039710	0,00108	4,97214	MS4A6A	NM_026835	0,00108	4,19885
ANXA1	NM_010730	0,00108	4,94848	CPEB2	NM_175937	0,00108	4,19325
NRP1	NM_008737	0,00108	4,91303	COBLL1	NM_177025	0,00108	4,17672
TBX21	NM_019507	0,00108	4,88027	SPC25	NM_025565	0,00108	4,15461
S100A6	NM_011313	0,00108	4,87933	ZFAND4	NM_001081317	0,00108	4,14516
HEATR9	NM_001045543	0,00108	4,85837	DDX28	NM_028038	0,00108	4,13225
MLKL	NM_029005	0,00108	4,84031	DDIAS	NM_001080995	0,00108	4,12076
TTC39B	NM_027238	0,00108	4,80588	CASC5	NM_029617	0,00108	4,10307
HAVCR2	NM_134250	0,00108	4,79295	IFITM3	NM_025378	0,00108	4,08430
BCL2A1	NM_007536	0,00108	4,78342	ITGB1	NM_010578	0,00108	4,07551
STK39	NM_016866	0,00108	4,78193	TOP2A	NM_011623	0,00108	4,05198
C15orf48	NM_001004174	0,00108	4,70842	ATP2B4	NM_001167949	0,00108	4,03812
SAMD3	NM_001115154	0,00108	4,67456	CHN2	NM_001163640	0,00108	4,03575
XCL1	NM_008510	0,00108	4,66612	CDC42EP3	NM_026514	0,00108	4,01527

Continuação da lista anterior

Símbolo	Código no banco de genes	FDR	Fold change	Símbolo	Código no banco de genes	FDR	Fold change
KLRC1	NM_001136068	0,00108	38,19139	DSCC1	NM_183089	0,00108	3,43578
FASLG	NM_010177	0,00108	34,76971	MYO1F	NM_053214	0,00108	3,42335
CASP1	NM_009807	0,00108	30,57963	ALOX5AP	NM_009663	0,00108	3,41684
CCL3L3	NM_011337	0,00108	30,25447	ITGAX	NM_021334	0,00108	3,38674
PHF11	NM_172603	0,00108	3,94706	CLEC4D	NM_010819	0,00108	3,37557
KIF4A	NM_008446	0,00108	3,92653	ARL5B	NM_029466	0,00108	3,37086
CREM	NM_001110856	0,00108	3,89220	PTGER4	NM_001136079	0,00108	3,34408
ITGAM	NM_001082960	0,00108	3,85626	SYTL3	NM_031395	0,00108	3,34170
CCNA2	NM_009828	0,00108	3,85122	SGOL2	NM_199007	0,00108	3,34090
EOMES	NM_010136	0,00108	3,84440	C14orf28	BC099503	0,00108	3,33744
TTC39C	NM_028341	0,00108	3,83825	SLC9A7	NM_177353	0,00108	3,33488
IFIH1	NM_027835	0,00108	3,83012	ENPP1	NM_008813	0,00108	3,32093
NUSAP1	NM_133851	0,00108	3,81997	NSMAF	NM_010945	0,00108	3,31064
PGLYRP1	NM_009402	0,00108	3,81921	VPS37B	NM_177876	0,00108	3,29844
IER3	NM_133662	0,00108	3,81060	NCAPG2	NM_133762	0,00108	3,28535
HLA-DQB1	NM_207105	0,00108	3,80693	Clorf21	NM_197990	0,00108	3,28248
NR4A3	NM_015743	0,00108	3,77189	TCEAL9	NM_011712	0,00108	3,26412
GALNT3	NM_015736	0,00108	3,70753	CCDC109B	NM_025779	0,00108	3,22333
F2RL2	NM_010170	0,00108	3,67876	GABARAPL1	NM_020590	0,00108	3,22116
<i>CD44</i>	NM_009851	0,00108	3,66953	IL10RA	NM_008348	0,00108	3,20110
ABCB1	NM_011076	0,00108	3,66863	RPA2	NM_011284	0,00108	3,19057
CHSY1	NM_001081163	0,00108	3,61961	ZC3H12C	NM_001162921	0,00108	3,17940
FCER1G	NM_010185	0,00108	3,61200	MAP1LC3B	NM_026160	0,00108	3,17196
CCNB2	NM_007630	0,00108	3,58143	HIST1H1C	NM_015786	0,00108	3,15589
ZNF442	NM_001099327	0,00108	3,56086	AKR1E2	NM_018859	0,00108	3,15329
IL18R1	NM_008365	0,00108	3,55082	Clorf54	BC028528	0,00108	3,15059
GSAP	NM_175437	0,00108	3,52139	ACADL	NM_007381	0,00108	3,14370
S100A9	NM_009114	0,00108	3,51629	TNFSF4	NM_009452	0,00108	3,13478
TRPC1	NM_011643	0,00108	3,50105	ICOS	NM_017480	0,00108	3,13241
SNX10	NM_028035	0,00108	3,49814	CARHSP1	NM_025821	0,00108	3,12910
TNFRSF1B	NM_011610	0,00108	3,49278	BCL2L11	NM_207680	0,00108	3,11613
DIAPH3	NM_019670	0,00108	3,45351	CXorf40B	BC024574	0,00108	3,11557
THEMIS2	NM_001033308	0,00108	3,44761	GNPTAB	NM_001004164	0,00108	3,10978

Continuação da lista anterior

Símbolo	Código no banco de genes	FDR	Fold change	Símbolo	Código no banco de genes	FDR	Fold change
FCGR3A	NM_144559	0,00108	3,10871	ATF6	NM_001081304	0,00108	2,84843
NEIL3	NM_146208	0,00108	3,10544	MIS18BP1	NM_172578	0,00108	2,84735
KIF15	NM_010620	0,00108	3,10211	NAIP	NM_010872	0,00108	2,84241
CD14	NM_009841	0,00108	3,09630	FAM92A1	NM_026558	0,00108	2,82361
MPEG1	NM_010821	0,00108	3,08581	RUNX2	NM_001146038	0,00108	2,80147
NR4A1	NM_010444	0,00108	3,08313	SPC24	NM_026282	0,00108	2,80014
AIF1	NM_019467	0,00108	3,06386	PTP4A1	NM_011200	0,00108	2,79116
ANXA4	NM_013471	0,00108	3,05139	SAP30	NM_021788	0,00108	2,77464
AHNAK	NM_009643	0,00108	3,04881	GPR141	NM_181754	0,00108	2,76845
TNFAIP3	NM_009397	0,00108	3,02816	SLC4A7	NM_001033270	0,00108	2,76476
CENPH	NM_021886	0,00108	3,02197	CENPL	NM_027429	0,00108	2,76256
BTG3	NM_009770	0,00108	3,01910	SERPINI1	NM_009250	0,00108	2,75805
BHLHE40	NM_011498	0,00108	24,14997	CLSPN	NM_175554	0,00108	2,74435
CCR5	NM_009917	0,00108	20,49297	PBK	NM_023209	0,00108	2,73777
CHD7	NM_001081417	0,00108	2,99851	ACOT7	NM_133348	0,00108	2,73593
RYBP	NM_019743	0,00108	2,99284	DYNLT3	NM_025975	0,00108	2,72825
GXYLT1	NM_001033275	0,00108	2,99201	TOX	NM_145711	0,00108	2,71875
PRC1	NM_145150	0,00108	2,98710	CENPF	NM_001081363	0,00108	2,70813
KIAA1524	NM_172616	0,00108	2,98301	SRGAP3	NM_080448	0,00108	2,70492
AP1S2	NM_026887	0,00108	2,97067	HOPX	NM_175606	0,00108	2,69758
NUF2	NM_023284	0,00108	2,95827	LY86	NM_010745	0,00108	2,68838
FAM129A	NM_022018	0,00108	2,94704	STARD10	NM_019990	0,00108	2,68053
PGRMC1	NM_016783	0,00108	2,94269	RSAD2	NM_021384	0,00108	2,67789
PHACTR2	NM_001195096	0,00108	2,92375	ITGA1	NM_001033228	0,00108	2,66871
IL1B	NM_008361	0,00108	2,92316	LXN	NM_016753	0,00108	2,66810
PTPN3	NM_011207	0,00108	2,91643	LGALS3	NM_001145953	0,00108	2,66372
NFKBIA	NM_010907	0,00108	2,91315	ERCC6L	NM_146235	0,00108	2,65885
ATXN1	NM_009124	0,00108	2,90279	PERP	NM_022032	0,00108	2,65226
RBBP8	NM_001081223	0,00108	2,89953	PRF1	NM_011073	0,00108	2,63402
SLC25A24	NM_172685	0,00108	2,89796	MED7	NM_025426	0,00108	2,63178
H1F0	NM_008197	0,00108	2,89324	PON3	NM_173006	0,00108	2,61635
TMEM140	NM_197986	0,00108	2,88291	CEACAM1	NM_001039185	0,00108	2,61481
LAMC1	NM_010683	0,00108	2,87854	IRF4	NM_013674	0,00108	2,60971

Continuação da lista anterior

Símbolo	Código no banco de genes	FDR	Fold change	Símbolo	Código no banco de genes	FDR
PRDX4	NM_016764	0,00108	2,60512	WHSC1	NM_001081102	0,00108
GADD45B	NM_008655	0,00108	2,60009	ARHGAP26	NM_175164	0,00108
NUDT4	NM_027722	0,00108	2,59890	NCAPH	NM_144818	0,00108
GMNN	NM_020567	0,00108	2,59808	IFI44	NM_133871	0,00108
ARAP2	NM_178407	0,00108	2,58228	SYPL1	NM_013635	0,00108
PILRA	NM_153510	0,00108	2,57792	HSPA1A	NM_010479	0,00108
EHD4	NM_133838	0,00108	2,57637	GABARAPL2	ENSMUST0000034428	0,00108
VCPKMT	NM_001033236	0,00108	2,57562	CCNYL1	NM_001097644	0,00108
BATF	NM_016767	0,00108	2,57303	FCGR2B	NM_001077189	0,00108
LMNB1	NM_010721	0,00108	2,57093	HOMER1	NM_147176	0,00108
ASPM	NM_009791	0,00108	2,56788	TGIF1	NM_009372	0,00108
RILPL2	NM_030259	0,00108	2,56298	TMEM163	NM_028135	0,00108
GPD2	NM_010274	0,00108	2,55672	ZFP69	NM_001005788	0,00108
HSPA13	NR_027492	0,00108	2,55516	AIM1	NM_172393	0,00108
CEP55	NM_001164362	0,00108	2,54707	RABGAP1L	NM_013862	0,00108
TYROBP	NM_011662	0,00108	2,54424	IFNGR1	NM_010511	0,00108
TMEM37	NM_019432	0,00108	2,52878	C18orf54	BC057927	0,00108
PRIM1	NM_008921	0,00108	2,52734	FABP5	NM_010634	0,00108
GBP4	NM_018734	0,00108	2,52708	IFITM2	NM_030694	0,00108
FBXO30	NM_027968	0,00108	2,51880	USP18	NM_011909	0,00108
SKA3	NM_198605	0,00108	2,51186	LRRCC1	NM_001163579	0,00108
MYL4	NM_010858	0,00108	2,51182	MYO5A	NM_010864	0,00108
YBX3	NM_139117	0,00108	2,51102	MXI1	NM_010847	0,00108
EID3	NM_025499	0,00108	2,51023	MXD1	NM_010751	0,00108
MGST1	NM_019946	0,00108	2,50590	SLFN12L	NM_011410	0,00108
METTL7A	NM_027334	0,00108	2,48950	RMDN2	NM_201361	0,00108
CCNE2	NM_009830	0,00108	2,48861	NAB1	NM_008667	0,00108
AP3S1	NM_009681	0,00108	2,48054	SNX16	NM_029068	0,00108
GIMAP7	NM_146167	0,00108	2,47693	PRELID2	NM_029942	0,00108
PPM1J	NM_027982	0,00108	2,46832	SERTAD1	NM_018820	0,00108
SUV39H2	NM_022724	0,00108	2,45940	DSTN	NM_019771	0,00108
SYCE2	NM_001168246	0,00108	2,45886	ARHGAP18	NM_176837	0,00108
CST3	NM_009976	0,00108	2,45576	EMP1	NM_010128	0,00108

Fold change

2,45203

2,45021

2,44905

2,44608

2,43960

2,43873

2,43500

2,42742

2,41699

2,38458

2,38117

2,37674

2,37580

2,37222

2,37042

2,36771

2,36290

2,35430

2,35178

2,30997

2,30342

2,30199

2,29855

2,29724

2,28527

2,28064

2,27598

2,26946

2,26871

2,26039

2,25940

2,25671

2,25598

Continuação da lista anterior

Símbolo	Código no banco de genes	FDR	Fold change	Símbolo	Código no banco de genes	FDR	Fold change	
CD86	NM_019388	0,00108	2,25140	RAB39B	NM_175122	0,00108	2,10437	
CDKN1A	NM_007669	0,00108	2,24632	CCNC	NM_016746	0,00108	2,10197	
CMKLR1	NM_008153	0,00108	2,24269	CEP85L	ENSMUST0000095691	0,00108	2,09308	
IMPACT	NM_008378	0,00108	2,22937	ITIH5	NM_172471	0,00108	2,09167	
KIF18A	NM_139303	0,00108	2,22898	SFMBT1	NM_001166532	0,00108	2,08990	
MTHFS	NM_001128601	0,00108	2,22743	ZGRF1	NM_197997	0,00108	2,08549	
DUS2	NM_025518	0,00108	2,22732	TICRR	NM_029835	0,00108	2,08477	
PNP	NM_013632	0,00108	2,22591	DNAJB6	NM_001037941	0,00108	2,08266	
LIN54	NM_001115010	0,00108	2,22344	POPDC2	NM_001081984	0,00108	2,08248	
DGKH	NM_001081336	0,00108	2,22045	MAP3K8	NM_007746	0,00108	2,07894	
SIRPA	NM_007547	0,00108	2,21249	SWAP70	NM_009302	0,00108	2,07819	
FIGNL1	NM_001163359	0,00108	2,21222	ADPRM	NM_025510	0,00108	2,07217	
HIP1	NM_146001	0,00108	2,20594	RAPH1	NM_001045513	0,00108	2,07126	
UBALD2	NM_176902	0,00108	2,20291	CRELD2	NM_029720	0,00108	2,06857	
CLEC12A	NM_177686	0,00108	2,18785	ORAI1	NM_175423	0,00108	2,06359	
FAM49A	NM_029758	0,00108	2,18335	RFC3	NM_027009	0,00108	2,06203	
GABPB1	NM_207669	0,00108	2,18162	DYNLL2	NM_026556	0,00108	2,05912	
CD7	NM_009854	0,00108	2,17815	<i>CCDC186</i>	NM_170757	0,00108	2,05811	
IFIT1B	NM_008331	0,00108	2,17574	NDC80	NM_023294	0,00108	2,05678	
C21orf91	NM_025967	0,00108	2,17456	TMEM2	NM_031997	0,00108	2,05160	
STMN1	NM_019641	0,00108	2,17433	DHRS7	NM_025522	0,00108	2,04567	
MAPKAPK2	NM_008551	0,00108	2,16837	FOXO3	ENSMUST00000105502	0,00108	2,04075	
NFKBIZ	NM_030612	0,00108	2,15892	HLA-DRB5	NM_010382	0,00108	2,03908	
KIF14	NM_001081258	0,00108	2,15825	SAP30L	NM_001081168	0,00108	2,03442	
PLK4	NM_011495	0,00108	2,15218	DTL	NM_029766	0,00108	2,02755	
DBF4	NM_013726	0,00108	2,14438	LOC81691	NM_028129	0,00108	2,02697	
KIAA1143	NM_025419	0,00108	2,14086	CERS4	NM_026058	0,00108	2,02650	
KIF22	NM_145588	0,00108	2,13164	RBM47	NM_178446	0,00108	2,00495	
<i>GLCCI1</i>	NM_133236	0,00108	2,12548	CXCR6	NM_030712	0,00108	2,00401	
TACC3	NM_001040435	0,00108	2,12466	TTK	NM_009445	0,00108	2,00244	
NMB	NM_026523	0,00108	2,11934	PTPN4	NM_019933	0,00108	2,00175	
CCDC34	NM_026613	0,00108	2,11423	IFIT3	NM_001005858	0,00108	2,00120	
MYCBP	NM_019660	0,00108	2,10905	FDR: False discovery rate.				

#### **ANEXO VII**



Gráfico de preenchimento de espaço (*space-filling*) das vias identificadas através do REACTOME da assinatura do estado celular de exaustão de linfócitos T CD8+. As vias identificadas com poder estatístico (FDR<0,05) são representadas em amarelo. Cada nó representa uma via, e o tamanho do nó reflete o número de entidades (proteínas, pequenas moléculas, genes) pertencentes a essa via. As arestas representam a conexão entre os diferentes nós das vias dentro da hierarquia utilizada no REACTOME. O nó central dentro de cada via é o nó de nível superior (pai). Cada sub-nível (via filha) representado como um nó é projetado para fora do nó central e conectado à via seguinte segundo a hierarquia, até que a via do nível inferior seja atingido.
## **ANEXO VIII**

## LISTA DE ARTIGOS PUBLICADOS, EM SUBMISSÃO OU EM PREPARAÇÃO

- <u>Vera-Lozada G</u>, Scholl V, Barros MH, Sisti D, Guescini M, Stocchi V, Stefanoff CG, Hassan R. *Analysis of biological and technical variability in gene expression assays from formalin-fixed paraffin-embedded classical Hodgkin lymphomas*. Exp Mol Pathol. 2014 Dec;97(3):433-9.
- Barros MH, Segges P, <u>Vera-Lozada G</u>, Hassan R, Niedobitek G. Macrophage polarization reflects T cell composition of tumor microenvironment in pediatric classical Hodgkin lymphoma and has impact on survival. PLoS One. 2015 May 15;10(5):e0124531. doi: 10.1371
- <u>Gabriela Vera-Lozada</u>, Carolina Minnicelli, Priscilla Segges, Gustavo Stefanoff, Gerald Niedobitek, Mário Henrique M. Barros, Rocio Hassan. "Interleukin 10 (IL10) proximal promoter polymorphisms beyond clinical response in classical Hodgkin lymphoma: Exploring the basis for the genetic control of the tumor microenvironment" (Em submissão).
- <u>Gabriela Vera-Lozada</u>, Priscilla Segges, Claudio Gustavo Stefanoff, Mário Henrique M. Barros, e Rocio Hassan. "Pathway-focused gene expression profiles identify CASP-3 and microenvironment-derived gene expression associated with prognosis in children and adolescents with classical Hodgkin lymphoma" (Em submissão).
- <u>Gabriela Vera-Lozada</u>, Paula Alves, Gerald Niedobitek, Mário Henrique M. Barros, Rocio Hassan. "TIM3 expression and TBET/EOMES expression ratios are correlated with Granzyme B+ lymphocyte number and impact on the therapeutic response in pediatric patients with classical Hodgkin lymphoma" (Em preparação).

Contents lists available at ScienceDirect







journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexmp

## Analysis of biological and technical variability in gene expression assays from formalin-fixed paraffin-embedded classical Hodgkin lymphomas



Gabriela Vera-Lozada <sup>a</sup>, Vanesa Scholl <sup>a</sup>, Mário Henrique M. Barros <sup>b</sup>, Davide Sisti <sup>c</sup>, Michele Guescini <sup>c</sup>, Vilberto Stocchi <sup>c</sup>, Claudio Gustavo Stefanoff <sup>d</sup>, Rocio Hassan <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Bone Marrow Transplantation Center, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, Brazil

<sup>b</sup> Institute for Pathology, Unfallkrankenhaus Berlin, Berlin, Germany

<sup>c</sup> Department of Biomolecular Sciences, University of Urbino Carlo Bo Via I Maggetti, Urbino, Italy

<sup>d</sup> Coordination of Clinical Research, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, Brazil

#### ARTICLE INFO

Article history: Received 5 September 2014 Accepted 12 September 2014 Available online 16 September 2014

Keywords: RT-qPCR FFPE-RNA ANOVA-nested design Experimental variability Inhibitors Cy<sub>0</sub> method

#### ABSTRACT

Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues are invaluable sources of biological material for research and diagnostic purposes. In this study, we aimed to identify biological and technical variability in RT-qPCR TaqMan® assays performed with FFPE-RNA from lymph nodes of classical Hodgkin lymphoma samples. An ANOVA-nested 6-level design was employed to evaluate *BCL2*, *CASP3*, *IRF4*, *LYZ* and *STAT1* gene expression. The most variable genes were *CASP3* (low expression) and *LYZ* (high expression). Total variability decreased after normalization for all genes, except by *LYZ*. Genes with moderate and low expression were identified and suffered more the effects of the technical manipulation than high-expression genes. Pre-amplification was shown to introduce significant technical variability, which was partially alleviated by lowering to a half the amount of input RNA. *Ct* and *Cy*<sub>0</sub> quantification methods, based on cycle-threshold and the kinetic of amplification curves, respectively, were compared. *Cy*<sub>0</sub> method resulted in higher quantification values, leading to the decrease of total variability in *CASP3* and *LYZ* genes. The mean individual noise was 0.45 (0.31 to 0.61 SD), indicating a variation of gene expression over ~ 1.5 folds from one case to another. We showed that total variability in RT-qPCR from FFPE-RNA is not higher than that reported for fresh complex tissues, and identified gene-, and expression level-sources of biological and technical variability, which can allow better strategies for designing RT-qPCR assays from highly degraded and inhibited samples.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissues are invaluable sources of biological material for pathologic analysis and molecular diagnosis (Fairley et al., 2012). However, in this type of sample, recovery of RNA appropriate for molecular analysis is complicated by degradation and the cross-link between RNA and proteins after formaldehyde fixation (Masuda et al., 1999).

E-mail address: chassan@inca.gov.br (R. Hassan).

Reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR) is the gold standard technique for gene expression analysis, however, in FFPE samples amplification is affected by both, degradation and the presence of co-extracted inhibitors, leading to amplification at high values of cycles of quantification (Cq) (Godfrey et al., 2000; Koch et al., 2006), hence associated with increased variability and loss of linearity.

Besides the technical restrictions imposed by the nature of the RNA-FFPE samples, there is an underscored aspect of gene expression studies, which is the complexity of the tissue investigated. This factor imposes the amount of biological variability to be surpassed in order to detect a meaningful biological difference (Kitchen et al., 2010). In this respect, classical Hodgkin lymphoma (cHL) is one of the most complex cancers known; where tumor cells account for only 0.5–2% of tumor mass and are surrounded by variable numbers and types of inflammatory cells (Steidl et al., 2011). Gene expression profiles (GEP) corresponding to both, tumor and microenvironment compartments have been identified in this disease and have shown to carry useful prognostic information (Chetaille et al., 2009; Sánchez-Aguilera et al., 2006). This has lead to an ongoing interest in the development of sets of qPCR assays based on FFPE-RNA (Sanchez-Espiridion et al., 2010; Scott et al., 2013;

Abbreviations: BCL2, B-cell CLL/lymphoma2; CASP3, caspase 3; cHL, classical Hodgkin lymphoma; Cq, cycles of quantification; Ct, cycle threshold; CV, coefficient of variation; FFPE, formalin-fixed and paraffin-embedded; GOI, genes of interest; GUSB, glucuronidase beta; HMBS, hydroxymethylbilane synthase; IRF4, interferon regulatory factor 4; LN, lymph node; LYZ, lysozyme (renal amyloidosis); MIQE, Minimum Information for Publication of Quantitative Real-time PCR Experiments; Pre-Amp, pre-amplification; qPCR, quantitative real time PCR; REFG, reference gene; RIN, RNA integrity number; RT, reverse transcription; RT-qPCR, reverse transcription quantitative real-time PCR; SD, standard deviation; STAT1, signal transducer and activator of transcription 1.

<sup>\*</sup> Corresponding author at: Oncovirology Laboratory, Bone Marrow Transplantation Center (CEMO), Instituto Nacional de Câncer — INCA, Praça Cruz Vermelha 23, 6° Andar, 20230-130, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Venkataraman et al., 2014) to be used for clinical prediction in cHL, but no study has yet evaluated the sources of variability in RT-qPCR assays from FFPE-RNA.

Different approaches have been proposed for evaluating the variability in RT-qPCR assays (Bengtsson et al., 2008; Tichopad et al., 2009; Weaver et al., 2010). Among them, the nested-ANOVA design is a hierarchical approach suited to quantify the biological differences among subjects and the technical noise introduced by sample processing; each subject receives one treatment condition, and errors are linearly accumulative in each level (Fisher, 1935; Quinn and Keough, 2002).

In this work, we applied experimental designs as well as quantification approaches to evaluate specific RT-qPCR assays from FFPE-samples from cHL lymph nodes, in order to obtain useful information for diagnostic and prognostic test development.

#### 2. Material and methods

Minimum Information for Publication of Quantitative Real-time PCR Experiments (MIQE) is listed in Appendix A.

#### 2.1. Ethics statement

This study has been approved by the Instituto Nacional de Câncer (INCA) Ethics Committee, and has been performed in accordance with the ethical standards of the Declaration of Helsinki. Samples from patients were used after signed informed consent.

#### 2.2. Samples

FFPE lymph nodes (LN) from 25 cHL diagnosed at the INCA, Brazil were included in the initial phase of this study. For the ANOVA-nested PCR assay, three subjects with cHL of the nodular sclerosis histological subtype were selected from the initial group by an experienced pathologist (MHMB), based on extensive immunohistochemistry characterization (Barros et al., 2010; Barros et al., 2012), and availability of two different FFPE-blocks from the same LN with similar tumor/stroma proportions.

#### 2.3. Extraction of total RNA from FFPE lymph nodes

Total RNA was obtained from five microtomized sections using a Master Pure<sup>TM</sup> RNA purification Kit, Epicentre, following the supplier instructions except by the use of 480 µl tissue-and-cell-lysis solution with 60 µl of 60 mg/ml proteinase K (Invitrogen) and incubation at 65 °C for 20 h (Chen et al., 2007), followed by a treatment with 5 U/µl *DNasel* at 37 °C for 30 min. RNA was resuspended in 12 µl of RNase-free water (Appendix A).

#### 2.4. Reverse transcription

Reverse transcription (RT) was performed with the High-capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Life Technologies) from 1  $\mu$ g of total RNA in 20  $\mu$ l final volume (10  $\mu$ l of diluted RNA and 10  $\mu$ l RT mix). The reaction was incubated at 25 °C for 10 min and at 37 °C for 120 min in a Veriti<sup>TM</sup> Thermal Cycler (Applied Biosystems).

#### 2.5. Pre-amplification step

Pre-amplification (Pre-Amp) was performed with the TaqMan® PreAmp Master Mix (Applied Biosystems) in a 10 µl-multiplex reaction which included primers and probes for all assays. According to the supplier, multiplex assays were designed to include up to 100 primers/ probe sets, without introducing significant variability (Applied, 2010). Pre-Amp products were diluted 1:20 in RNase/DNase-free water and used for qPCR analysis.

#### 2.6. qPCR assays

PCR quantifications were performed in an ABI7000 (Applied Biosystems) using TaqMan® chemistry, in duplicate, using cycle threshold (*Ct*) with fixed thresholds. The mean qPCR accepted standard deviation (SD) was 0.15 cycles. Additionally, kinetic parameters of the curve were used to calculated the  $Cy_0$  as described (Guescini et al., 2008), based on Richards' equation with five parameters. This method does not require the assumption of similar efficiency in amplification of the genes of interest (GOI) and reference genes.

GOI were selected based on previous descriptions of clinically relevant genes in cHL (Sánchez-Espiridión et al., 2009) (Appendix A), and *GUSB* and *HMBS* were used as reference genes (REFG). RT-qPCR assay efficiencies ranged from 94.9 to 100.8% (Appendix B, Fig. B.1). All values of relative expression were expressed as  $2^{-\Delta Cq}$ .

#### 2.7. Performance of RNA extractions

RNA quantity and quality were evaluated by spectrophotometry (Nanodrop®, ND-1000 Spectrophotometer) at OD 260 and OD 260/280/230 ratios; and by microfluidics technology for RNA integrity number (RIN) algorithm (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies). *Ct*-values < 35 cycles of both REFG amplifications defined an "amplifiable" sample.

#### 2.8. Nested assay

A nested 6-level design  $(3 \times 2 \times 2 \times 2 \times 2 \times 2)$  was used to investigate the source of variability (biological and technical), in which two different FFPE blocks from the same LN from 3 cHL cases were analyzed, with duplicated RNA extractions, followed by duplicated retrotranscriptions, Pre-Amp and qPCR steps (Fig. 1).

#### 2.9. Statistical analyses

Mann–Whitney's test was used to analyze associations between dichotomous and continuous non-normal variables, Wilcoxon signed-rank test was used to test the relation between paired samples and Spearman's test was used for correlating continuous variables. The linear model of the biological and technical processing effects was calculated as described by Tichopad et al. (2009) as:  $Cq_{ijklmn} = \mu + a_i + b_{j(i)} + c_{k(ji)} + d_{I(kji)} + e_{m(Ikji)} + f_{n(mIkji)}$ .

Analyses were performed by nested-ANOVA of 6 factors with random effects. Variance partition was calculated as:  $100 \times \sigma_x^2/\sigma_{Cq'}^2$ , being x = *i*, *j*, *k*, *l*, *m*, *n*; as described in Kitchen et al. (2010). Statistical analyses were carried out with GENEX enterprise (MultiD), SPC (BPI Consulting, LLC) and Statistical Package for the Social Sciences 20.0 (SPSS) software. Figures were constructed with the GraphPad Prism 6 and Photoshop CC software.

#### 3. Results

#### 3.1. RNA extraction and GOI expression

From the 25 selected cHL LN, RNA mean yield was 696.3 ng/µl  $\pm$  578.4 SD. DNA purity was acceptable, with means 260/280 OD ratio of 1.81  $\pm$  0.16, and 260/230 OD ratio of 1.75  $\pm$  0.36. RIN values ranged from 2.2 to 4.8 (mean 2.46).

Pre-Amp procedure resulted in a significant gain of sensitivity, the inclusion of this step leading to an average increase of  $10.1 \pm 1.5$  Ct in *GUSB* amplifications.

Expression levels of GOI are shown in Table 1 and Fig. 2. Means varied from  $2^{-\Delta Ct}$  4.300 to -3.911, allowing genes to be classified in highly expressed (*LYZ*, *STAT1* and *IRF4*), moderately expressed (*BCL2*), and low expressed genes (*CASP3*).



Fig. 1. Nested-ANOVA design of experiment.

#### 3.2. Identification of sources of variability by a nested-ANOVA assay

The first experiment aimed to evaluate the performance of REFG, showing that *GUSB* performed better than *HMBS* (*Ct* means 23.085 SD  $\pm$  0.120 vs. 24.017 SD  $\pm$  0.139 for *HMBS*). Subjects #1 and #2 consistently crossed threshold at 2 *Ct*-values before subject #3 in REFG and the 5 analyzed GOI (Appendix B, Fig. B.2). This variability might have been caused by the presence of inhibitors in subject #3, or by unrecognized technical issues. Since the observed inter-subject variability may reflect the actual conditions when working with biological samples we decided to analyze the three subjects together.

*GUSB Ct* values were evaluated in 5 independent plates, and the assays were considered reproducible, with inter-assay variation of 2.07% CV for subject #1, 1.71% CV for subject #2, and 2.03% CV for subject #3 (mean CV 1.94%).

# Table 1 Relative expression levels and variability of genes of interest (GOI) in a group of 25 Hodg-kin lymphoma samples.

GOI	Median $2^{-\Delta Ct}$	Mean $2^{-\Delta Ct}$	SD	95% CI
LYZ STAT1 IRF4 BCL2 CASP3	4.300 3.181 1.100 	4.328 3.267 1.243 1.922 3.889	$\pm 1.270 \\ \pm 0.902 \\ \pm 1.240 \\ \pm 1.547 \\ \pm 2.066$	4.020-4.637 3.004-3.530 0.989-1.497 -(2.230-1.615) -(4.182-3.595)

SD: standard deviation; CI: confidence interval.

GOI mean expression recorded in the nested-ANOVA assays fell into the 95% coefficient interval of the whole group means (Table 1), and total variability values, calculated as the sum of biological and technical variability in the nested-assay, agreed with the SD of the whole group, for each of the analyzed GOI, as can be concluded by a comparison of means and total SDs in Tables 1 and 2.

#### 3.3. Partition of variability (Ct-values)

The biological variability was >80% for all genes (Fig. 3A; Table C.1). Significant technical variability arose in the LN (*LYZ*); RNA (1.3% *LYZ* to 7.1% *CASP3*) and Pre-Amp stages (0.6% *IRF4* to 6.0% *CASP3*) (Fig. 3A; Appendix C, Table C.1). Analysis of the cumulative SD of *Ct*-values showed that *LYZ* was the gene with the highest total variability, while *IRF4* and *STAT1* exhibited the lowest total variability (Fig. 3B; Appendix C, Table C.2).

#### 3.4. Effect of normalization on variability

Normalization allows referring expression levels to the amount of nucleic acid input (Bustin et al., 2009; Pfaffl, 2006; Vandesompele et al., 2002) but not necessarily leading to a decrease of variability (Kitchen et al., 2010). In our assays, after normalization, the total variability decreased for all GOI (mean SD  $\pm$  0.65), except for *LYZ* (Table 2; Fig. 4A). Regarding biological variability, *LYZ* showed the highest (SD  $\pm$  0.832) and *STAT1*, the lowest variability (SD  $\pm$  0.090) (Table 2). Variability in the RNA step decreased, while the technical



**Fig. 2.** Classification of genes by expression levels in 3 cases of classical Hodgkin lymphoma evaluated in the Nested design. In the box plot, the bar inside the box represents the median expression for each gene, the variation around the bar represents the values between 25 and 75 quartiles and the whiskers represent de minimum and maximum quantification value. Each value was expressed in  $2^{-\Delta Ct}$  after normalization with a reference gene (*GUSB*).

variability introduced by the Pre-Amp step persisted significant for all genes.

#### 3.5. Sources of variability according to gene expression level

Variability was analyzed in respect of expression levels, since previous work showed the effect of the gene expression level in the way that variability affects a given gene (Tichopad et al., 2009). Genes of moderate and lower expression suffered more the effects of the technical manipulation than genes of higher expression (average SD  $\pm$  0.930 vs.  $\pm$  0.541, respectively). *STAT1* and *IRF4* were less affected by the technical variability, while *CASP3* exhibited a profound technical effect (Table 2).

#### 3.6. Modifications of the pre-amplification step to reduce variability

A new set of five-level nested-ANOVA assays were designed (LN, RNA, RT, Pre-Amp and qPCR), aiming to evaluate the impact of assay modifications in variability. For this purpose, subject #2 (less variability and lower *Ct* values) was chosen, and *CASP3* (low expression and



**Fig. 3.** Total variation attributed to each level of the nested-ANOVA assay in *Ct* values for reference genes and genes of interest. A: Percent partition; B: total standard deviation.

highest technical variability) and *STAT1* (high expression and lowest technical variability) were tested as GOI.

The initial Pre-Amp protocol (14 cycles and 1:20 final dilution) was changed to (i) 14 cycles, 1:10 dilution; and (ii) 10 cycles, 1:10 dilution, with no improvement in the technical variability introduced for each gene. Modification in the input RNA (1.0 to 0.5 µg, maintaining 14 cycles, 1:20 dilution), leads to a decrease of the biological and technical variability in *Ct*-values (*CASP3* and *STAT1*) and  $\Delta$ *Ct*-values (*STAT1*)

#### Table 2

Nested-ANOVA assay-estimation of variability in subjects and sample processing steps in  $2^{-\Delta C t}$  and  $2^{-\Delta C y0}$  values.

	$\Delta Ct$ gene	s of interest				$\Delta Cy_0$ gen	es of interes	st		
	LYZ	STAT1	IRF4	BCL2	CASP3	LYZ	STAT1	IRF4	BCL2	CASP3
Means	4.218	3.029	1.422	-1.679	-4.340	4.322	4.537	1.832	-2.004	-3.412
Biological variability										
Inter-subjects (SD)	0.832	0.090	0.491	0.548*	0.318	1.163**	0.314	0.516	0.567*	0.000
Technical variability										
Lymph nodes (SD)	0.601*	0.154	0.248*	0.000	0.170	0.000	0.229	0.224*	0.163*	0.346
RNA (SD)	0.208	0.000	0.066	0.120	0.280	0.000	0.104	0.042	0.000	0.207
RT (SD)	0.000	0.139	0.145	0.173	0.134	0.264	0.000	0.130	0.217	0.000
Pre-Amp (SD)	0.485**	0.346**	0.194**	0.362**	0.547**	0.430**	0.235**	0.201**	0.295**	0.666**
qPCR (SD)	0.106	0.103	0.090	0.124	0.120	0.136	0.177	0.184	0.352	0.112
Total technical variability (sum SD)	1.400	0.742	0.743	0.779	1.251	0.830	0.745	0.781	1.027	1.331
Total variability (sum SD biological and technical)	2.232	0.832	1.234	1.327	1.569	1.993	1.059	1.297	1.594	1.331
Total noise (SD)	1.024	0.388	0.533	0.624	0.702	1.070	0.454	0.560	0.669	0.712
Individual noise (SD)	0.601	0.346	0.306	0.405	0.610	0.448	0.342	0.334	0.460	0.651

\* *P*-value < 0.05; \*\* *P*-value < 0.01.

*Ct*: threshold cycle; *Cy*<sub>0</sub>: *Cy*<sub>0</sub>: *Cy*<sub>0</sub> quantification; SD: standard deviation. RT: retrotranscription; Pre-Amp: pre-amplification; qPCR: quantitative real-time PCR. Total noise was calculated as the accumulative variation expressed in SD values of all quantifications in  $2^{-\Delta Cq}$  values for the 3 subjects as if they had been obtained independently. Individual noise was calculated as  $\sum$  SD for each  $\Delta Cq$  by subjects, being *Cq* values expressed either as *Ct* or *Cy*<sub>0</sub>. *P*-values obtained from nested ANOVA analyses.



**Fig. 4.** Distribution of the cumulative standard deviation by biological and technical steps after normalization. A:  $\Delta Ct$  values. B:  $\Delta Cy$ 0 values.

(Appendix B, Fig. B.3). Reducing to half (2.5 to  $1.25 \mu$ l) the amount of cDNA in Pre-Amp reactions did not lead to additional variability decrease.

#### 3.7. Evaluation of quantification methods: $Cy_0$ vs. Ct

The nested-ANOVA results were re-evaluated with  $Cy_0$ -values, aiming to identify a putative effect of inhibitors in PCR reactions. Significantly higher expression values in  $Cy_0$  quantifications were observed (96 qPCR) for all genes (P < 0.001, Wilcoxon test), except for *LYZ* (P = 0.120).

In general, variability in each of the ANOVA-levels was similar regardless of the quantification method (Ct or  $Cy_0$ ). However, with the last method, the total biological variability decreased for LYZ and CASP3, whereas technical variability was not affected. The Pre-Amp variability was unaffected by the quantification method or gene analyzed, indicating that the error introduced in this stage is specific of this technical step and not gene- or inhibitor-dependent (Table 2 and Fig. 4B).

#### 4. Discussion

Nowadays, much emphasis is being placed on the collection of precise information about pre-analytical and analytical qPCR conditions to contribute to science repeatability and technical reproducibility, which is led by initiatives such as the MIQE proposal (Bustin et al., 2009). In the gene-expression biomarker validation setting, where qPCR methodologies have a consolidated place, reproducibility is indeed a great concern; however, migrating from discovery technologies to routine RT-qPCR assays has not yet reached the optimal validation and analysis tools observed in other areas of molecular diagnosis (Murphy and Bustin, 2009). Tichopad et al. (2009) were the first to apply a nested ANOVA design to investigate the extent of the variability included in each experimental stage, and showed that the biological variability increases along with the complexity of tissues, being higher in the solid tissues than in peripheral blood and cell lines. They also described a not-yet-understood gene-specific component that affects variability. This approach has not been applied for the evaluation of FFPE-RNA; thus, we sought to expand the design for its application in this troublesome type of samples.

In our study, the total noise observed for the REFG (SD mean, 23.55 + 1.45 cycles) was similar to those reported for *ACTB* expression in fresh solid tissue (liver) (Kitchen et al., 2010). The GOI mean total noise (1.57 cycles  $\pm$  1.17–1.68, excluding *LYZ*) was also similar to that published for fresh tissues (mean 1.3; SD  $\pm$  1.0–1.7), indicating that using RNA-FFPE does not lead to a significant increase of variability in RT-qPCR assays.

The technical variability was higher in our study than in the reference work (Tichopad et al., 2009) (SD mean  $\pm$  0.86 vs.  $\pm$  0.67), which is justified by our 5-level design vs. only two (RT and qPCR) (Tichopad et al., 2009). Nevertheless, the genes with the highest technical variability in both studies exhibited comparable SD values (*CASP3* vs. *FGF7*,  $\pm$  1.23 and  $\pm$  1.29, respectively).

In respect to sources of technical variability, pre-amplification is a strategy that has increasingly been used to improve the amplification of mRNA from FFPE tissues, and to increase the sensitivity of qPCR for low expression genes (Denning et al., 2007; Li et al., 2008; Noutsias et al., 2008). In line with this, we showed that a significant number of samples considered not amplifiable ( $Ct \ge 35$ ), were recovered by the Pre-Amp technical application. However, this was obtained at the expense of introducing significant technical variability in all genes. Decreasing the amount of input RNA partially alleviated the effect of Pre-Amp on the variability, suggesting the inhibitors present in FFPE-RNA affected the efficiency of the retrotranscription step (Tichopad et al., 2004), effect that may have been dragged into the next, Pre-Amp level.

The presence of inhibitors is an unavoidable issue in FFPE-RNA samples, which effects are neither well captured by the ANOVA design since they do not propagate linearly from the superior to the inferior levels in the hierarchical model (Bar et al., 2012; Godfrey et al., 2000; Tichopad et al., 2004), nor, ultimately by the Ct quantification method. The last is due mainly because inhibitors in biological samples can alter the efficiency of gPCR reactions (Bar, 2003; Tichopad et al., 2004; Tichopad et al., 2010), violating the similar efficiency principle that has to be assumed for using the Ct method (Livak and Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001). Different approaches have been described for studying qPCR kinetics to avoid the utilization of external curves (Bar et al., 2012; Ruijter et al., 2013), among them, the  $Cy_0$  quantification method has been previously used to disclose the effects of inhibition on the kinetic of the amplification curve applying a mathematical algorithm based on Richard's equation (Guescini et al., 2008). Then, we decided to compare the performance of Ct and Cy<sub>0</sub> quantification methods in decreasing variability of TaqMan®-based RT-qPCR assays from FFPE-samples.

The use of  $Cy_0$ -quantified values in the ANOVA-nested design allowed to observe a decrease in total variability in genes such as *LYZ* and *CASP3* (highest total and technical variability, respectively). Importantly, the decrease in variability was evident in the upper (biological) levels, which can be interpreted as the effect of inhibitor dilution from the upper to the lower steps (Bar et al., 2012; Tichopad et al., 2009). These data clearly demonstrated, for the first time, that  $Cy_0$  algorithm can effectively account for slight curve shifting due to small variations in PCR efficiency present in very complex biological tissues as FFPEsamples.

In the field of cHL clinical research, there is an ongoing interest in the development of sets of qPCR assays based on FFPE-RNA (Sanchez-Espiridion et al., 2010; Scott et al., 2013; Venkataraman et al., 2014), to be used for clinical prediction, a goal that has been accomplished with certain success in other neoplasms such as breast cancer (van de Vijver et al., 2002; Wang et al., 2005). In this respect, the variability detected in this study, guantified for instance by the individual noise, ranged between 0.31 and 0.61 SD (mean 0.45) showing that expression levels would vary over ~1.5 folds from one case to another. This indicates a high threshold for a given gene to achieve, which should be taken into account when defining any cutoff value to allocate patients in molecular risk groups for clinical purposes.

The results of this study raise attention to several practical issues. In respect to the statistical power of the experimental design, our results point to an increase in biological replicates, and no impact of evaluating more than one lymph node, or RNA aliquots/RT-reactions. We also identified a precise requirement to optimize the Pre-Amp step as the more sensitive technical source of variability, and draw attention to the need of using Pre-AMP step in all samples, and not only in the ones that amplify at high Cq levels of REFG, in order to homogenization of introduced errors.

In sum, we showed that the use of RNA-FFPE does not lead to an increase in variability in RT-gPCR assays than that reported for fresh tissues; and identified gene-, and expression level-sources of biological and technical variability, which can allow better strategies for RTqPCR designs from highly degraded and inhibited samples.

Supplementary data to this article can be found online at http://dx. doi.org/10.1016/j.yexmp.2014.09.014.

#### Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

#### Role of the funding source

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

#### Acknowledgments

This work was supported by grants from INCT para controle do câncer (grants CNPq 573806/2008-0 and FAPERJ E-26/110.432/2010) (Brazil) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) projects E-26/111.429/2012 (RELINFO) and E-26/110.238/ 2014 (PP-SUS program) (Brazil). MHMB was supported by a fellowship from the Alexander von Humboldt Foundation (Germany). GVL and RH would like to thank Drs I. Zalcberg and P. Cappelletti for their support during the first stage of this work.

#### References

Applied, B., 2010. TaqMan® PreAmp Master Mix Kit Protocol.

- Bar, T., 2003. Kinetic outlier detection (KOD) in real-time PCR. Nucleic Acids Res. 31, e-105. http://dx.doi.org/10.1093/nar/gng106.
- Bar, T., Kubista, M., Tichopad, A., 2012. Validation of kinetics similarity in qPCR. Nucleic Acids Res. 40, 1395-1406. http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr778.
- Barros, M.H.M., Scheliga, A., De Matteo, E., Minnicelli, C., Soares, F.A., Zalcberg, I.R., Hassan, R., 2010. Cell cycle characteristics and Epstein-Barr virus are differentially associated with aggressive and non-aggressive subsets of Hodgkin lymphoma in pediatric patients. Leuk. Lymphoma 51, 1513-1522. http://dx.doi.org/10.3109/10428194.2010. 489243
- Barros, M.H.M., Vera-Lozada, G., Soares, F.A., Niedobitek, G., Hassan, R., 2012. Tumor microenvironment composition in pediatric classical Hodgkin lymphoma is modulated by age and Epstein-Barr virus infection. Int. J. Cancer 131, 1142-1152. http://dx.doi. org/10.1002/ijc.27314.
- Bengtsson, M., Hemberg, M., Rorsman, P., Ståhlberg, A., 2008. Quantification of mRNA in single cells and modelling of RT-qPCR induced noise. BMC Mol. Biol. 9, 63. http:// dx.doi.org/10.1186/1471-2199-9-63.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin. Chem. 55, 611–622. http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797.
- Chen, J., Byrne Jr., G.E., Lossos, I.S., 2007. Optimization of RNA extraction from formalinfixed, paraffin-embedded lymphoid tissues. Diagn. Mol. Pathol. 16, 61-72.
- Chetaille, B., Bertucci, F., Finetti, P., Esterni, B., Stamatoullas, A., Picquenot, J.M., Copin, M.C., Morschhauser, F., Casasnovas, O., Petrella, T., Molina, T., Vekhoff, A., Feugier, P., Bouabdallah, R., Birnbaum, D., Olive, D., Xerri, L., 2009. Molecular profiling of classical Hodgkin lymphoma tissues uncovers variations in the tumor microenvironment and

correlations with EBV infection and outcome. Blood 113, 2765-3775, http://dx.doi. org/10 1182/blood-2008-07-168096

- Denning, K.M., Smyth, P.C., Cahill, S.F., Finn, S.P., Conlon, E., Li, J., Flavin, R.J., Aherne, S.T., Guenther, S.M., Ferlinz, A., 2007. A molecular expression signature distinguishing follicular lesions in thyroid carcinoma using preamplification RT-PCR in archival samples. Mod. Pathol. 20, 1095–1102.
- Fairley, J.A., Gilmour, K., Walsh, K., 2012. Making the most of pathological specimens: molecular diagnosis in formalin-fixed, paraffin embedded tissue. Curr. Drug Targets 13, 1475-1487
- Fisher, R.A., 1935. The Design of Experiments. Oliver & Boyd, Oxford, England. Godfrey, T.E., Kim, S.-H., Chavira, M., Ruff, D.W., Warren, R.S., Gray, J.W., Jensen, R.H., 2000. Ouantitative mRNA expression analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using 5' nuclease quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. I. Mol. Diagn. 2, 84-91.
- Guescini, M., Sisti, D., Rocchi, M.B.L., Stocchi, L., Stocchi, V., 2008. A new real-time PCR method to overcome significant quantitative inaccuracy due to slight amplification inhibition. BMC Bioinforma. 9, 326. http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-9-326
- Kitchen, R.R., Kubista, M., Tichopad, A., 2010. Statistical aspects of quantitative real-time PCR experiment design. Methods 50, 231-236. http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth. 2010/01/025
- Koch, I., Slotta-Huspenina, J., Hollweck, R., Anastasov, N., Hofler, H., Quintanilla-Martinez, L., Fend, F., 2006. Real-time quantitative RT-PCR shows variable, assay-dependent sensitivity to formalin fixation: implications for direct comparison of transcript levels in paraffin-embedded tissues. Diagn. Mol. Pathol. 15, 149-156.
- Li, J., Smyth, P., Cahill, S., Denning, K., Flavin, R., Aherne, S., Pirotta, M., Guenther, S.M., O'Leary, J.J., Sheils, O., 2008. Improved RNA quality and TaqMan® Pre-amplification method (PreAmp) to enhance expression analysis from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) materials. BMC Biotechnol. 8, 10. http://dx.doi.org/10.1186/1472-6750-8-10
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the  $2-\Delta\Delta CT$  method. Methods 25, 402–408. http://dx. doi.org/10.1006/meth.2001.1262.
- Masuda, N., Ohnishi, T., Kawamoto, S., Monden, M., Okubo, K., 1999. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. Nucleic Acids Res. 27, 4436–4443.
- Murphy, J., Bustin, S.A., 2009. Reliability of real-time reverse-transcription PCR in clinical diagnostics: gold standard or substandard? Expert. Rev. Mol. Diagn. 9, 187-197. http://dx.doi.org/10.1586/14737159.9.2.187.
- Noutsias, M., Rohde, M., Block, A., Klippert, K., Lettau, O., Blunert, K., Hummel, M., Kühl, U., Lehmkuhl, H., Hetzer, R., Rauch, U., Poller, W., Pauschinger, M., Schultheiss, H.P., Volk, H.D., Kotsch, K., 2008. Preamplification techniques for real-time RT-PCR analyses of endomyocardial biopsies. BMC Mol. Biol. 9, 3. http://dx.doi.org/10.1186/1471-2199-9-3.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 29, e45.
- Pfaffl, M.W., 2006. Relative quantification. In: Dorak, M.T. (Ed.), Real-time PCR. Taylor & Francis Group, School of Clinical Medical Sciences (Child Health), Newcastle University, Newcastle-upon-Tyne, UK, pp. 63-82.
- Quinn, G.P., Keough, M.J., 2002. Experimental Design and Data Analysis for Biologists. Cambridge University Press, Cambridge, UK; New York.
- Ruijter, J.M., Pfaffl, M.W., Zhao, S., Spiess, A.N., Boggy, G., Blom, J., Rutledge, R.G., Sisti, D., Lievens, A., De Preter, K., Derveaux, S., Hellemans, J., Vandesompele, J., 2013. Evaluation of qPCR curve analysis methods for reliable biomarker discovery: bias, resolution, precision, and implications. Methods 59, 32-46. http://dx.doi.org/10.1016/j. vmeth.2012.08.011.
- Sánchez-Aguilera, A., Montalbán, C., de la Cueva, P., Sánchez-Verde, L., Morente, M.M., García-Cosío, M., García-Laraña, J., Bellas, C., Provencio, M., Romagosa, V., de Sevilla, A.F., Menárguez, J., Sabín, P., Mestre, M.J., Méndez, M., Fresno, M.F., Nicolás, C., Piris, M.A., García, J.F., Spanish Hodgkin Lymphoma Study Group, 2006. Tumor microenvironment and mitotic checkpoint are key factors in the outcome of classic Hodgkin lymphoma. Blood 108, 662-668. http://dx.doi.org/10.1182/blood-2005-12-5125
- Sanchez-Espiridion, B., Montalban, C., Lopez, A., Menarguez, J., Sabin, P., Ruiz-Marcellan, C., Lopez, A., Ramos, R., Rodriguez, J., Canovas, A., Camarero, C., Canales, M., Alves, J., Arranz, R., Acevedo, A., Salar, A., Serrano, S., Bas, A., Moraleda, J.M., Sanchez-Godoy, P., Burgos, F., Rayon, C., Fresno, M.F., Larana, J.G., Garcia-Cosio, M., Santonja, C., Lopez, J.L., Llanos, M., Mollejo, M., Gonzalez-Carrero, J., Marin, A., Forteza, J., Garcia-Sanz, R., Tomas, J.F., Morente, M.M., Piris, M.A., Garcia, J.F., on behalf of the Spanish Hodgkin Lymphoma Study Group, 2010. A molecular risk score based on 4 functional pathways for advanced classical Hodgkin lymphoma. Blood 116, e12-e17. http://dx. doi.org/10.1182/blood-2010-02-270009.
- Sánchez-Espiridión, B., Sánchez-Aguilera, A., Montalbán, C., Martin, C., Martinez, R., González-Carrero, J., Poderos, C., Bellas, C., Fresno, M.F., Morante, C., Mestre, M.J., Mendez, M., Mazorra, F., Conde, E., Castaño, A., Sánchez-Godoy, P., Tomas, J.F., Morente, M.M., Piris, M.A., García, J.F., Spanish Hodgkin's Lymphoma Study Group, 2009. xA TaqMan low-density array to predict outcome in advanced Hodgkin's lymphoma using paraffin-embedded samples. Clin. Cancer Res. 15, 1367–1375, http://dx. doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1119.
- Scott, D.W., Chan, F.C., Hong, F., Rogic, S., Tan, K.L., Meissner, B., Ben-Neriah, S., Boyle, M., Kridel, R., Telenius, A., Woolcock, B.W., Farinha, P., Fisher, R.I., Rimsza, L.M., Bartlett, N. L., Cheson, B.D., Shepherd, L.E., Advani, R.H., Connors, J.M., Kahl, B.S., Gordon, L.I., Horning, S.J., Steidl, C., Gascoyne, R.D., 2013. Gene expression-based model using formalin-fixed paraffin-embedded biopsies predicts overall survival in advancedstage classical Hodgkin lymphoma. J. Clin. Oncol. 31, 692-700. http://dx.doi.org/10. 1200/JCO.2012.43.4589.
- Steidl, C., Connors, J.M., Gascoyne, R.D., 2011. Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma: increasing evidence of the importance of the microenvironment. J. Clin.

Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 29, 1812–1826. http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2010. 32.8401.

- Tichopad, A., Bar, T., Pecen, L., Kitchen, R.R., Kubista, M., Pfaffl, M.W., 2010. Quality control for quantitative PCR based on amplification compatibility test. Methods. 50, 308–312. http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.028.
- Tichopad, A., Didier, A., Pfaffl, M.W., 2004. Inhibition of real-time RT-PCR quantification due to tissue-specific contaminants. Mol. Cell. Probes 18, 45–50. http://dx.doi.org/ 10.1016/j.mcp.2003.09.001.
- Tichopad, A., Kitchen, R., Riedmaier, I., Becker, C., Stahlberg, A., Kubista, M., 2009. Design and optimization of reverse-transcription quantitative PCR experiments. Clin. Chem. 55, 1816–1823. http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2009.126201.
- Van de Vijver, M.J., He, Y.D., van 't Veer, I.J., Dai, H., Hart, A.A.M., Voskuil, D.W., Schreiber, G.J., Peterse, J.L., Roberts, C., Marton, M.J., Parrish, M., Atsma, D., Witteveen, A., Glas, A., Delahaye, L., van der Velde, T., Bartelink, H., Rodenhuis, S., Rutgers, E.T., Friend, S.H., Bernards, R., 2002. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. N. Engl. J. Med. 347, 1999–2009. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa021967.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol. 3 (research0034).
- Venkataraman, G., Mirza, M.K., Eichenauer, D.A., Diehl, V., 2014. Current status of prognostication in classical Hodgkin lymphoma. Br. J. Haematol. 165, 287–299. http:// dx.doi.org/10.1111/bjh.12759.
- Wang, Y., Klin, J.G.M., Zhang, Y., Sieuwerts, A.M., Look, M.P., Yang, F., Talantov, D., Timmermans, M., Meijer-van Gelder, M.E., Yu, J., Jatkoe, T., Berns, E.M.J.J., Atkins, D., Foekens, J.A., 2005. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymphnode-negative primary breast cancer. Lancet 365, 671–679. http://dx.doi.org/10. 1016/S0140-6736(05)17947-1.
- Weaver, S., Dube, S., Mir, A., Qin, J., Sun, G., Ramakrishnan, R., Jones, R.C., Livak, K.J., 2010. Taking qPCR to a higher level: analysis of CNV reveals the power of high throughput qPCR to enhance quantitative resolution. Methods. 50, 271–276. http://dx.doi.org/10. 1016/j.ymeth.2010.01.003.

CrossMark click for updates

## G OPEN ACCESS

**Citation:** Barros MHM, Segges P, Vera-Lozada G, Hassan R, Niedobitek G (2015) Macrophage Polarization Reflects T Cell Composition of Tumor Microenvironment in Pediatric Classical Hodgkin Lymphoma and Has Impact on Survival. PLoS ONE 10(5): e0124531. doi:10.1371/journal.pone.0124531

Academic Editor: Andrew W Taylor, Boston University School of Medicine, UNITED STATES

Received: October 2, 2014

Accepted: March 14, 2015

Published: May 15, 2015

**Copyright:** © 2015 Barros et al. This is an open access article distributed under the terms of the <u>Creative Commons Attribution License</u>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** Wilhelm Sander Foundation (2012.029.1); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Grant 475969/2013-8 and INCT para Controle do Câncer, Brazil (Grants CNPq 573806/2008-0 and FAPERJ E26/170.026/2008). Priscilla Segges was a recipient of a Science without Borders sandwich PhD fellowship (CNPq, Brazil); Dr. Mário Barros was supported by Alexander von Humboldt Foundation. The funders had no role in **RESEARCH ARTICLE** 

## Macrophage Polarization Reflects T Cell Composition of Tumor Microenvironment in Pediatric Classical Hodgkin Lymphoma and Has Impact on Survival

Mário H. M. Barros<sup>1</sup>\*, Priscilla Segges<sup>1,2</sup>, Gabriela Vera-Lozada<sup>2</sup>, Rocio Hassan<sup>2</sup>, Gerald Niedobitek<sup>1,3</sup>

1 Institute for Pathology, Unfallkrankenhaus Berlin, Berlin, Germany, 2 Bone Marrow Transplantation Center, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, Brazil, 3 Institute for Pathology, Sana Klinikum Lichtenberg, Berlin, Germany

\* mariohenrique.barros@gmail.com

## Abstract

Macrophages have been implicated in the pathogenesis of classical Hodgkin lymphoma (cHL) and have been suggested to have a negative impact on outcome. Most studies addressing the role of macrophages in cHL have relied on identification of macrophages by generic macrophage antigens, e.g., CD68. We have therefore conducted an in situ analysis of macrophage polarization in a series of 100 pediatric cHL (pcHL) cases using double staining immunohistochemistry, combining CD68 or CD163 with pSTAT1 (M1-like) or CMAF (M2like). M1- or M2-polarised microenvironment was defined by an excess of one population over the other (>1.5). Expression of STAT1 and LYZ genes was also evaluated by RTqPCR. Patients <14 years and EBV+ cases displayed higher numbers of CD68+pSTAT1+ cells than older children and EBV- cases, respectively (P=0.01 and P=0.02). A cytotoxic tumor microenvironment, defined by a CD8+/FOXP3+ ratio >1.5 was associated with higher numbers of CD68+pSTAT1+ (P=0.025) and CD163+pSTAT1+ macrophages (P<0.0005). Levels of STAT1 and LYZ expression were associated with the numbers of CD68+pSTAT1+ macrophages. EBV+ cHL cases disclosed a predominant M1 polarized microenvironment similar to Th1 mediated inflammatory disorders, while EBV- cHL showed a predominant M2 polarized microenvironment closer to Th2 mediated inflammatory diseases. Better overallsurvival (OS) was observed in cases with higher numbers of CD163+pSTAT1+ macrophages (P=0.02) while larger numbers of CD163+CMAF+ macrophages were associated with worse progression-free survival (PFS) (P=0.02). Predominant M1-like polarization as disclosed by CD163+pSTAT1+/CD163+CMAF+ ratio > 1.5 was associated with better OS (P= 0.037). In conclusion, macrophage polarization in pcHL correlates with prevalent local T cell response and may be influenced by the EBV-status of neoplastic cells. Besides, M1-like and M2-like macrophages displayed differential effects on outcome in pcHL.



study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

### Introduction

Hodgkin and Reed-Sternberg (HRS) cells are typical for classical Hodgkin lymphoma (cHL) in both, children and adults [1]. However, microenvironment composition of cHL differs between pediatric and adult cases [2–4]. In adult cHL Epstein-Barr virus (EBV) positive-cases may be associated with a dysfunctional senescent immune system and viral reactivation, at least in old patients [5]. By contrast, in children, EBV-associated cases are associated with primary infection, and the tumor microenvironment is characterized by a predominantly cytotoxic/Th1 profile [3].

It has been reported that high numbers of tumor-associated macrophages (TAM) are associated with poor outcome in adult cHL [6-9]. We have previously shown that in pediatric cHL not all CD68+ macrophages are also CD163+, and that the prognostic role of these cells is influenced by the EBV-status [4]. These observations have led us to hypothesize that in the tumor microenvironment of pediatric cHL, macrophages may represent a heterogeneous cell population.

In a simplified view of macrophage activation, macrophages may exhibit two functional states, which represent the extremes of a continuum of activation states, one with a pro-inflammatory phenotype, the ability to promote T helper 1 (Th1) immune responses and tumoricidal activity (M1 macrophages) and another with regulatory functions in tissue repair, remodelling and promotion of Th2 immune response (M2 macrophages) [10-12]. One important function of a subset of M2 macrophages is the production IL10 [13–18]. Two transcription factors are differentially expressed by polarized macrophages; STAT1 is expressed in M1 macrophages, it is upregulated in response to types I, II or III interferon and its phosphorylated form (pSTAT1) binds to the promoter region of interferon-stimulated genes [12,19-21]. CMAF, an essential transcription factor for interleukin (IL) -10 production, is expressed in M2 macrophages committed to IL-10 production [22-24]. CD163 has been considered a M2-specific marker in macrophages [25-27]. Recently, we have demonstrated that the combined use of a macrophage marker, such as CD68 or CD163, together with pSTAT1 or CMAF can be used to identify M1- or M2-polarized macrophages, respectively. The results of our analysis of various immunologically mediated diseases suggested that CD163 should not be regarded as a specific M2-marker [28,29].

Here, we have examined macrophage populations in the tumor microenvironment of pediatric cHL using double-labeling immunohistochemistry and gene expression analysis. Additionally, we have studied the impact of these macrophages on the outcome of pediatric cHL.

## **Material and Methods**

## Patients

One hundred HIV-negative children and adolescents (up to 18 year old) diagnosed with cHL at the Instituto Nacional do Câncer (INCA, Brazil) between 1999 and 2006 were included in this study. The study was approved by the INCA Ethics Committee and has been conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. All ethical recommendations proposed by INCA Ethics Committee were adopted and written informed consent was obtained.

The histological and clinical features of these cases have been described previously [3]. Latent EBV infection has been investigated previously in all cHL cases [2,30]. Patients were classified into two age groups ( $\leq 14$  years vs. >14 years) [31–35]. All patients were treated according to standard pediatric protocols [3].

In order to compare cHL macrophage polarization with non-neoplastic inflammatory diseases, we additionally compared our data with previously published results of an analysis of 17 tonsils with a diagnosis of acute infectious mononucleosis (IM) and 11 cases of Crohn's disease (CD) representing diseases with a predominant cytotoxic/Th1 immune response [36,37]. As predominant Th2 immune response disease, 11 cecal appendices with oxyuriasis [38], 10 allergic nasal polyps with prominent eosinophilia [10,39], 10 skin biopsy samples showing wound healing [40,41] and 9 skin samples with foreign body granulomas were included [42]. All cases were selected from the archives of the Institute of Pathology, Unfallkrankenhaus Berlin, as previously described [28].

## Immunohistochemistry

Construction of tissue microarray (TMA) blocks including all cHL cases has been described previously [3]. For each patient, two 1-mm-diameter cores, selected from two different representative tumor areas rich in Hodgkin and Reed-Sternberg cells, were included. All cases showed cores with representative tumor microenvironment and high numbers of HRS cells (from 10 to 178 neoplastic cells/mm<sup>2</sup>, median: 70 cells/mm<sup>2</sup>). Buffers used for antigen retrieval and primary antibodies are listed in (Table A in <u>S1 File</u>). The double immunohistochemistry methodology has been described previously [28]. pSTAT1 (polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) or CMAF (M-153, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) antibodies and the detection of bound antibodies was performed using ZytoChem Plus HRP polymer kit (Zytomed Systems, Berlin, Germany), employing diaminobenzidine (DAB) as chromogen. CD68 (clone PGM1, Dako, Gloustrup, Denmark) or CD163 (clone 10D6, Novocastra, Wetzlar, Germany) antibodies were incubated posteriorly, followed by detection with AP Polymer System (Zytomed Systems, Berlin, Germany), employing Blue Alkaline Phosphatase substrate kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA) as substrate. The sections were not counterstained.

## Thresholds

Computer assisted microscopical analysis was performed as described previously [2,3]. For each cell subset, the 50<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles were used to categorize the intensity of cellular infiltration.

As yet, no thresholds have been defined for considering immune responses as M1-polarised or M2-polarised. We have therefore arbitrarily defined those cases with a M1/M2 ratio of >1.5 as M1 polarized and those with a M2/M1 ratio >1.5 as M2-polarized. Cases with lower ratios were considered as non-polarized. These calculations were done separately for CD68-positive and CD163-positive cells. This approach has proved useful and valid in our previous study of inflammatory diseases [28]. This strategy is especially important for the comparison of tissue microenvironment of cHL (which is rich in immune cells) and the microenvironment of inflammatory diseases included in this study, which may contain other cells, e.g., epithelial cells, to avoid bias that would be introduced by comparing absolute macrophage numbers of per mm<sup>2</sup>.

Cases displaying no labeled cell in both cores were considered not evaluable for technical reasons.

## Gene Expression Analysis

Gene expression levels of lysozyme (*LYZ*) and signal transducer and activator of transcription 1 (*STAT1*) genes, which have been previously associated to a macrophage signature in cHL [43,44], were evaluated by reverse transcriptase quantitative real-time PCR (RT-qPCR) assays. Eighty-four cases had good-quality RNA to perform quantitative analysis, i.e. Cq <35 cycles in reference gene amplifications, and amplification plots compatible with a sigmoid curve.

RNA was extracted from FFPE lymph node sections with the Master Pure RNA purification Kit (Epicentre, Madison, USA) as described previously [45]. First-strand cDNA was synthesized from 0.5 µg RNA using the High Capacity cDNA Archive kit, followed by a pre-

amplification step using TaqMan PreAmp Master Mix (Applied Biosystems, Massachusetts, USA). RT-qPCR assays were performed using an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Massachusetts, USA) with specific TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, assays ID Hs00234829\_m1 for *STAT1* and Hs00426231\_m1 for *LYZ*) [45]. Quantification was performed using the  $2^{\Delta}Cq$  algorithm, with glucuronidase beta (*GUSB*) and hydroxymethylbilane synthase (*HMBS*) as reference genes. Each measurement was performed in duplicate and quantified by Cq-value with fixed thresholds; replicates with standard deviation (SD) up to 0.15 cycles were accepted. In each run, Cq >35 cycles for reference genes lead to repeat analysis and ultimately to exclusion from analysis. Analyses were performed with the GenEx software (MultiD Analyses AB, Göteborg, Sweden).

## Statistical Analysis

To verify association between variables, Pearson's chi-square, Fisher's exact test, Mann-Whitney test and Spearman's rank correlation were used as described previously [2-4,28,30]. Progression-free survival (PFS) was the interval (in months) from diagnosis to progression at any time, relapse from complete response, or initiation of new, previously unplanned treatment or to the last follow-up in the patients with treatment success. Overall survival (OS) refers to the interval (in months) from the diagnosis to death or last follow-up. Survival distributions were estimated by the Kaplan-Meier method and differences were compared using log-rank test. Data were analyzed using SPSS 13.0.

## Results

Clinical and histological features of the cHL cases have been described previously [2,3] and are summarized in (Table B in <u>S1 File</u>). In brief, age at diagnosis ranged from 3 to 18 years (median 14 years). Nodular sclerosis (NS) was the predominant subtype (69/100, 69%), followed by mixed cellularity (MC) (23/100, 23%) [2,3]. EBV was detected in HRS cells from 43 cases and no association with age group was observed [2,3]. Distribution of lymphocytes and macrophages in the tumor microenvironment in relation to age group, histology, EBV-status and their prognostic impact have been reported previously [2–4] and are summarized in Table C in <u>S1 File</u>.

## Characterization of Macrophage Subsets

As described previously [28], we used co-expression of pSTAT1 together with CD68 or CD163 to identify M1-polarized macrophages, while co-expression of CMAF in conjunction with CD68 or CD163, was used to identify M2-polarized macrophages.

In our cHL cases, a variable composition of intratumoral macrophage sub-populations was observed, without distinct distribution patterns of labeled cells in the microenvironment (Fig 1). Cells co-expressing either macrophage markers together with pSTAT1 or CMAF and cells expressing macrophage markers without simultaneous expression of the transcription factor under analysis were observed in all cases. In addition, cells expressing only pSTAT1 or CMAF but no macrophage antigens were also observed probably partly representing T cell subsets (S2 Fig). The results of quantitative analyses of CD68+pSTAT1+, CD68+CMAF+, CD163+-pSTAT1+ and CD163+CMAF cells are summarized in Table 1.

Comparing the absolute numbers of each cell population, we observed higher numbers of cells co-expressing CD68 and pSTAT1 or CMAF (median 48 and 35 cells/mm<sup>2</sup>, respectively) than cells co-expressing CD163 and pSTAT1 or CMAF (median 23 and 29 cells/mm<sup>2</sup>, respective-ly) (<u>Table 1</u>). This indicates that not all CD68+ cells are also CD163+, and that CD163 is possibly expressed by a subset or subsets of macrophages independently of the question of polarization.



**Fig 1. Examples of immunostains used to identify M1-like and M2-like macrophages in classical Hodgkin lymphoma.** Expression of CD68 or CD163 is indicated by blue cytoplasmic/membranous staining. The expression of transcription factors pSTAT1 and CMAF is indicated by brown nuclear staining. Examples of cases with high numbers of M2-like macrophages are shown in A, (CD68+CMAF+ macrophages) and in C, (CD163+CMAF+ macrophages). Examples of cases with large numbers of M1-like macrophages are shown in B, (CD68+pSTAT1+ macrophages) and in D (CD163+pSTAT1+ macrophages) (original magnification: 400x). The sections were not counterstained.

doi:10.1371/journal.pone.0124531.g001

Using CD68 as macrophage marker, 58% of cases (41/71) displayed M1-like polarization (CD68+pSTAT1+ / CD68+CMAF+ >1.5), 39% (28/71) M2-like polarization (CD68+pSTAT1 + / CD68+CMAF+ <0.75) and 3% (2/71) of cases showed similar numbers of M1- and M2-like macrophages (Figs 2 and 3). Considering CD163+ cells, 45% of cases (28/62) displayed M1-like polarization (CD163+pSTAT1+ / CD163+CMAF+ >1.5), 50% (31/62) M2-like polarization (CD163+pSTAT1+ / CD163+CMAF+ <0.75) and 5% (3/62) of cases showed similar numbers of M1- and M2-like macrophages (Figs 2 and 3).

## Macrophage polarization is related to local T cell polarization

A cross-talk between innate and adaptive immune system is known to occur in immune responses (19,20) and bidirectional interactions between macrophages and lymphocytes have been described in cancer [10,46]. Since a direct, albeit complex, relationship between Th immune response polarization and macrophage polarization exists [46], we decided to investigate if a Th1/cytotoxic predominant tumor microenvironment might be associated with higher numbers of M1-like macrophages. For this purpose, we have arbitrarily defined a ratio of CD8 + cells over FoxP3+ cells of >1.5 as indicating a predominantly cytotoxic microenvironment using previously published results obtained in this case series [3].

Using this approach, a cytotoxic tumor microenvironment was associated with higher absolute numbers of CD68+pSTAT1+ (median 73 cells/mm<sup>2</sup> for CD8+/FOXP3+ ratio >1.5 vs. median 12 cells/mm<sup>2</sup> for CD8+/FOXP3+ ratio <0.75; P = 0.025, Mann-Whitney) and CD163



Table 1. Description of macrophage subpopulations in the tumor microenvironment of pediatric classical Hodgkin lymphoma and their association with progression free survival and overall survival.

Variable	Labeled Cells /mm <sup>2</sup>	Cases Analyzed (%)	5-year PFS Rate (%)	Univariate Analysis ( <i>P</i> ) for PFS	5-year OS Rate (%)	Univariate Analysis ( <i>P</i> ) for OS
CD68+pSTAT1+ (cells/mm <sup>2</sup> )						
Range	0 to 214					
(Mean / Median)	(66.89 / 49)					
$\leq$ 49 (50 <sup>th</sup> percentile)		36/71 (50.7)	72.7	0.9	85.3	0.9
> 49 (50 <sup>th</sup> percentile)		35/71 (49.3)	71.9		85.3	
$\leq$ 99 (75 <sup>th</sup> percentile)		54/71 (76.1)	70	0.5	84.6	0.9
> 99 (75 <sup>th</sup> percentile)		17/71 (23.9)	80		87.5	
CD68+CMAF+(cells/ mm <sup>2</sup> )						
Range	0 to 143					
(Mean / Median)	(45.86 / 35)					
$\leq$ 35 (50 <sup>th</sup> percentile)		37/71 (52.1)	77.1	0.3	88.6	0.3
> 35 (50 <sup>th</sup> percentile)		34/71 (47.9)	66.7		81.8	
$\leq$ 76 (75 <sup>th</sup> percentile)		54/71 (76.1)	76	0.2	90	0.038
> 76 (75 <sup>th</sup> percentile)		17/71 (23.9)	60		69	
CD163+pSTAT1+ (cells/mm²)						
Range	0 to 155					
(Mean / Median)	(34.18 / 17)					
$\leq$ 17 (50 <sup>th</sup> percentile)		31/67 (46.3)	65.5	0.1	80	0.02
> 17 (50 <sup>th</sup> percentile)		36/67 (53.7)	84.4		100	
$\leq$ 52 (75 <sup>th</sup> percentile)		51/67 (76.1)	71.4	0.1	88.8	0.3
> 52(75 <sup>th</sup> percentile)		16/67 (23.9)	91.7		100	
CD163+CMAF+ (cells/ mm <sup>2</sup> )						
Range	0 to 184					
(Mean / Median)	(44.56 / 29)					
$\leq$ 29 (50 <sup>th</sup> percentile)		43/81 (53.1)	86.8	0.02	92.5	0.09
> 29 (50 <sup>th</sup> percentile)		38/81 (46.9)	63.9		78.4	
$\leq$ 76 (75 <sup>th</sup> percentile)		18/81 (22.2)	80.4	0.05	91.5	0.009
> 76 (75 <sup>th</sup> percentile)		63/81 (77.8)	61.1		66.7	

PFS: progression free survival. OS: overall survival.

doi:10.1371/journal.pone.0124531.t001

+pSTAT1+ macrophages (median 26 cells/mm<sup>2</sup> for CD8+/FOXP3+ ratio >1.5 vs. median 1 cell/mm<sup>2</sup> for CD8+/FOXP3 ratio <0.75; P< 0.0005, Mann-Whitney).

Additionally, cases with CD68+pSTAT1+ / CD68+CMAF+ ratio >1.5 disclosed higher absolute numbers of TIA1+ lymphocytes (median 143 cells/mm<sup>2</sup> vs. 55 for M2>M1; *P* = 0.001). Furthermore, cases with more CD163+pSTAT1+ than CD163+CMAF+ macrophages (ratio >1.5) showed higher absolute numbers of CD3+ lymphocytes (median 785 cells/mm<sup>2</sup> vs. 604 M2>M1; *P* = 0.01) and CD8+ lymphocytes (median 264 cells/mm<sup>2</sup> vs. 132 for M2>M1; *P* = 0.002). Detailed results are provided in Table 2.

To validate these results using another methodology, we decided to evaluate if expression levels of *STAT1* and *LYZ*, two genes related to macrophage-signatures [43,44] and possibly to M1 polarization [47], might be associated with the tumor microenvironment profile.



Fig 2. Pie charts showing the kind of macrophage polarization in pediatric classical Hodgkin lymphoma, considering CD68 (A) or CD163 (C) as macrophage markers. Box-plot graphs show the numerical distribution of CD68+pSTAT1+, CD68+pSTAT1-, CD68+CMAF+ and CD68+CMAF- cells/mm2 (B), as well as CD163+pSTAT1+, CD163+pSTAT1-, CD163+CMAF+ and CD163+CMAF- cells/mm2 (D).

doi:10.1371/journal.pone.0124531.g002

PLOS ONE

A positive correlation was observed between expression of *STAT1* and of *LYZ* (rho 0.73, P < 0.001, Spearman's correlation) confirming the consistency of the gene expression signature. Next, we checked if *STAT1* and *LYZ* expression levels were correlated with the numbers of M1-like macrophages. *STAT1* levels increased with the numbers of CD68+pSTAT1+ and CD68+CMAF- cells (rho 0.479 and 0.40, respectively; P < 0.001 for both, Spearman's correlation) (S2 Fig). *LYZ* expression level also exhibited a positive correlation with the numbers of CD68+pSTAT1+ (rho 0.346; P = 0.0043, Spearman's correlation) and CD68+CMAF- macrophages (rho 0.317; P = 0.009, Spearman's correlation) (S2 Fig). In line with this, *STAT1* and *LYZ* expression levels were directly correlated with the number of cytotoxic T cells (TIA1+ and Granzyme B+ cells; P < 0.001 and P = 0.013 for *STAT1*, respectively; both P < 0.01 for *LYZ*. Spearman's correlation).

From these results, we conclude that macrophage polarization and the absolute numbers of M1-like macrophage are related to and possibly influenced by the T cell composition of the tumor microenvironment.



Fig 3. Box-plot graphs show the numerical distribution of CD68+pSTAT1+, CD68+pSTAT1-, CD68+CMAF+ and CD68+CMAF- cells/mm2 according to EBV-status (A) and Th-response group (B). The numerical distribution of CD163+pSTAT1+, CD163+pSTAT1-, CD163+CMAF+ and CD163+CMAF- cells/mm2 according to EBV-status and Th-response group is shown in C and D, respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0124531.g003

PLOS ONE

# EBV+ cHL displays M1-like polarization reminiscent of Th1-response inflammatory disorders

As EBV appears to play an important role in the modulation of lymphocyte composition of the tumor microenvironment in pediatric [3,48], and adult cHL [49] and given the above results that indicate that lymphocyte compositions may be associated with macrophage polarization, we decided to evaluate the influence of HRS cell EBV status on macrophage-polarization in cHL.

At the gene expression level, we observed that EBV+ cases showed higher expression levels of *STAT1* (2.72±0.92 vs. 2.01±1.12 to EBV- cases; P = 0.023, Mann-Whitney test) and *LYZ* (3.62±1.39 vs. 2.73±1.6 to EBV- cases; P = 0.011 for *LYZ*, Mann-Whitney test) (S3 Fig).

At the cellular level, we observed that higher absolute numbers of CD68+pSTAT1+ macrophages were found in EBV+ cases (median 73 cells/mm<sup>2</sup> vs. median 32 cells/mm<sup>2</sup> in EBVcases; P = 0.02, Mann-Whitney) (S3 Fig). This was also observed for CD163+pSTAT1+ macrophages (median 29 cells/mm<sup>2</sup> in EBV+ vs. median 17 cells/mm<sup>2</sup> in EBV- cases; P = 0.06, Mann-Whitney) (Fig 3 and S3 Fig).

When the macrophage ratios were considered, 64.5% (20/31) of EBV+ cHL cases showed CD68+pSTAT1+ / CD68+CMAF+ ratio > 1.5 (P = 0.2, likelihood ratio). Considering the

<b>PLOS</b>	ONE

MACROPHAGE POLARIZATION <sup>a</sup>	CELL POPULATIONS <sup>a</sup>									
	CD3+ (median)	CD4+ (median)	FOXP3+ (median)	TBET+ (median)	CD8+ (median)	TIA1+ (median)	GRZB+ (median)	CD20+ (median)	CD14+ (median)	
M1 > M2										
CD68+pSTAT1+ >	225 to 1170	11 to 551	1 to 492	3 to 202	11 to 847	10 to 396	1 to 451	3 to 885	2 to 524	
CD68+CMAF+	(748)	(187)	(56)	(38)	(203)	(143)	(17)	(238)	(88)	
M2 > M1										
CD68+ CMAF+ >	70 to 1187	14 to 624	1 to 457	5 to 167	11 to 434	2 to 319	1 to 99	5 to 879	1 to 152	
CD68+pSTAT1+	(595)	(143)	(82)	(26)	(135)	(55)	(14)	(196)	(36)	
P <sup>b</sup>	0.07	0.3	0.9	0.2	0.06	0.001	0.3	0.2	0.004	
M1 > M2										
CD163+pSTAT1+ >	316 to 1187	29 to 551	1 to 351	2 to 264	23 to 847	10 to 396	2 to 451	20 to 879	4 to 524	
CD163+CMAF+	(801)	(206)	(68)	(32)	(281)	(103)	(14)	(208)	(83)	
M2 > M1										
CD163+CMAF+ >	70 to 1170	3 to 624	1 to 513	5 to 167	11 to 527	7 to 396	1 to 211	5 to 885	1 to 275	
CD163+PSTAT1+	(630)	(108)	(100)	(32)	(132)	(59)	(20)	(190)	(44)	
P <sup>b</sup>	0.01	0.05	0.1	0.4	0.002	0.4	0.9	0.7	0.2	

#### ing to M1/M2-like macrophage ratio.

<sup>a)</sup> The numbers represent labeled cells /mm<sup>2</sup>.

<sup>b)</sup> P values are from Mann-Whitney test.

doi:10.1371/journal.pone.0124531.t002

CD163+pSTAT1+ / CD163+CMAF+ ratio > 1.5, 50%(14/28) of these EBV+ cases showed M1-like polarization (P = 0.04, likelihood ratio) (Fig 3 and S3 Fig).

Additionally, we decided to test the hypothesis that macrophage composition in pediatric EBV+ cHL would be similar to macrophage composition in prototypical conditions with predominant cytotoxic/Th1 immune response studied previously [28]. For this, we compared the macrophage composition in EBV- cHL and EBV+ cHL with conditions showing predominant cytotoxic/Th1 or Th2 immune responses taking into consideration the ratio of M1 and M2 macrophages per case.

A detailed analysis of macrophage polarization in these benign conditions has been published previously [28], which confirmed the presence of high numbers of CD68+pSTAT1+ and CD163 +pSTAT1+ macrophages in Th1-response group diseases, compared with higher numbers of CD68+CMAF+ and CD163+CMAF+ in Th2-response group diseases (Table F in S1 File).

Comparison of cHL grouped according to EBV status with these non-neoplastic diseases revealed that more CD68+pSTAT1+ than CD68+CMAF+ macrophages (ratio >1.5) were observed in 89% (25/28) of Th1-response group cases and in 64.5% (20/31) of EBV+ cHL cases, but not in any of the 40 Th2-response group cases (P< 0.0005, X<sup>2</sup>) (Fig 3 and Table D in S1 File). Similarly, more CD163+pSTAT1+ than CD163+CMAF+ macrophages (ratio >1.5) were observed in 64.3% (18/28) of Th1-response group cases and in 50% (14/28) of EBV+ cHL, but not in any of the 40 Th2-response group cases (P< 0.0005,  $X^2$ ) (Fig 3 and S3 Fig).

Considering the EBV- group, more CD68+CMAF+ than CD68+pSTAT1+ macrophages (ratio >1.5) were observed in 100% (40/40) of Th2-response group, in 41% of EBV- cHL cases and in only 3.6% (1/28) of Th1-response group cases (P< 0.0005,  $X^2$ ). (Fig 3 and Table E in S1 File). Furthermore, more CD163+CMAF+ than CD163+pSTAT1+ macrophages (ratio >1.5) were observed in 100% (40/40) of Th2-response group cases, in 60.6% (20/33) of EBV- cHL cases and in only 10.7% (3/28) of Th1-response group cases (P < 0.0005,  $X^2$ ) (Fig 3 and Table E in S1 File).

These results highlight two aspects of the neoplastic microenvironment. The comparison of cHL with non-neoplastic conditions representative of Th1- and Th2-predominant immune responses suggests that the extent of macrophage polarization in cHL may be weaker than that observed in inflammatory conditions, in keeping with the immune dysfunction underlying cHL pathogenesis [50]. Analyzed in this context, pediatric EBV+ cHL cases displayed macrophage composition more similar to Th1-response group cases while macrophage composition in EBV- cHL was closer to Th2-response group cases.

# Macrophage polarization is associated with clinical and histological characteristics in cHL

Higher absolute numbers of CD68+pSTAT1+ macrophages were associated with young age (median 73 cells/mm<sup>2</sup> in <14y vs. median 30 cells/mm<sup>2</sup> in >14y; P = 0.01, Mann-Whitney test) and NS grade (G) I (median 26 cells/mm<sup>2</sup> vs. median 14 cell/mm<sup>2</sup> in NS GII; P < 0.005, Mann-Whitney test) (S3 Fig).

Regarding the numbers of CD163+pSTAT1+ macrophages, higher absolute numbers of these cells were associated with male gender (median 26 cells/mm<sup>2</sup> vs. median 14 cells/mm<sup>2</sup> in females; P = 0.009, Mann-Whitney test) (S3 Fig).

Considering macrophage polarization, M1-like polarization as disclosed by CD68 +pSTAT1+ / CD68+CMAF+ ratio >1.5 was associated with MC subtype (83.3% of MC cases showed M1 > M2; P = 0.024, Fisher's exact test) and NS GI (69% of NS GI cases showed M1>M2, compared with only 37.5% of NS GII cases; P = 0.028, X<sup>2</sup>). No other associations were observed (Table 3).

M1-like polarization as defined by CD163+pSTAT1+ / CD163+CMAF+ ratio >1.5 was associated with male gender (60% of males showed M1>M2, compared with 17% of females; P = 0.004, Fisher's exact test), favorable clinical presentation (60.7% vs. 33.3% in unfavorable clinical presentation; P = 0.04, X<sup>2</sup>) and absence of mediastinal mass (73% of patients without mediastinal mass showed M1>M2 and 67% of patients with mediastinal mass had M2>M1; P = 0.005, Fisher's exact test). No other associations were observed (Table 3).

## CD163+CMAF+ but not CD163+pSTAT1+ Macrophages are Associated with Worse Outcome

Our previous results showed that high numbers of CD163+ macrophages were associated with worse PFS mainly in pediatric patients with EBV- cHL, while in EBV+ cHL, high numbers of CD163+ macrophages were not associated with a worse outcome [4]. We hypothesized that M1-like and M2-like macrophages may have different roles in tumor biology and therapy response. As currently there is no cHL animal model and *in vitro* studies with cHL cell lines do not represent the *in vivo* complexity of cHL microenvironment, survival analyses may be used to examine possible contributions of M1- and M2-like macrophages to the immune response against HRS cells.

In general, OS and PFS at 120 months were 89.4% and 78.6%, respectively [3]. Considering all cases, worse OS was observed in cases displaying very high numbers of CD68+CMAF+ macrophages (> 76 cells/mm<sup>2</sup>, 75<sup>th</sup> percentile) (69% vs. 90% for CD68+CMAF+ cells  $\leq$ 76 cells/mm<sup>2</sup>; *P* = 0.038, Log-rank). On the other hand, better OS was observed in cases with high numbers of CD163+pSTAT1+ macrophages (>17 cells/mm<sup>2</sup>, 50<sup>th</sup> percentile) (100% vs. 79% for CD163+pSTAT1+ cells  $\leq$ 17 cells/mm<sup>2</sup>; *P* = 0.02, Log-rank) (Fig 4).

Moreover, M1-like polarization disclosed by CD163+pSTAT1+ / CD163+CMAF+ ratio>1.5 was associated with better OS (100% for M1>M2 vs. 84% for M2>M1. P = 0.037, Log-rank).

	DNE
--	-----

	MACF	ROPHAGES		MACROPHAGES		
VARIABLE	CD68+pSTAT1+ > CD68+CMAF+ <sup>a</sup> (M1 > M2)	CD68+CMAF+ > CD68 +pSTAT1+ <sup>a</sup> (M2 > M1)	Ρ	CD163+pSTAT1+ > CD163+CMAF+ <sup>b</sup> (M1 > M2)	CD163+CMAF+ > CD163 +pSTAT1+ <sup>b</sup> (M2 > M1)	Ρ
Age, years						
≤ <b>1</b> 4	16 (53.3)	14 (46.7)		11 (40.7)	16 (59.3)	
> 14	25 (65)	14 (35.9)	0.3	17 (53.1)	15 (46.9)	0.3
Gender						
Male	31 (66)	16 (34)		25 (59.5)	17 (40.5)	
Female	10 (45.5)	12 (54.5)	0.1	3 (17.6)	14 (82.4)	0.004
Stage						
I and II	24 (55.8)	19 (44.2)		19 (51.4)	18 (48.6)	
III and IV	13 (59)	9 (41)	0.8	7 (39)	11 (61)	0.3
Extranodal disease						
Yes	4 (50)	4 (50)		2 (33.3)	4 (66.7)	
No	33 (58)	24 (42)	0.7	24 (49)	25 (51)	0.6
B symptoms						
Yes	24 (63.2)	14 (36.8)		15 (47)	17 (53)	
No	13 (48)	14 (52)	0.2	11 (47.8)	12 (52.2)	0.9
<b>Clinical Presentation</b>						
Favorable	20 (62.5)	12 (37.5)		17 (60.7)	11 (39.3)	
Unfavorable	17 (51.5)	16 (48.5)	0.3	9 (33.3)	18 (66.7)	0.04
Histopathological Diagnosis						
Mixed cellularity	15 (83.3)	3 (16.7)		6 (46.2)	7 (53.8)	
Not- Mixed cellularity	26 (51)	25 (49)	0.024	22 (47.8)	24 (52.2)	1

#### Table 3. Clinical and histological variables according to M1/M2-like macrophage ratio.

<sup>a)</sup> In 2 cases, the numbers of CD68+pSTAT1+ and CD68+CMAF+ macrophages were similar.

<sup>b)</sup> In 3 cases, the numbers of CD163+pSTAT1+ and CD163+CMAF+ macrophages were similar.

doi:10.1371/journal.pone.0124531.t003

A worse PFS was observed in cases with high numbers of CD163+CMAF+ macrophages (>29 cells/mm<sup>2</sup>) (64% vs. 87% for  $\leq$ 29 cells/mm<sup>2</sup>; *P* = 0.02, Log-rank) (Fig 2). High numbers of CD68+pSTAT1+ or CD68+CMAF+ macrophages did not influence the PFS.

## Discussion

Macrophages represent a heterogeneous cell population with functions dependent on their state of polarization [10,11,51]. The absence of universally accepted nomenclature, the dynamics of the activation process and the paucity of suitable macrophage markers are some reasons for the incomplete understanding of the role of macrophages in pathogenesis and outcome of neoplastic diseases [52].

To address this problem, we have recently described an approach using pSTAT1 and CMAF transcription factors together with CD68 and CD163 in double labelling immunohis-tochemistry to characterise macrophage polarisation in situ [28]. Induction of expression and phosphorylation of STAT1 transcription factor is a well-described early event in macrophage polarization in a Th1-dominant microenvironment [12,19,20]. IFN-gamma signalling induces maximal STAT1 transcription activity as well as phosphorylation of specific STAT1 residues, which facilitates its dimerization, nuclear translocation and DNA binding at IFN-gamma





Fig 4. Kaplan-Meier curves in pediatric classical Hodgkin lymphoma, according to number of M1- or M2-like macrophages. A) Overall survival (OS) according to the numbers of CD68+CMAF+ macrophages. B) OS according to the numbers of CD163+pSTAT1+ macrophages. C) Progression-free survival (PFS) according to the numbers of CD163+CMAF+ macrophages. D) PFS according to the numbers of CD163+pSTAT1+ macrophages.

doi:10.1371/journal.pone.0124531.g004

PLOS ONE

response genes [<u>12,19,20</u>]. Thus, the combined detection of a macrophage marker and pSTAT1 transcription factor is likely to reflect M1 polarization [<u>20</u>].

Several functional studies support the use of CMAF as marker of a subset of M2-polarized macrophages. CMAF is an essential transcription factor that, especially in macrophages, is at the top of the control of IL10 production [22-24]. IL-10 is a Th2 gene product and a potent inhibitor of Th1 cells [53]. IL10 participates in M2 polarization, and M2-polarized macrophages, specifically the M2b subset, produce IL10 [13-17,54,55]. In light of this, CMAF in combination with a macrophage marker (CD68 or CD163) may identify at least a subset of M2-polarized macrophages. Given the importance of IL10 in cHL pathobiology [56–59], we hypothesize

that, even if not all M2-polarized macrophages are identified by our approach, CMAF expressing macrophages would represent a biologically significant population in this disease.

It is likely that our approach does not reflect the entire spectrum of macrophage polarization. Nevertheless, previous immunohistochemical studies addressing the role of macrophages in tumour microenvironment have largely relied on the use of CD68 and/or CD163 only and have considered CD163 to be a marker of M2 macrophages. Based on results published here and previously [28] we believe that the latter assumption may be too simple. Our approach is an attempt to characterise macrophage polarization *in situ* in more detail. While it is clear that further studies will be required to validate this approach and that additional marker combinations may be necessary to characterise fully the spectrum of macrophage polarization, we believe that our results add an important piece of information to the understanding of the complexity of lymphoma microenvironment.

In this work, we have used a 1.5 ratio as cut-off to assess predominance of M1 over M2 macrophages and *vice versa*. We acknowledge that this is an arbitrary approach, but this is also the case for other quantitative approaches currently in use such as gene expression analyses [<u>60</u>– <u>62</u>]. Also, using this strategy we were able to identify associations that are in line with our previous results [<u>28</u>] and make sense from an immunological point of view. For instance, we were able to show a comparable macrophage balance in EBV+ cHL and in inflammatory diseases with predominance of cytotoxic/Th1 immune response. Also higher numbers of TIA1+ lymphocytes were observed in cHL cases with more CD68+pSTAT1+ than CD68+CMAF+ macrophages, and higher numbers CD8+ lymphocytes in cases with more CD163+pSTAT1+ than CD163+CMAF+ macrophages.

Differences in the numbers of CD68+ and CD163+ macrophages in the tumor microenvironment of cHL have already been shown by others and by us [4,8,63,64]. It is not clear if the detection of higher numbers of CD68+ cells over CD163+ cells is due to the detection of other cell populations such as dendritic cells by the CD68 PG-M1 clone [65] or if it results from the ability of CD163 antibody to identify macrophage subsets within CD68+ cell population. However, to explore the reasons for these differences was not the objective of this study.

Based on in vitro studies, CD163 has been suggested as a M2 marker [26,27,66]. Furthermore, using CD163 immunohistochemistry, it has been hypothesized that tumor microenvironment in cHL as well as in solid tumors is enriched in M2 macrophages [6–8,67–72]. Here, we show that CD163+ macrophages more often display evidence of M2 polarization than CD68+ macrophages. However, the view of CD163 as a specific M2 marker may represent an oversimplification, not only because a significant proportion of CD163+ macrophages can coexpress pSTAT1, which is clearly associated with IFN-g induced M1 polarization [12,29,47,52] but also because CD163+pSTAT1+ macrophages were associated with better survival, suggesting that these cells may have an anti-neoplastic function in cHL.

Furthermore, we show that macrophage polarization mirrors the tumor microenvironment lymphocyte content (cytotoxic vs. immunoregulatory), suggesting that in cHL the relation between a Th1/cytotoxic immune response and M1 polarization, as well as between a Th2/immunoregulatory response and M2 macrophage polarization, described for non neoplastic diseases [73,74], is maintained.

Independently of the nomenclature used, many authors claim that macrophages in the tumor microenvironment of cancer favor immunosuppression and thus contribute to tumor progression [10,11,75,76]. Specifically, it has been suggested that macrophages may be the "bad guys" in cHL [77]. In contrast to this notion, we demonstrate that a cytotoxic/Th1/M1-like profile is prevalent in particular in EBV-associated pcHL. While this is not of the magnitude seen in Th1-predominant inflammatory disorders, it might contribute to the better outcome in this particular clinical subset.

When the survival analyses are considered in the context of the different functional properties of M1 and M2 macrophages [10,11,51,73,74], a differential role of macrophages in pediatric cHL is emerging. In this setting, M1-like macrophages may contribute to the formation of a tumor microenvironment more effective in immune surveillance, while M2-like macrophages may contribute to a dysfunctional microenvironment, not adequate to control the neoplastic proliferation. From this point of view, not all macrophages may be "bad guys" [77]; the use of a single macrophage marker to stratify cHL patients may therefore be inappropriate; and a hypothetical targeted therapy directed against CD68+ or CD163+ cells might have deleterious effects, at least in the group of patients with a M1-predominant microenvironment.

We are aware that the number of cases in this study imposes limitations in relation to the survival analyses, and prospective as well as functional studies are mandatory to confirm these results. Moreover, we acknowledge that the analysis presented here was performed using the same cohort of cases published previously [2-4], and thus requires validation in other case series. However, we believe that our series of sequential cases with similar numbers of EBV+ and EBV- cases is appropriate for the immunological evaluations performed here.

In summary, our results suggest that in pediatric cHL the polarization of macrophages may depend on the tumor microenvironment composition and may be influenced by EBV status of HRS cells. Furthermore, high numbers of M2-like macrophages, but not of M1-like macrophages, are associated with worse OS and PFS.

## **Supporting Information**

**S1 File. Supporting Tables.** Table A in S1 File: Antibodies used for immunohistochemical study. Table B in S1 File: Clinical, histological and Epstein-Barr virus data at diagnosis. Table C in S1 File: Description of the immune cell populations from the tumor microenvironment previously analyzed. Table D in S1 File: Balance of polarized macrophages according to not-neo-plastic diseases with predominance of cytotoxic/Th1 immune response, not-neoplastic diseases with predominance of Th2 immune response and Epstein-Barr virus-associated classical Hodgkin lymphoma. Table E in S1 File: Balance of polarized macrophages according to not-neoplastic diseases with predominance of cytotoxic/Th1 immune response, not-neoplastic diseases with predominance of cytotoxic/Th1 immune response, not-neoplastic diseases with predominance of Th2 immune response and Epstein-Barr virus-negative classical Hodgkin lymphoma. Table F in S1 File: Description of macrophage polarization in the group of not-neoplastic diseases with predominance of cytotoxic/Th1 immune response and in the group of diseases with predominance of Th2 immune response. (DOC)

**S1 Fig. Double immunohistochemistry showing the presence of CD4+CMAF+ cells (A), where CD4 is indicated by blue membranous staining and CMAF by nuclear staining.** In "B" is shown the presence of CD8+pSTAT1+ cells, where CD8 is indicated by blue membranous staining and pSTAT1 by nuclear staining (original magnification: 400x). The arrows indicate examples of double positive cells. The sections were not counterstained. (TIF)

S2 Fig. Scatter graphs showing the correlation between LYZ expression and STAT1 expression (A); numbers of CD68+pSTAT1+ macrophages and STAT1 expression (B); numbers of CD68+pSTAT1+ macrophages and LYZ expression (C); numbers of CD68+CMAF- macrophages and STAT1 expression (D); numbers of CD68+CMAFmacrophages and LYZ expression; and progression free survival according to the LYZ expression level, using 50th percentile (3.11 fold change) as cut-off (E). (TIF)

S3 Fig. Box-plot graphs showing the numerical distribution of CD68+pSTAT1+ macrophages according to age-group (A), nodular sclerosis grade (C) and Epstein-Barr virus association (D), as well as CD163+pSTAT1+ macrophages according to gender (B) and Epstein-Barr virus association (E). The P-value in each bracket is from Mann-Whitney tests. (TIF)

## Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Fernando Soares (Pathology Department of A.C. Camargo Hospital, São Paulo, Brazil) who kindly constructed the TMA. Dr. Luitpold Distel kindly provided the image analysis software. This work was supported by Wilhelm Sander Foundation (2012.029.1); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Grant 475969/2013-8 and INCT para Controle do Câncer, Brazil (Grants CNPq 573806/2008-0 and FAPERJ E26/170.026/2008). Priscilla Segges was a recipient of a Science without Borders sand-wich PhD fellowship (CNPq, Brazil); Dr. Mário Barros was supported by Alexander von Humboldt Foundation.

## **Author Contributions**

Conceived and designed the experiments: MHMB RH GN. Performed the experiments: MHMB PS GVL. Analyzed the data: MHMB RH. Contributed reagents/materials/analysis tools: MHMB RH GN. Wrote the paper: MHMB RH GN.

## References

- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al., editors. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008. doi: <u>10.1016/j.anndiagpath.2012.05.004</u> PMID: <u>22683202</u>
- Barros MHM, Hassan R, Niedobitek G. Disease patterns in pediatric classical Hodgkin lymphoma: a report from a developing area in Brazil. Hematol Oncol. 2011; 29: 190–5. doi: <u>10.1002/hon.984</u> PMID: <u>21374695</u>
- Barros MHM, Vera-Lozada G, Soares F a, Niedobitek G, Hassan R. Tumor microenvironment composition in pediatric classical Hodgkin lymphoma is modulated by age and Epstein-Barr virus infection. Int J Cancer. 2012; 131: 1142–52. doi: <u>10.1002/ijc.27314</u> PMID: <u>22025264</u>
- Barros MHM, Hassan R, Niedobitek G. Tumor-associated macrophages in pediatric classical Hodgkin lymphoma: association with Epstein-Barr virus, lymphocyte subsets, and prognostic impact. Clin Cancer Res. 2012; 18: 3762–71. doi: <u>10.1158/1078-0432.CCR-12-0129</u> PMID: <u>22645050</u>
- Jarrett RF, Stark GL, White J, Angus B, Alexander FE, Krajewski AS, et al. Impact of tumor Epstein-Barr virus status on presenting features and outcome in age-defined subgroups of patients with classic Hodgkin lymphoma: a population-based study. Blood. 2005; 106: 2444–51. doi: <u>10.1182/blood-2004-09-3759</u> PMID: <u>15941916</u>
- Steidl C, Lee T, Shah SP, Farinha P, Han G, Nayar T, et al. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. N Engl J Med. 2010; 362: 875–85. doi: <u>10.1056/NEJMoa0905680</u> PMID: <u>20220182</u>
- Tzankov A, Matter MS, Dirnhofer S. Refined prognostic role of CD68-positive tumor macrophages in the context of the cellular micromilieu of classical Hodgkin lymphoma. Pathobiology. 2010; 77: 301–8. doi: <u>10.1159/000321567</u> PMID: <u>21266828</u>
- Kamper P, Bendix K, Hamilton-Dutoit S, Honoré B, Nyengaard JR, D'Amore F. Tumor-infiltrating macrophages correlate with adverse prognosis and Epstein-Barr virus status in classical Hodgkin's lymphoma. Haematologica. 2011; 96: 269–76. doi: <u>10.3324/haematol.2010.031542</u> PMID: <u>21071500</u>
- Yoon DH, Koh YW, Kang HJ, Kim S, Park C-S, Lee S-W, et al. CD68 and CD163 as prognostic factors for Korean patients with Hodgkin lymphoma. Eur J Haematol. 2012; 88: 292–305. doi: <u>10.1111/j.1600-0609.2011.01731.x</u> PMID: <u>22044760</u>
- 10. Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. Curr Opin Immunol. 2010; 22: 231–7. doi: 10.1016/j.coi.2010.01.009 PMID: 20144856

- 11. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. Immunity. 2010; 32: 593–604. doi: 10.1016/j.immuni.2010.05.007 PMID: 20510870
- Katze MG, He Y, Gale M. Viruses and interferon: a fight for supremacy. Nat Rev Immunol. 2002; 2: 675–87. doi: 10.1038/nri888 PMID: 12209136
- Fiorcari S, Martinelli S, Bulgarelli J, Audrito V, Zucchini P, Colaci E, et al. Lenalidomide interferes with tumor-promoting properties of nurse-like cells in chronic lymphocytic leukemia. Haematologica. 2015; 100: 253–62. Available: <u>http://www.haematologica.org/content/early/2014/11/10/haematol.2014.</u> <u>113217.abstract</u> doi: <u>10.3324/haematol.2014.113217</u> PMID: <u>25398834</u>
- Wan J, Benkdane M, Teixeira-Clerc F, Bonnafous S, Louvet A, Lafdil F, et al. M2 Kupffer cells promote M1 Kupffer cell apoptosis: A protective mechanism against alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology. 2014; 59: 130–142. doi: <u>10.1002/hep.26607</u> PMID: <u>23832548</u>
- Waddell A, Ahrens R, Steinbrecher K, Donovan B, Rothenberg ME, Munitz A, et al. Colonic Eosinophilic Inflammation in Experimental Colitis Is Mediated by Ly6Chigh CCR2+ Inflammatory Monocyte/Macrophage-Derived CCL11. J Immunol. 2011; 186: 5993–6003. doi: <u>10.4049/jimmunol.1003844</u> PMID: <u>21498668</u>
- Wang Y-C, He F, Feng F, Liu X-W, Dong G-Y, Qin H-Y, et al. Notch Signaling Determines the M1 versus M2 Polarization of Macrophages in Antitumor Immune Responses. Cancer Res. 2010; 70: 4840–4849. doi: <u>10.1158/0008-5472.CAN-10-0269</u> PMID: <u>20501839</u>
- Ruffell D, Mourkioti F, Gambardella A, Kirstetter P, Lopez RG, Rosenthal N, et al. A CREB-C/EBPβ cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair. Proc Natl Acad Sci. 2009; 106: 17475–17480. doi: <u>10.1073/pnas.0908641106</u> PMID: <u>19805133</u>
- Biswas SK, Gangi L, Paul S, Schioppa T, Saccani A, Sironi M, et al. A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-κB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). Blood. 2005; 107: 2112–2122. Available: <u>http://www.bloodjournal.org/content/107/5/2112</u>. <u>abstract</u> PMID: <u>16269622</u>
- Leopold Wager CM, Hole CR, Wozniak KL, Olszewski MA, Wormley FL. STAT1 Signaling Is Essential for Protection against Cryptococcus neoformans Infection in Mice. J Immunol. 2014; 193: 4060–4071. doi: <u>10.4049/jimmunol.1400318</u> PMID: <u>25200956</u>
- Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, et al. Perspective Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. Immunity. 2014; 41: 14–20. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.008 PMID: 25035950
- Zhang Y, Wang Y, Lu M, Qiao X, Sun B, Zhang W, et al. Modular Analysis of Bioinformatics Demonstrates a Critical Role for NF-κB in Macrophage Activation. Inflammation. 2014; 37: 1240–1253. doi: <u>10.</u> <u>1007/s10753-014-9851-z</u> PMID: <u>24577727</u>
- Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. Nat Rev Immunol. 2010; 10: 170–181. Available: doi: <u>10.1038/nri2711</u> PMID: <u>20154735</u>
- 23. Cao S, Liu J, Song L, Ma X. The protooncogene c-Maf is an essential transcription factor for IL-10 gene expression in macrophages. J Immunol. 2005; 174: 3484–92. Available: <u>http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2955976&tool = pmcentrez&rendertype = abstract PMID: 15749884</u>
- Van den Bosch MWM, Palsson-Mcdermott E, Johnson DS, O'Neill LAJ. LPS Induces the Degradation of Programmed Cell Death Protein 4 (PDCD4) to Release Twist2, Activating c-Maf Transcription to Promote Interleukin-10 Production. J Biol Chem. 2014; 289: 22980–22990. doi: <u>10.1074/jbc.M114.573089</u> PMID: 24982420
- Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. J Clin Invest. The American Society for Clinical Investigation; 2012; 122: 787–795. doi: 10.1172/JCI59643 PMID: 22378047
- Buechler C, Ritter M, Orsó E, Langmann T, Klucken J, Schmitz G. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. J Leukoc Biol. 2000; 67: 97–103. Available: <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10648003</u> PMID: 10648003
- Sulahian TH, Högger P, Wahner a E, Wardwell K, Goulding NJ, Sorg C, et al. Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155. Cytokine. 2000; 12: 1312–21. doi: 10.1006/cyto.2000.0720 PMID: 10975989
- Barros MHM, Hauck F, Dreyer JH, Kempkes B, Niedobitek G. Macrophage Polarisation: an Immunohistochemical Approach for Identifying M1 and M2 Macrophages. PLoS One. 2013; 8: e80908. doi: <u>10.</u> <u>1371/journal.pone.0080908</u> PMID: <u>24260507</u>
- Fuentes-Duculan J, Suarez-Farinas M, Zaba LC, Nograles KE, Pierson KC, Mitsui H, et al. A Subpopulation of CD163-Positive Macrophages Is Classically Activated in Psoriasis. J Invest Dermatol. 2010; 130: 2412–2422. Available: doi: <u>10.1038/jid.2010.165</u> PMID: <u>20555352</u>

- Barros MHM, Scheliga A, De Matteo E, Minnicelli C, Soares F a, Zalcberg IR, et al. Cell cycle characteristics and Epstein-Barr virus are differentially associated with aggressive and non-aggressive subsets of Hodgkin lymphoma in pediatric patients. Leuk Lymphoma. 2010; 51: 1513–22. doi: 10.3109/ 10428194.2010.489243 PMID: 20687799
- Bartlett JA, Goldklang AR, Schleifer SJ, Keller SE. Immune function in healthy inner-city children. Clin Diagn Lab Immunol. 2001; 8: 740–6. doi: 10.1128/CDLI.8.4.740-746.2001 PMID: 11427420
- Luebke RW, Chen DH, Dietert R, Yang Y, Luster MI. Immune System Maturity and Sensitivity to Chemical Exposure. J Toxicol Environ Health. 2006; 69: 811–825. doi: <u>10.1080/15287390600591496</u>
- Faria AMC, de Moraes SM, de Freitas LHF, Speziali E, Soares TF, Figueiredo-Neves SP, et al. Variation rhythms of lymphocyte subsets during healthy aging. Neuroimmunomodulation. 2008; 15: 365–79. doi: 10.1159/000156478 PMID: 19047812
- Erkeller-Yuksel FM, Deneys V, Yuksel B, Hannet I, Hulstaert F, Hamilton C, et al. Age-related changes in human blood lymphocyte subpopulations. J Pediatr. 1992; 120: 216–22. Available: <u>http://www.ncbi.</u> <u>nlm.nih.gov/pubmed/1735817</u> PMID: <u>1735817</u>
- Heldrup J, Kalm O, Prellner K. Blood T and B lymphocyte subpopulations in healthy infants and children. Acta Paediatr. 1992; 81: 125–32. Available: <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1515755</u> PMID: 1515755
- Hu X, Ivashkiv LB. Cross-regulation of signaling pathways by interferon-gamma: implications for immune responses and autoimmune diseases. Immunity. 2009; 31: 539–50. doi: <u>10.1016/j.immuni.2009</u>. <u>09.002</u> PMID: <u>19833085</u>
- Verbeke CS, Wenthe U, Bergler WF, Zentgraf H. Characterization of the expanded T cell population in infectious mononucleosis: apoptosis, expression of apoptosis-related genes, and Epstein—Barr virus (EBV) status. Clin Exp Immunol. 2000; 120: 294–300. doi: <u>10.1046/j.1365-2249.2000.01181.x</u> PMID: <u>10792379</u>
- Noël W, Raes G, Hassanzadeh Ghassabeh G, De Baetselier P, Beschin A. Alternatively activated macrophages during parasite infections. Trends Parasitol. 2014; 20: 126–133. doi: <u>10.1016/j.pt.2004.01.</u> 004
- Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. J Pathol. 2013; 229: 176–185. doi: 10.1002/path.4133 PMID: 23096265
- Lucas T, Waisman A, Ranjan R, Roes J, Krieg T, Müller W, et al. Differential Roles of Macrophages in Diverse Phases of Skin Repair. J Immunol. 2010; 184: 3964–3977. doi: <u>10.4049/jimmunol.0903356</u> PMID: 20176743
- Deonarine K, Panelli M, Stashower M, Jin P, Smith K, Slade H, et al. Gene expression profiling of cutaneous wound healing. J Transl Med. 2007; 5: 11. Available: <u>http://www.translational-medicine.com/</u> <u>content/5/1/11</u> PMID: <u>17313672</u>
- **42.** Warren KS. A functional classification of granulomatous inflammation. Ann N Y Acad Sci. 1976; 278: 7–18. doi: 10.1111/j.1749-6632.1976.tb47011.x PMID: 786128
- Sánchez-Espiridión B, Sánchez-Aguilera A, Montalbán C, Martin C, Martinez R, González-Carrero J, et al. A TaqMan low-density array to predict outcome in advanced Hodgkin's lymphoma using paraffinembedded samples. Clin Cancer Res. 2009; 15: 1367–75. doi: <u>10.1158/1078-0432.CCR-08-1119</u> PMID: <u>19228737</u>
- Scott DW, Chan FC, Hong F, Rogic S, Tan KL, Meissner B, et al. Gene expression-based model using formalin-fixed paraffin-embedded biopsies predicts overall survival in advanced-stage classical Hodgkin lymphoma. J Clin Oncol. 2013; 31: 692–700. doi: <u>10.1200/JCO.2012.43.4589</u> PMID: <u>23182984</u>
- 45. Vera-Lozada G, Scholl V, Barros MHM, Sisti D, Guescini M, Stocchi V, et al. Analysis of biological and technical variability in gene expression assays from formalin-fixed paraffin-embedded classical Hodgkin lymphomas. Exp Mol Pathol. 2014; 97: 433–9. doi: 10.1016/j.yexmp.2014.09.014 PMID: 25236575
- Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. Nat Immunol. 2010; 11: 889–896. Available: doi: 10.1038/ni.1937 PMID: 20856220
- Qin H, Holdbrooks AT, Liu Y, Reynolds SL, Yanagisawa LL, Benveniste EN. SOCS3 Deficiency Promotes M1 Macrophage Polarization and Inflammation. J Immunol. 2012; 189: 3439–3448. doi: <u>10.</u> 4049/jimmunol.1201168 PMID: 22925925
- Chetaille B, Bertucci F, Finetti P, Esterni B, Stamatoullas A, Picquenot JM, 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. doi: <u>10.1182/blood-2008-07-</u> 168096 PMID: 19096012
- 49. Greaves P, Clear A, Owen A, Iqbal S, Lee A, Matthews J, et al. Defining characteristics of classical Hodgkin lymphoma microenvironment T-helper cells. Blood. 2013; 122: 2856–63. doi: <u>10.1182/blood-2013-06-508044</u> PMID: <u>24004665</u>

- Slivnick DJ, Ellis TM, Nawrocki JF, Fisher RI. The impact of Hodgkin's disease on the immune system. Semin Oncol. 2014; 17: 673–682. Available: <u>http://www.seminoncol.org/article/0093-7754(90)90161-U/abstract</u>
- Wynn TA, Barron L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. Semin Liver Dis. 2010; 30: 245–57. doi: <u>10.1055/s-0030-1255354</u> PMID: <u>20665377</u>
- Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. Immunity. 2014; 41: 14–20. doi: <u>10.1016/j.</u> <u>immuni.2014.06.008</u> PMID: <u>25035950</u>
- Fiorentino D, Bond M, Mosmann T. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. J Exp Med. 1989; 170: 2081–2095. Available: <u>http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2189521/</u> PMID: 2531194
- Anderson CF, Mosser DM. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. J Leukoc Biol. 2002; 72: 101–106. Available: <u>http://www.jleukbio.org/content/72/1/101.</u> <u>abstract PMID: 12101268</u>
- Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. J Leukoc Biol. 2006; 80: 1298–1307. doi: <u>10.1189/jlb.0406249</u> PMID: <u>16905575</u>
- 56. Schoof N, Franklin J, Fürst R, Zander T, von Bonin F, Peyrade F, et al. Interleukin-10 Gene Polymorphisms are Associated With Freedom From Treatment Failure for Patients With Hodgkin Lymphoma. Oncol. 2013; 18: 80–89. doi: <u>10.1634/theoncologist.2012-0291</u>
- Baiocchi OCG. Hodgkin lymphoma and interleukin-10: shall we go down from the tip of the iceberg? Leuk Lymphoma. 2008; 49: 2031–2032. doi: 10.1080/10428190802517799 PMID: 19021042
- Hohaus S, Giachelia M, Massini G, Vannata B, Criscuolo M, Martini M, et al. Clinical significance of interleukin-10 gene polymorphisms and plasma levels in Hodgkin lymphoma. Leuk Res. 2015; 33: 1352– 1356. doi: <u>10.1016/j.leukres.2009.01.009</u>
- 59. Vassilakopoulos TP, Nadali G, Angelopoulou MK, Siakantaris MP, Dimopoulou MN, Kontopidou FN, et al. Serum interleukin-10 levels are an independent prognostic factor for patients with Hodgkin's lymphoma. Haematologica. 2001; 86: 274–281. Available: <u>http://www.haematologica.org/content/86/3/274.abstract</u> PMID: <u>11255274</u>
- Gjuvsland AB, Plahte E, Omholt SW. Threshold-dominated regulation hides genetic variation in gene expression networks. BMC Syst Biol. 2007; 1: 57. doi: <u>10.1186/1752-0509-1-57</u> PMID: <u>18062810</u>
- 61. Jiang SL, Samols D, Rzewnicki D, Macintyre SS, Greber I, Sipe J, et al. Kinetic modeling and mathematical analysis indicate that acute phase gene expression in Hep 3B cells is regulated by both transcriptional and posttranscriptional mechanisms. J Clin Invest. 1995; 95: 1253–1261. Available: <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC441464/</u> PMID: 7883974
- Roussel Y, Harris A, Lee MH, Wilks M. Novel methods of quantitative real-time PCR data analysis in a murine Helicobacter pylori vaccine model. Vaccine. 2007; 25: 2919–2929. doi: <u>10.1016/j.vaccine.2006</u>. 07.013 PMID: 16905224
- Harris J, Jain S, Ren Q, Zarineh A, Liu C, Ibrahim S. CD163 versus CD68 in tumor associated macrophages of classical Hodgkin lymphoma. Diagn Pathol. 2012; 7: 12. doi: <u>10.1186/1746-1596-7-12</u> PMID: <u>22289504</u>
- Zaki MAA, Wada N, Ikeda J, Shibayama H, Hashimoto K, Yamagami T, et al. Prognostic implication of types of tumor-associated macrophages in Hodgkin lymphoma. Virchows Arch. 2011; 459: 361–6. doi: 10.1007/s00428-011-1140-8 PMID: 21874508
- Vakkila J, Lotze MT, Riga C, Jaffe R. A basis for distinguishing cultured dendritic cells and macrophages in cytospins and fixed sections. Pediatr Dev Pathol. 2005; 8: 43–51. doi: <u>10.1007/s10024-004-5045-2</u> PMID: <u>15717117</u>
- 66. Högger P, Dreier J, Droste A, Buck F, Sorg C. Identification of the integral membrane protein RM3/1 on human monocytes as a glucocorticoid-inducible member of the scavenger receptor cysteine-rich family (CD163). J Immunol. 1998; 161: 1883–90. Available: <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9712057</u> PMID: <u>9712057</u>
- Jakovic LR, Mihaljevic BS, Perunicic Jovanovic MD, Bogdanovic AD, Andjelic BM, Bumbasirevic VZ. The prognostic relevance of tumor associated macrophages in advanced stage classical Hodgkin lymphoma. Leuk Lymphoma. 2011; 52: 1913–9. doi: 10.3109/10428194.2011.580026 PMID: 21663512
- Heusinkveld M, van der Burg SH. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. J Transl Med. 2011; 9: 216. doi: <u>10.1186/1479-5876-9-216</u> PMID: <u>22176642</u>
- Medrek C, Pontén F, Jirström K, Leandersson K. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. BMC Cancer. 2012; 12: 306. doi: <u>10.</u> <u>1186/1471-2407-12-306</u> PMID: <u>22824040</u>

- 70. Fujii N, Shomori K, Shiomi T, Nakabayashi M, Takeda C, Ryoke K, et al. Cancer-associated fibroblasts and CD163-positive macrophages in oral squamous cell carcinoma: their clinicopathological and prognostic significance. J oral Pathol Med. 2012; 41: 444–51. doi: <u>10.1111/j.1600-0714.2012.01127.x</u> PMID: <u>22296275</u>
- 71. Komohara Y, Hasita H, Ohnishi K, Fujiwara Y, Suzu S, Eto M, et al. Macrophage infiltration and its prognostic relevance in clear cell renal cell carcinoma. Cancer Sci. 2011; 102: 1424–31. doi: <u>10.1111/j.</u> <u>1349-7006.2011.01945.x</u> PMID: <u>21453387</u>
- 72. Kurahara H, Shinchi H, Mataki Y, Maemura K, Noma H, Kubo F, et al. Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer. J Surg Res. 2011; 167: e211–9. doi: <u>10.1016/j.jss.</u> 2009.05.026 PMID: <u>19765725</u>
- Chaplin DD. Overview of the immune response. J Allergy Clin Immunol. 2010; 125: S3–S23. doi: <u>10.</u> <u>1016/j.jaci.2009.12.980</u> PMID: <u>20176265</u>
- 74. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. J Allergy Clin Immunol. 2010; 125: S33–40. doi: <u>10.1016/j.</u> jaci.2009.09.017 PMID: <u>20061006</u>
- Scott DW, Gascoyne RD. The tumour microenvironment in B cell lymphomas. Nat Rev Cancer. 2014; 14: 517–534. Available: doi: <u>10.1038/nrc3774</u> PMID: <u>25008267</u>
- 76. Qian B-Z, Pollard JW. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. Cell. 2014; 141: 39–51. doi: <u>10.1016/j.cell.2010.03.014</u>
- 77. Diehl V. Are macrophages the bad guys in Hodgkin lymphoma? Nat Rev Clin Oncol. 2010; 7: 301–2. doi: 10.1038/nrclinonc.2010.71 PMID: 20517336