UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

NATHALIA JOANNE BISPO CEZAR

**Participação de genes relacionados ao processo inflamatório no
Diabetes *Mellitus* Gestacional**

**RIBEIRÃO PRETO
2013**

NATHALIA JOANNE BISPO CEZAR

**Participação de genes relacionados ao processo inflamatório no
Diabetes *Mellitus* Gestacional**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Versão corrigida. A versão original encontra-se na
secretaria da pós-graduação.

Área de Concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Aleixo da Silva
Passos Júnior

RIBEIRÃO PRETO

2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Cezar, Nathalia Joanne Bispo

Participação de genes relacionados ao processo inflamatório no Diabetes *Mellitus* Gestacional. Ribeirão Preto, 2013.

113p.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Genética.

Orientador: Passos, Geraldo Aleixo

1. Diabetes *Mellitus* Gestacional. 2. *Microarrays*.
3. Expressão gênica. 4. Genes de inflamação.

FOLHA DE APROVAÇÃO

NATHALIA JOANNE BISPO CEZAR

Participação de genes relacionados ao processo inflamatório no Diabetes
Mellitus Gestacional

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Genética

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho

Aos meus pais, pelo apoio incondicional e pelos valores que me transmitiram desde os meus primeiros passos. O diferencial em minha formação foi ter tido vocês como exemplo de luta, coragem e perseverança.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e equilíbrio que me concedeu diante dos obstáculos enfrentados durante esta etapa.

Aos meus pais, Severiano Cezar e Rosa Bispo, por me ensinar a lutar, argumentar, perseverar e defender meus ideais dando exemplo de caráter e integridade. Obrigada por me convencer que sempre vale a pena arriscar para crescer, por mostrar desde cedo que lamentar não soluciona nossos problemas e o que precisamos é do respeito e não da piedade do mundo. Agradeço a participação diária, apesar da distância física, e pela alegria verdadeira diante das minhas conquistas. Ao meu irmão Augusto Bispo, por todo incentivo e pela torcida. Por nossa união tão pura e sincera nesses 25 anos da minha vida.

Ao meu Henrique Andrade, pela compreensão e apoio incondicional, por toda paciência durante esse período. Por sonhar e lutar junto comigo. Por estar ao meu lado independente de qualquer distância.

Ao professor Geraldo Passos, pela oportunidade, confiança, compreensão e suporte para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço a contribuição para minha formação científica.

Aos pesquisadores e participantes do projeto temático FAPESP, ao qual este trabalho está inserido: Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto-Hojo e Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi e aos pacientes, sem os quais esse trabalho não poderia ser realizado.

À Adriane Feijó, pela amizade e participação fundamental na concretização deste trabalho. Pela imensa ajuda, paciência e dedicação. Agradeço as orientações e o aprendizado.

À amiga Renata Almeida, pelo apoio e disponibilidade e por todas as discussões científicas que muito contribuíram para este trabalho.

Às colegas do Laboratório de Imunogenética Molecular, pela convivência durante o período do mestrado. Agradeço especialmente à Thais Arns e Amanda Assis pela atenção, participação e grande colaboração, à Cristhiana Collares e Juliana Massaro pelo incentivo e pelo carinho.

Aos colegas do Laboratório de Mutagênese, Danilo Xavier, Paula Takahashi, Fernanda Caetano, Fernanda Paula e Leonardo Franchi pela receptividade. Em especial, a Danilo pela gentileza, disponibilidade, compromisso e pela contribuição fundamental.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, especialmente ao coordenador, Prof. Dr. Ademilson Spencer Egea Soares. A Secretaria do Departamento, em especial às secretárias Susie Nalon e Silvia Consiglieri pela atenção e dedicação.

Aos membros da banca examinadora pelas sugestões, contribuições e críticas.

À minha avó Matilde Bispo, pelo exemplo de força e luta, pelas palavras ditas na última vez que tivemos a oportunidade de conversar. Obrigada pela confiança.

Às amigas Fernanda Bueno e Lais Sacramento, pela união, parceria e compreensão nesses dois anos de convivência diária. Agradeço o apoio e a torcida sincera. Os momentos felizes que partilhamos estarão sempre em minha memória.

À amiga Ana Cláudia da Silveira, pelo carinho, incentivo, suporte e pelas infinitas orações. Às amigas Rebecka Maranhão, Carolina Vasconcelos e Danielly Cantarelli pela companhia, apesar da distância, e pelos muitos momentos felizes. Ao amigo Martone Souza, pelo estímulo.

A todos aqueles que, mesmo não tendo sido mencionados, de alguma forma contribuíram, oraram, acreditaram e vibraram com esta conquista.

“Tente uma, duas, três vezes e se possível tente a quarta, a quinta e quantas vezes forem necessárias. Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista. Se você quer chegar aonde a maioria não chega, faça aquilo que a maioria não faz.”

(Bill Gates)

RESUMO

CEZAR, NJB. **Participação de genes relacionados ao processo inflamatório no diabetes *mellitus* gestacional.** 2013. 113p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil, 2013.

O diabetes *mellitus* gestacional (DMG) é o distúrbio metabólico mais comum da gravidez. A definição padrão do DMG consiste no metabolismo anormal da glicose diagnosticado pela primeira vez durante a gestação. Mulheres que têm história de DMG geralmente apresentam diabetes pós-parto, resistência à insulina, síndrome metabólica, hipertensão e dislipidemia. A detecção precoce deste estado metabólico anormal é importante para eventual intervenção na tentativa de impedir ou mesmo retardar o aparecimento dos outros tipos de diabetes. Alguns estudos têm apontado, em mulheres com DMG, indução de genes envolvidos com resposta imune, particularmente aqueles associados com inflamação. A identificação de genes de inflamação induzidos em gestantes com DMG tem fornecido a base para elucidar a ligação entre vias inflamatórias e DMG. Para testar esta hipótese foi realizada a comparação do perfil transcricional de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de pacientes com DMG e controles. As amostras de RNA total foram hibridadas utilizando oligo *microarrays* Agilent® 4 x 44 K englobando o genoma funcional humano total. Os mRNAs diferencialmente expressos foram identificados aplicando-se a análise de *Rank Products*, e posteriormente submetidos ao agrupamento hierárquico de *Pearson* por meio do *software Cluster*. Utilizando o programa *TreeView*, foi realizada a construção dos dendrogramas com as representações espaciais dos mRNAs, classificados de acordo com suas funções moleculares e vias biológicas. A partir do banco de dados DAVID, foram identificados 130 processos biológicos significantes ($P < 0.05$) incluindo os de resposta imune e defesa, resposta inflamatória, regulação de citocinas, apoptose, desenvolvimento de vasos sanguíneos e proliferação celular. Entre as vias de maior relevância destacamos a via de interação entre receptores de citocinas e a de sinalização do receptor *NOD-like*, além das vias de câncer, lúpus e asma. Adicionalmente, encontramos os transcritos dos genes *IGFBP2*, *TCF3*, *OLR1*, *TCF7L2*, previamente associados a alterações metabólicas, diferencialmente expressos nas gestantes com DMG. Também observamos que genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), *HLA-DRB6*, *HLA-DQA2*, *HLA-DQB2*, *HLA-DQB1*, *HLA-DOA*, apresentaram mRNAs induzidos nas pacientes com DMG. A partir deste estudo, constatamos que vias relacionadas ao sistema imunológico e categorias funcionais associadas à inflamação participam da patogenia do DMG. Além disso, evidenciamos que transcritos de genes que pertencem ao MHC e aqueles envolvidos em processos metabólicos, estiveram diferencialmente expressos no DMG. Estes resultados confirmam nossa hipótese inicial e contribuem para o melhor entendimento das bases genéticas desta doença.

Palavras-chave: Diabetes *mellitus* gestacional, *microarrays*, expressão gênica, genes de inflamação.

ABSTRACT

CEZAR, NJB. **Participation of genes related to inflammatory process in gestational diabetes mellitus**. 2013. 113p. Master's Dissertation – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Gestational Diabetes *Mellitus* (GDM) is the most common metabolic disorder found during pregnancy. The standard definition of GDM is the abnormal glucose metabolism first diagnosed during pregnancy. Women who have a history of GDM usually present postpartum diabetes, insulin resistance, metabolic syndrome, hypertension and dyslipidemia. Early detection of this abnormal metabolic status may permit early intervention to prevent or even delay the development of other types of diabetes. The induction of genes involved in immune response in women with GDM has been reported, particularly those associated with inflammatory pathways, providing basis proposing that inflammation genes might be associated to GDM. To test this hypothesis, we compared the transcriptome profiling of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of GDM patients and controls. The total RNA samples were hybridized to Agilent® 4 x 44 K oligo microarrays covering the whole human functional genome. Differentially expressed mRNAs were obtained by Rank Product analysis and then submitted to hierarchical clustering using the Cluster *software*. Dendrograms and spatial representations of mRNAs were constructed through the TreeView *software*. These mRNAs were classified according to their molecular functions and biological pathways using the DAVID database. We observed 130 significant biological processes ($P < 0.05$), including immune and defense response, inflammatory response, regulation of cytokines, apoptosis, blood vessels development and cell proliferation. Among the most relevant pathways, we highlighted the interaction between cytokine receptors, NOD-like receptor signaling and cancer, lupus and asthma pathways. Additionally, we found transcripts of the genes *IGFBP2*, *TCF3*, *OLR1*, *TCF7L2*, which were previously associated with metabolic abnormalities, differentially expressed in pregnant women with GDM. Some major histocompatibility complex (MHC) genes (*HLA-DRB6*, *HLA-DQA2*, *HLA-DQB2*, *HLA-DQB1*, *HLA-DOA*) also presented mRNAs induced in patients with GDM. In conclusion, we found that immune-related pathways and functional categories associated with inflammation participate in the pathogenesis of DMG. Furthermore, we showed that transcripts of genes belonging to MHC and those involved in metabolic processes were differentially expressed in DMG. These results confirmed our initial hypothesis and contribute to a better understanding of the genetics basis of this disease.

Keywords: Gestational diabetes *mellitus*, microarrays, gene expression, inflammation genes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Interação entre as moléculas HLA-G, expressas pelas células placentárias, e receptores inibitórios das células natural killer. A figura também ilustra a inibição das moléculas MHC classe I e II pelas células fetais.....	23
Figura 2 -	Distribuição dos alelos de risco para DM2 em pacientes com DMG e em controles com tolerância a glicose (LAUENBORG, 2009).....	24
Figura 3 -	Etapas gerais de experimentos de <i>microarrays</i> para análise de transcriptomas. Figura baseada nos sites (http://www.microarray.lu/en/MICROARRAY_Overview.shtml) e (http://en.wikipedia.org/wiki/File:Heatmap.png).....	27
Figura 4 -	Densitometria da amostra de RNA de paciente com DMG isolada de PBMCs. RNA integrity number (RIN) = 9,0	36
Figura 5 -	Representação das reações de transcrição reversa, amplificação, purificação e hibridação de microarray da plataforma Agilent. Adaptado de (“G4140- 90040_GeneExpression_One-color_v6.5.pdf (objeto application/pdf)”.....	38
Figura 6 -	Delineamento experimental.....	42
Figura 7 -	<i>Pipeline</i> para análises de bioinformática dos dados de <i>microarrays</i>	42
Figura 8 -	Gráficos <i>boxplot</i> dos dados de <i>microarrays</i> utilizados neste trabalho após normalização a partir da metodologia <i>quantile</i>	45
Figura 9 -	Agrupamento hierárquico a partir da correlação de <i>Pearson</i> . Em destaque a separação entre os grupos de pacientes e controles.....	46
Figura 10 -	Heatmap ilustrativo das categorias identificadas a partir da ferramenta de análise funcional DAVID. Em destaque os processos mais significativos. A escala em cinza representa o valor de <i>P</i> em módulo logarítmico.....	48
Figura 11 -	Principais vias identificadas a partir da análise funcional usando DAVID. A escala em cinza representa o valor de <i>P</i> em módulo logarítmico.....	49
Figura 12 -	Representação do perfil de expressão dos mRNAs envolvidos com metabolismo entre pacientes com DMG e controles saudáveis. A figura ilustra os valores de <i>fold change</i> (FC) para cada transcrito e destaca a modulação positiva para <i>IGFBP2</i> e <i>TCF3</i> e negativa para <i>OLRI</i> e <i>TCF7L2</i>	53
Figura 13 -	Representação do perfil de expressão dos transcritos dos genes MHC entre pacientes com DMG e controles saudáveis e seus respectivos valores de <i>fold change</i> (FC)	54

- Figura 14 -** Gráficos com os valores de expressão gênica relativa (RQ) dos genes *CXCL2* (A), *NFKB1A* (B) (Análise estatística teste t; $P < 0.05$). 56
- Figura 15 -** Gráficos com os valores de expressão gênica relativa (RQ) dos genes *IL1B* (C), *TNF* (D) (Análise estatística teste t; $P > 0.05$). 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação etiológica do Diabetes <i>Mellitus</i>	15
Tabela 2 -	Características clínicas dos controles utilizados neste trabalho	33
Tabela 3 -	Características clínicas das pacientes com DMG	34
Tabela 4 -	Processos biológicos de maior relevância para este estudo. Em destaque os genes que fazem parte de cada processo, o valor do <i>P-value</i> e o código do <i>Gene Ontology</i>	50
Tabela 5 -	Vias biológicas de maior relevância para este estudo. Em destaque a categoria e os genes de cada via e o valor do <i>P-value</i>	51
Tabela 6 -	Oligonucleotídeos <i>primers</i> dos genes humanos utilizados nas reações de PCR.....	55

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Definição e classificação do Diabetes <i>Mellitus</i>	15
1.2 Epidemiologia do Diabetes <i>Mellitus</i>	17
1.3 Diabetes <i>Mellitus</i> Gestacional	18
1.4 Patogênese do Diabetes <i>Mellitus</i> Gestacional	19
1.5 Imunogenética da gravidez	21
1.6 Genética do Diabetes <i>Mellitus</i> Gestacional	23
1.7 Análise de transcriptomas pela tecnologia de <i>microarrays</i>	25
2 HIPÓTESE.....	29
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo Geral	31
3.2 Objetivos Específicos	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 População de estudo	33
4.2 Coleta de sangue e separação de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de pacientes e controles	34
4.3 Extração de RNA total e avaliação da integridade	35
4.4 Reação de hibridação com <i>oligo-microarrays</i>	36
4.5 Análise dos dados de <i>microarrays</i>	39
4.5.1 Quantificação e normalização dos dados	39
4.5.2 Análise estatística	40
4.5.3 Análise funcional	40
4.6 Confirmação dos dados de <i>microarrays</i> por PCR em tempo real	41
4.7 Análise estatística dos dados de PCR em tempo real	41
5 RESULTADOS	44
5.1 Análise dos Dados de <i>Microarrays</i>	44
5.2 Análise funcional a partir da plataforma DAVID	47
5.3 Perfil de expressão de genes envolvidos com metabolismo e componentes do MHC no DMG	52
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÕES.....	70
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
9 ANEXOS	87

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Definição e classificação do Diabetes *Mellitus*

De acordo com a *American Diabetes Association* (ADA), o Diabetes *Mellitus* (DM) corresponde a um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção e/ou na ação da insulina. Vários processos patogênicos estão envolvidos no desenvolvimento do DM (ADA, 2010).

Os sintomas clínicos da resistência insulínica incluem reações de: poliúria, polidipsia, perda de peso, na maioria das vezes com polifagia ou ainda complicações agudas que podem levar a risco de vida. A hiperglicemia crônica está associada a dano, disfunção e falência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (GROSS et al., 2002).

A classificação do DM proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (ALBERTI; ZIMMET, 1998) inclui quatro classes clínicas de diabetes: Diabetes *Mellitus* tipo 1 (DM1), Diabetes *Mellitus* tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de diabetes *mellitus* e Diabetes *Mellitus* Gestacional (DMG) (Tabela 1). Ainda existem duas categorias, a glicemia de jejum alterada e a tolerância à glicose diminuída. Essas categorias não são entidades clínicas, mas fatores de risco para o desenvolvimento do DM.

Tabela 1. Classificação etiológica do Diabetes *Mellitus* (GROSS et al., 2002).

I. Diabetes tipo 1
• destruição das células beta, usualmente levando à deficiência completa de insulina
A. auto-imune
B. idiopático
II. Diabetes tipo 2
• graus variados de diminuição de secreção e resistência à insulina
III. Outros tipos específicos
A. Defeitos genéticos da função da célula β
B. Defeitos genéticos da ação da insulina
C. Doenças do pâncreas exócrino
D. Endocrinopatias
E. Indução por drogas ou produtos químicos
F. Infecções
G. Formas incomuns de diabetes imuno-mediado
IV. Diabetes Gestacional

O DM1 tem início em indivíduos jovens sendo também denominado diabetes juvenil, embora possa se desenvolver em qualquer idade. É uma doença crônica autoimune que ocorre em indivíduos geneticamente susceptíveis (ATKINSON; EISENBARTH, 2001). O sistema imunológico do próprio corpo ataca as células betas das ilhotas de langerhans do pâncreas, destruindo-as reduzindo e eventualmente eliminando a produção de insulina (VAN BELLE; COPPIETERS; VON HERRATH, 2011).

Um locus crítico de susceptibilidade para doenças autoimunes em humanos, incluindo DM1, é a região *HLA* (antígeno leucocitário humano) no cromossomo 6p21 (NERUP et al., 1974). Inúmeros novos loci de susceptibilidade foram identificados desde então, mas nenhum deles coincide com a forte associação encontrada com a região *HLA* (CONCANNON; RICH; NEPOM, 2009).

O diabetes autoimune é raramente causado por defeitos mutacionais em um único gene. As formas monogênicas são geralmente acompanhadas de várias outras doenças autoimunes, devido ao rompimento de vias regulatórias comuns. Um exemplo são as mutações que ocorrem no fator de transcrição *AIRE* (regulador autoimune), que desencadeiam doenças autoimunes graves, nas quais em 20% dos casos há desenvolvimento de DM1 (VILLASEÑOR; BENOIST; MATHIS, 2005).

O DM2 representa 90-95% de todos os tipos de diabetes. A maioria dos pacientes com DM2 é obesa e a obesidade causa algum grau de resistência à insulina (ADA, 2010). Existem várias e diferentes causas para essa forma de diabetes, incluindo fatores genéticos e ambientais (GALINDO *et al.*, 2009). Na maioria dos casos, o DM2 se comporta de acordo com o modelo de herança multifatorial ou poligênico (AGUIAR e SILVA, 2009), embora também sejam relatados casos de DM2 monogênico.

Na forma poligênica do DM2 vários genes atuam em fenótipos intermediários do diabetes que influenciam a homeostase glicêmica. Cada gene apresenta individualmente um efeito limitado, não podendo sozinho levar ao desenvolvimento da doença. Porém quando transmitidos juntos, e na presença de fatores ambientais desfavoráveis, podem ser expressos clinicamente. Os alelos de risco dos poligenes do diabetes podem ser raros ou apresentar alta prevalência na população. Sendo assim, grande parcela dos indivíduos pode ser susceptível ao diabetes se ocorrerem alterações nos hábitos de vida. Esta observação poderia justificar o aumento dos casos de obesidade e diabetes nas populações que tiveram seu estilo de vida alterado nas últimas décadas (REIS; VELHO, 2002).

As formas monogênicas do DM2 representam entre 5 a 10% dos casos de diabetes, têm início frequentemente precoce (infância, adolescência ou adulto jovem). Uma mutação

em um só gene transmitida de forma autossômica-dominante é suficiente para promover a hiperglicemia (REIS; VELHO, 2002). A forma monogênica mais frequente do DM2 é *Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY)*. O fenótipo dos pacientes *MODY* é caracterizado por hiperglicemia crônica de origem não autoimune. As formas mais graves acarretam desenvolvimento de complicações crônico-degenerativas semelhante ao DM2 clássico de início tardio (REIS; VELHO, 2002).

O DMG consiste na intolerância a glicose com início durante a gravidez (SHAAT et al., 2005). É associado tanto a resistência insulínica quanto a diminuição da função das células beta pancreáticas. O DMG será abordado em mais detalhes nas próximas sessões.

1.2 Epidemiologia do Diabetes *Mellitus*

No Brasil, um estudo multicêntrico realizado em nove capitais em 1988 demonstrou prevalência do diabetes em 7,6% dos indivíduos na faixa etária entre 30 e 69 anos. Neste mesmo estudo foi observado que 2,7% dos indivíduos na faixa etária de 30 a 59 anos apresentaram DM, contrastando com 17,4% para a de 60-69 anos, o que caracteriza um aumento de 6,4 vezes (MALERBI; FRANCO, 1992). Em outra pesquisa de rastreamento do diabetes, foi demonstrada a prevalência do diabetes em 11% para pessoas acima de 40 anos (Ministério da Saúde, 2001). Dados mais recentes apontam para taxas mais elevadas, como 12,1%, em um estudo desenvolvido em Ribeirão Preto, cidade de porte médio do estado de São Paulo (TORQUATO et al., 2003).

Entre os principais tipos de DM, o DMG é o distúrbio metabólico mais comum na gravidez (GUEUVOGHLANIAN-SILVA et al., 2012). Segundo a ADA (2010), 7% das gestantes apresentam DMG, o que representa mais de 200.000 casos por ano. A prevalência é de 1% a 14% do total de gestantes variando de acordo com a população avaliada e com o protocolo de diagnóstico aplicado. Algumas populações consideradas de alto risco mostram prevalências superiores a essa faixa, um exemplo é a prevalência no Qatar (16,3%), conhecida como uma das maiores do mundo, (BENER; SALEH; AL-HAMAQ, 2011).

Dados do Estudo Brasileiro de Diabetes Gestacional (EBDG) apontam prevalência de 7,6% de DMG no Brasil, sendo que 94% dos casos apresentam apenas tolerância diminuída à glicose e 6% hiperglicemia no nível do diabetes (Ministério da Saúde, 2001).

O DMG está associado com morbidade materna e perinatal aumentada. As consequências a longo prazo incluem o desenvolvimento de DM2, doenças cardiovasculares e

síndrome metabólica (GUEUVOGHLANIAN-SILVA et al., 2012), sendo considerado um problema de saúde pública.

1.3 Diabetes *Mellitus* Gestacional

A gravidez é um período progressivamente hiperglicêmico da vida, acompanhado pelo aumento da resistência à insulina a partir da metade da gestação. A hiperglicemia tem papel importante na nutrição e desenvolvimento do feto, fornecendo-lhe níveis adequados de glicose (VRACHNIS et al., 2012). O DMG é uma condição em que mulheres grávidas sem diagnóstico prévio de diabetes *mellitus* apresentam altos níveis de glicose no sangue (RAY et al., 2010).

No DMG, o quadro de hiperglicemia está associado com aumento da morbimortalidade fetal, caracterizada por alta frequência de malformações, macrosomia, hiperbilirrubinemia, policitemia, hipocalcemia, hipomagnesemia, cardiomiopatia hipertrófica e síndrome do desconforto respiratório do recém-nascido (CROWTHER et al., 2005). O estudo multicêntrico *Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes* mostrou que a hiperglicemia tem efeito significativo na gravidez, além de associação com peso aumentado do infante ao nascimento e complicações (MULLA; HENRY; HOMKO, 2010). O descontrole glicêmico durante a gestação está relacionado com doença hipertensiva específica da gravidez, indicação de cesáreas e hipertensão arterial.

Entre os fatores de risco sociodemográficos e ambientais que contribuem para o desenvolvimento do DMG, estão incluídos idade materna avançada, aumento do tecido adiposo materno, tabagismo e estilo de vida sedentário (GUEUVOGHLANIAN-SILVA et al., 2012). Sendo assim, as complicações para o feto e o risco aumentado da gestante permanecer diabética ou desenvolver a doença no futuro, tornam imperativa a necessidade de prevenção e controle eficaz (CROWTHER et al., 2005).

Estudos apontam genes envolvidos em etapas-chave do metabolismo de ácidos graxos, no transporte e nas vias de ativação dos lipídios induzidos em gestantes com DMG e DM1 (RADAELLI et al., 2009). Outros fatores que predispõem ao DMG incluem ser membro de um grupo étnico com altos índices de DM2, ter hipertensão relacionada à gravidez, um forte histórico familiar de DM2 em parentes de primeiro grau ou história de DMG em gestações anteriores (FERNÁNDEZ-MORERA et al., 2010). A prevalência de DM2 em parentes de mulheres com DMG já foi observada (MCLELLAN et al., 1995).

A maioria das mulheres com DMG é obesa, apresenta incapacidade funcional das células beta-pancreáticas e resistência à insulina (LAUENBORG et al., 2009). Algumas destas parecem ter uma predisposição genética para desenvolver intensa resposta inflamatória, o que pode aumentar o risco de desenvolver DMG (GUEUVOGHLANIAN-SILVA et al., 2012).

Evidências sugerem que duas vias principais podem desencadear o DMG: resistência à insulina e inflamação, além disso, a obesidade apresenta papel importante no desenvolvimento desta condição (VRACHNIS et al., 2012). Ambos DMG e obesidade são condições que têm em comum um estado de inflamação crônica subclínica, caracterizado pela produção anormal de citocinas e ativação de vias de sinalização relacionadas a inflamação (DAHER et al., 2011).

O aumento dos níveis de mediadores inflamatórios durante e após a gravidez é relatado em pacientes com DMG. Da mesma forma, o aumento da gordura corporal tem sido fortemente associado com inflamação, necrose dos adipócitos, hipóxia e liberação de quimiocinas (VRACHNIS et al., 2012). Um possível mecanismo patogênico compartilhado tem sido atribuído aos macrófagos que secretam citocinas e ativam a produção de mediadores de inflamação. Como resultado, o tecido adiposo, torna-se infiltrado com macrofagos (VRACHNIS et al., 2012).

1.4 Patogênese do Diabetes *Mellitus* Gestacional

A necessidade de insulina é alta durante a gravidez normal e difere apenas ligeiramente entre mulheres saudáveis e diabéticas. No entanto, mulheres com DMG mostram consistentemente respostas reduzidas a este hormônio. A condição fisiológica do DMG é representada basicamente em função do aumento da resistência insulínica ou pela diminuição da sensibilidade a este hormônio em decorrência de um defeito na função pancreática das células beta, comumente encontrado em mulheres com DMG (OZTEKIN, 2007; KAAJA; RÖNNEMAA, 2008).

A resistência insulínica parece resultar de uma combinação do aumento da adiposidade materna e dos efeitos dessensibilizantes da insulina por produtos hormonais da placenta. O fato de esta resistência diminuir rapidamente após o parto sugere que os principais contribuintes para este estado sejam os hormônios placentários (BUCHANAN; XIANG, 2005). Além disso, é importante ressaltar o papel das citocinas na indução da resistência a insulina e no estímulo da resposta inflamatória aguda. Considerando que diversas citocinas

estão aumentadas durante a gravidez, a inflamação tem sido considerada fator determinante no desenvolvimento do DMG (DAHER et al., 2011).

Os defeitos na função das células beta do pâncreas em mulheres com DMG podem ser decorrentes da destruição autoimune destas células, como ocorre no DM1. Esta destruição é caracterizada pela circulação de receptores dirigidos contra as ilhotas pancreáticas (anticorpos anti-células das ilhotas) ou antígenos de células beta (tais como descarboxilase do ácido glutâmico, GAD, ou autoanticorpos contra insulina, IAA). Essas pacientes parecem ter evolução para o DM1 (KAAJA; RÖNNEMAA, 2008). Os anticorpos anti-células das ilhotas ou anti-GAD estão presentes em menos de 10% das pacientes DMG. Essas mulheres podem desenvolver rapidamente diabetes após a gravidez. Outra causa para uma função beta-celular com defeito no DMG são mutações em autossomos, com subtipos genéticos denotados como *MODY-1*, *MODY-2*, entre outros. Mutações que causam subtipos *MODY* têm sido encontradas em mulheres com DMG (BUCHANAN; XIANG, 2005).

Outra condição recentemente associada à patogênese do DMG aponta para defeitos pós-receptor presentes na via de sinalização da insulina na placenta de mulheres com gestações complicadas pelo diabetes e pela obesidade (COLOMIERE et al., 2009). Alterações na via de sinalização da insulina, localização anormal de transportadores *GLUT4*, diminuição da expressão de *PPAR γ* e transporte reduzido de glicose mediado por insulina já foram evidenciados no músculo esquelético e em células adiposas de mulheres com DMG (BUCHANAN; XIANG, 2005).

Embora os mecanismos patofisiológicos detalhados que levam ao DMG sejam ainda desconhecidos, alguns polimorfismos e a função alterada de determinados genes são os principais responsáveis pelo controle do metabolismo celular e da ação da insulina, podendo influenciar no desenvolvimento da doença (OZTEKIN, 2007). Tem sido proposto que os eventos que conduzem ao desenvolvimento do DMG são acionados por uma carga antigênica que é própria do feto. A expressão do antígeno leucocitário humano-G (*HLA-G*), que protege o feto do ataque imune através da baixa regulação das respostas de células T citotóxicas que estariam dirigidas a antígenos do trofoblasto fetal, é necessária para proteger as células das ilhotas pancreáticas. A interação entre *HLA-G* e o fator nuclear-kB (*NF-kB*), é sugerida como essencial nos eventos que levam ao desenvolvimento de DMG (KAAJA; RÖNNEMAA, 2008).

Além disso, tem sido mostrado que o desenvolvimento de DM em pacientes que se submeteram a transplante de órgãos é análogo ao desenvolvimento de DMG numa proporção de gravidezes. Em ambos os casos, a carga antigênica desencadeia o processo diabetogênico.

Adicionalmente, fatores humorais e neurais que incluem alterações de catecolaminas, cortisol e hormônios sexuais também são relevantes no desenvolvimento desta doença (OZTEKIN, 2007).

1.5 Imunogenética da gravidez

Na gravidez existe um contato próximo entre o sistema imune materno, células e tecidos fetais. O corpo feminino passa por diversas alterações em seu perfil imunológico para se adaptar à presença do feto. Sendo assim, mecanismos específicos devem atuar para modular o sistema imune materno, impedindo a rejeição do feto. Alterações nestes mecanismos podem gerar complicações durante a gestação (HVIID, 2006).

Alguns trabalhos têm relatado alterações imunológicas que ocorrem durante o período gestacional, incluindo aquelas envolvidas na tolerância ao feto. (ALUVIHARE; KALLIKOURDIS; BETZ, 2004; TROWSDALE; BETZ, 2006).

Os diversos fatores imunológicos que atuam na manutenção da homeostase durante a gestação incluem: o perfil de produção de citocinas do tipo Th2 (MARZI et al., 1996), a presença de células T regulatórias (SAITO; SASAKI; SAKAI, 2005) e a ação imunossupressora da molécula HLA-G (HVIID, 2006). Além disso, para que não haja rejeição, é essencial a ausência da expressão de moléculas MHC (*Major Histocompatibility Complex*) de classe I e II nas células trofoblásticas.

As duas principais populações efectoras de células T auxiliares regulam-se mutuamente e dividem-se em subpopulações: Th1 e Th2. As células Th1 produzem principalmente *IFN- γ* e *IL-2* e desempenham papel nas respostas imunes celulares contra patógenos intracelulares. Já as células Th2 secretam *IL-4*, *IL-5* e *IL-10* estando envolvidas na imunidade humoral (MOSMANN; SAD, 1996). Alguns estudos mostram que um padrão efector Th2 está associado ao sucesso gestacional e que a manutenção de um padrão Th1 é prejudicial para a gravidez (MAKHSEED et al., 2001; CLARK; CROITORU, 2001).

Outro ponto importante consiste no fato das células T regulatórias atuarem em um papel crítico na tolerância materna ao feto (SAITO; SASAKI; SAKAI, 2005). O sistema imune fetal evita o ataque pelas células maternas que atravessam a placenta, através da ação de células T regulatórias capazes de reconhecer as células maternas (VIANNA, 2009).

Ainda nesse contexto, a molécula HLA-G desempenha papel fundamental na regulação da gestação, atuando na manutenção de ambiente imunossupressor a fim de evitar rejeição fetal (KOVATS et al., 1990).

As moléculas HLA são divididas nas classes I e II. As moléculas de classe I são expressas na maioria dos tipos celulares e apresentam antígenos endógenos para células T citotóxicas. Em humanos, a classe I de HLA é subdividida na classe Ia, denominada clássica e constituída pelas moléculas HLA-A, B e C e pela classe Ib, descrita como não-clássica e representada pelas moléculas HLA-E, F e G (NOLAN, 2008).

Diferente das moléculas clássicas, a molécula HLA-G apresenta poucos polimorfismos em sua região codificadora, um perfil de expressão tecidual restrito em condições saudáveis e uma característica única de formar multímeros (VIANNA et al., 2007). Esta molécula pode exercer efeito imunossupressor a partir da interação com receptores de inibição diferencialmente expressos na superfície de células *natural killer* (NK), células T, linfócitos B e células apresentadoras de antígenos (APCs) (CAROSELLA et al., 2003). A não expressão do MHC de classe I pelas células trofoblásticas as torna alvos potenciais para a lise mediada por células NK. A interação da molécula HLA-G com receptores de inibição na superfície de células NK impede a lise de células do trofoblasto (PONTE et al., 1999) (Figura 1), ou ativa a produção de citocinas importantes na promoção do remodelamento da vascularização na região materno-fetal fundamental para um correto suprimento de oxigênio ao feto (LOKE; KING, 2000).

Figura 1. Interação entre as moléculas HLA-G, expressas pelas células placentárias, e receptores inibitórios das células *natural killer*. A figura também ilustra a inibição das moléculas MHC classe I e II pelas células fetais.

1.6 Genética do Diabetes *Mellitus* Gestacional

Alguns loci associados a DM2 (*KCNJ11*, *TCF7L2*, *CDKAL1*, *KCNQ1*, *CDKN2A/CDKN2B*, *HHEX / IDE*, *IGF2BP2*, *SLC30A8*, *TCF2*, *FTO*) já foram relacionados com o risco de desenvolver DMG, o que não é surpreendente, dado os precedentes comuns entre estes dois tipos de diabetes (LAUENBORG et al., 2009; SHAAT et al., 2005) (Figura 2). Porém, os achados relativos ao DMG são muitas vezes baseados em amostras pequenas em comparação a amostragem utilizada nos estudos para detectar novos marcadores de risco ao DM2 (WATANABE et al., 2007).

Figura 2. Distribuição dos alelos de risco para DM2 em pacientes com DMG e em controles com tolerância a glicose (LAUENBORG, 2009).

O efeito aditivo significativo de múltiplos alelos de risco ao DMG já foi relatado (LAUENBORG et al., 2009). Nesse estudo não foram identificados indivíduos com menos de cinco ou mais de 19 alelos de risco. Na maioria dos casos, semelhante aos outros tipos de diabetes, o risco genético para o DMG é estimado a partir de pequenas contribuições de diferentes genes em populações distintas, levando em consideração as prevalências dos alelos de risco na população (LAUENBORG et al., 2009). Embora, algumas mutações gênicas que causam a forma monogênica do diabetes também tenham sido encontradas em mulheres com DMG, é provável que nesta doença exista um fator de risco poligênico (BUCHANAN; XIANG, 2005; LAUENBORG et al., 2009).

O DMG mostra uma predisposição genética para o posterior desenvolvimento de DM1 e DM2, embora comumente evolua para o DM2, especialmente se outros fatores de risco, tais como a obesidade, estiverem presentes (MARTIN et al., 1985). No entanto, estudos mostram genes em comum envolvidos com o desenvolvimento de DM1 e DMG (RADAELLI et al., 2009; MCLELLAN *et al.*, 1995; DÖRNER; PLAGEMANN; REINAGEL, 1987).

Um estudo global de expressão gênica, a partir de amostras de placenta, relatou a indução de genes envolvidos com resposta imune em mulheres com DMG

(ENQUOBAHRIE; WILLIAMS; QIU; MELLER; et al., 2009). Outro trabalho revelou genes de inflamação induzidos em gestantes com DMG, fornecendo a base para elucidar a relação entre vias inflamatórias e DMG, associadas com resistência à insulina (RADAELLI et al., 2003). Vias e categorias imunes significativas relacionadas ao DMG foram identificadas a partir da análise de amostras de sangue total e de placenta em mulheres com DMG (ZHAO et al., 2011). Assim, estes achados sugerem que o DMG pode ter fatores genéticos predisponentes comuns com DM1.

Uma evidência importante consiste no fato de que uma forma autoimune do diabetes é estimada em aproximadamente 10% das mulheres com DMG (LAPOLLA; DALFRÀ; FEDELE, 2009). Estudos sugerem que alguns antígenos HLA são mais frequentes no DMG (RUBINSTEIN et al., 1981).

Outro ponto importante é a relação entre alguns fatores genéticos relacionados ao feto associados com variações nas concentrações de glicose materna durante a gravidez. Uma pesquisa relatou a presença de maiores concentrações de glicose materna em mulheres grávidas de gêmeos do que naquelas que esperam uma criança (SCHWARTZ et al., 1999).

Um trabalho de estratificação de gestações de acordo com o sexo da prole identificou um aumento da incidência de DMG em mulheres que geram meninos, possivelmente devido a maior dieta energética na gestação de crianças do sexo masculino (TAMIMI et al., 2003).

Em resumo, o estudo da genética do DMG é dificultado por alguns fatores, como por exemplo as causas heterogêneas da doença e os critérios para o diagnóstico desta condição (LAPOLLA; DALFRÀ; FEDELE, 2009). Sendo assim, é necessária uma pesquisa mais abrangente empregando amostras significativas de pacientes diagnosticadas com DMG. Além disso, é importante agregar estudos de associação genômica em larga escala (*GWAS*) e de expressão gênica transcricional utilizando *microarrays* e *RNA-Seq*. Com isso, será possível estabelecer associações entre genes e DMG com maior poder estatístico.

1.7 Análise de transcriptomas pela tecnologia de *microarrays*

Estudos de associação são informativos, porém de uma maneira geral relacionam uma determinada região cromossômica com a susceptibilidade à doença (associação genótipo-fenótipo) (ONENGUT-GUMUSCU; CONCANNON, 2005). É preciso entender como essas regiões genômicas participam na etiopatogenia das doenças, o primeiro passo é saber se tais regiões são transcritas em RNA mensageiro (mRNA) (MELANITOU, 2005). A análise de transcriptomas complementa estes estudos, uma vez que pode revelar alterações na regulação

de genes e processos biológicos envolvidos na doença (PLANAS; PUJOL-BORRELL; VIVES-PI, 2010).

O transcriptoma compreende o conjunto de RNAs expressos em uma célula ou tecido em uma dada situação, incluindo transcritos alternativos e não-codificantes, cujas alterações refletem as condições fisiológicas ou patológicas em que o organismo se encontra (RUAN et al., 2004).

Alguns trabalhos têm mostrado que certos loci de susceptibilidade a doenças autoimunes, como o lúpus eritematoso sistêmico (TREVISAN et al., 2006), a artrite reumatóide (SILVA et al., 2007) e o DM1 (RASSI et al., 2008) são na realidade regiões cromossômicas que transcrevem mRNA.

A tecnologia dos *microarrays* permite a obtenção de um *fingerprint* molecular da expressão gênica (GROUSE; MUNSON; NELSON, 2001). Genes que são expressos de forma coordenada durante uma resposta biológica, compõem as chamadas “assinaturas de expressão gênica”(HASELTON; LLOYD; JOHNSON, 2000).

Os *microarrays* representam uma alternativa prática na análise da expressão gênica. Baseiam-se na ligação por complementaridade de bases de RNAs fita simples aos fragmentos de DNA, RNA ou oligonucleotídeos depositados em uma lâmina, (BRAZMA; VILO, 2001). Esta técnica tem sido largamente aplicada em biologia e medicina na aquisição de novos conhecimentos básicos e também na área diagnóstica. Com os *microarrays* é possível medir a expressão de milhares de genes em um único experimento por isso, este método passou a ser a escolha na exploração do transcriptoma em diversas situações normais e patológicas. A figura 3 ilustra o princípio geral da técnica.

Os experimentos com *microarrays* geram uma lista de genes diferencialmente expressos. A análise minuciosa desta lista proporciona grande quantidade de informações relevantes. A grande vantagem desta técnica consiste na possibilidade de atribuir novas funções a genes já descritos.

Além das assinaturas de expressão, muito úteis para o agrupamento de amostras e/ou de pacientes, as análises dos dados de *microarrays* também têm sido focadas na reconstrução de redes transcricionais regulatórias, ou seja, as interações entre moléculas de mRNAs. Tais redes visam encontrar e entender a interação gene-gene a partir de dados de expressão transcricional (WANG et al., 2006).

Estudos de expressão gênica diferencial em diabetes têm abordado várias estratégias, incluindo a utilização de modelos experimentais, células pancreáticas em cultura, e ainda, células linfomononucleares humanas. Em ratos tornados diabéticos pela estreptozotocina,

foram evidenciados diversos genes modulados relacionados à morfogênese, matriz extracelular, adesão celular, ligação de cálcio, ciclo celular, entre outros (DHAHBI et al., 2003; VAN LUNTEREN; MOYER, 2007).

Wang et al (2008) demonstraram que soros de pacientes diabéticos possuem fatores que induzem assinatura pró-inflamatória única em PBMCs refletindo auto-imunidade ativa. De fato, pesquisas conduzidas com PBMCs, sangue total e placenta empregando a tecnologia de *microarrays*, têm demonstrado padrões distintos de expressão gênica entre mulheres saudáveis e com DMG (ZHAO et al., 2011; RADAELLI et al., 2003; RADAELLI et al., 2009; ENQUOBAHRIE; WILLIAMS; QIU; MUHIE; et al., 2009).

Tais exemplos indicam a possibilidade de atribuir funções a regiões do genoma previamente associadas com DMG empregando a tecnologia dos *microarrays* e análise de transcriptomas.

Figura 3. Estapas gerais de experimentos de *microarrays* para análise de transcriptomas. Figura baseada nos sites: (http://www.microarray.lu/en/MICROARRAY_Overview.shtml) e (<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Heatmap.png>).

Hipótese

2 HIPÓTESE

Considerando que alguns estudos de associação têm relacionado genes marcadores de inflamação com o desenvolvimento do Diabetes *Mellitus* Gestacional (DMG) e que pacientes com DMG apresentam alterações imunológicas evoluindo para um estado de inflamação crônica subclínica, esperamos encontrar um perfil transcricional diferencial nas pacientes com DMG envolvendo genes característicos de processos inflamatórios a partir da análise de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs).

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi descrever o perfil de expressão gênica transcricional (mRNA) de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de pacientes com Diabetes *Mellitus* Gestacional focando em genes envolvidos com o processo inflamatório.

3.2 Objetivos Específicos

- Utilizar a tecnologia de *oligo-microarrays* para avaliar o perfil de expressão gênica transcricional das PBMCs de pacientes com Diabetes *Mellitus* Gestacional em comparação com gestantes saudáveis, focando em genes relacionados à inflamação;
- Fazer uso de programas de bioinformática dedicados à análise dos dados de *microarrays*. Utilizando o ambiente R, visamos estabelecer os perfis de expressão gênica transcricional, a normalização dos dados e o teste estatístico; a partir dos programas *Cluster* e *TreeView* pretendemos realizar agrupamentos hierárquicos das pacientes, controles e mRNAs;
- Realizar análise funcional dos mRNAs diferencialmente expressos, confirmando ou não a hipótese do trabalho.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 População de estudo

No presente estudo foram selecionadas 18 pacientes com DMG, com idade entre 19 e 40 anos (média = 31,5) diagnosticadas e acompanhadas na Divisão de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), segundo os critérios da Associação Americana de Diabetes (ADA). Pacientes que exibiram histórico de diabetes antes da gestação, doença autoimune, hipertensão e síndrome metabólica foram excluídas do estudo. Como grupo controle, foram selecionadas 10 gestantes sem antecedentes de DMG, exibindo níveis normais de glicose e pareadas com as pacientes em termos de idade, número de gestações e idade gestacional (Tabelas 2 e 3), a coleta foi realizada no Hospital Santa Casa de Misericórdia de Ribeirão Preto, com autorização concedida pela diretoria clínica do hospital (Anexo A). A cópia do termo de consentimento livre-esclarecido foi obtida de todas as pacientes e controles (Anexo B), e o protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Local (Protocolo # 9153/2008) (Anexo C). Entre as grávidas não diabéticas que compõem o grupo controle, selecionamos aleatoriamente seis para avaliar o perfil transcricional do pool em duplicata. O presente trabalho é parte integrante do Projeto Temático FAPESP nº 08/56594-8 sob coordenação do Prof. Dr. Geraldo A. S. Passos Junior.

Tabela 2. Características clínicas dos controles utilizados neste trabalho.

Controle	Idade (anos)	Período gestacional (semanas)	Número de gestações	Glicemia (mg/dL)	HbA1c (%)
C_1 ^a	27	41	2	74	----
C_2 ^{a*}	37	36	1	67	----
C_3 ^a	21	38	1	72	----
C_4 ^a	35	32	4	79	----
C_5 ^a	26	37	3	82	----
C_6 ^a	23	38	1	65	----
C_7	20	39	1	82	----
C_8	26	37	1	81	----
C_9	19	38	1	78	----
C_10	26	36	2	60	----
C_11	19	36	2	66	----

^a Controles que compõem o pool; ^{a*} Controle não marcado individualmente, usado apenas no pool.

Tabela 3. Características clínicas das pacientes com DMG.

Paciente	Idade (anos)	Período gestacional (semanas)	Número de gestações	Glicemia (mg/dL)	HbA1c (%)
DMG_1	35	30	1	88	5,6
DMG_2 ^b	37	25	1	86	7,9
DMG_3	30	26	2	67	5,1
DMG_4	40	38	4	74	-----
DMG_5	35	27	1	94	8,8
DMG_6	29	34	1	65	5,7
DMG_7	24	29	1	74	5,4
DMG_8	23	34	2	86	5,4
DMG_9	33	35	2	80	5,0
DMG_10 ^b	29	37	2	89	5,8
DMG_11	37	37	4	80	-----
DMG_12	39	32	4	72	5,7
DMG_13 ^b	29	28	4	92	5,2
DMG_14	30	34	3	82	5,0
DMG_17	28	34	2	81	6,1
DMG_18	22	34	1	90	5,4
DMG_19	34	34	2	99	6,5
DMG_20	31	37	1	128	6,2

^b Pacientes que utilizam insulina.

4.2 Coleta de sangue e separação de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de pacientes e controles

Foram coletados aproximadamente 20 mL de sangue venoso periférico de cada paciente e de cada controle em tubos contendo EDTA (1,8 mg/mL) (Sigma, St. Louis, MO, USA). O processamento do sangue foi realizado logo após a coleta sendo utilizado o protocolo descrito por Böyum (1968). O isolamento das células mononucleares foi realizado por centrifugação em gradiente de densidade utilizando *Ficoll-Hypaque* (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA).

As etapas do processo de separação celular incluíram a adição do mesmo volume de salina estéril a cada amostra de sangue (1:1), com a deposição da solução resultante sobre o

Ficoll-Hypaque na proporção (2:1). As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 1042 x g – RCF (2300 rpm) à temperatura ambiente. Após a centrifugação, foi obtido um anel de células mononucleares, localizado na interface do *Ficoll-Hypaque* e do plasma sanguíneo. Estas células foram colhidas com auxílio de pipeta *Pasteur* e submetidas a duas lavagens com salina 0,9% estéril, sendo o *pellet* obtido ressuspensão em salina 0,9% tratado com dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, Brasil). Em seguida, as células separadas de pacientes e controles foram submetidas à extração de RNA total.

4.3 Extração de RNA total e avaliação da integridade

As amostras de RNA total obtidas de PBMCs foram extraídas usando o reagente Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Foi utilizado 1 mL do reagente para cada 5 mL de sangue. O RNA obtido foi suspenso em água tratada com DEPC (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) e armazenado em freezer a -80°C.

A partir da avaliação das absorbâncias e do cálculo das razões, usando espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000* (NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA), foram obtidas as quantificações e o grau de pureza das extrações. Foram utilizadas apenas amostras de RNA livres de contaminação protéica (A260/A280 entre 1,8 – 2,2) e de fenol (A260/A220 entre 1,8 – 2,0).

A integridade das preparações de RNA foi avaliada por eletroforese microfluida em nanochips, (*RNA 6000 Nano chip* no aparelho *Agilent 2100 Bioanalyzer*) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Este sistema calcula o índice (*RNA Integrity Number – RIN*) com escala de 0 a 10, baseado na qualidade da preparação de RNA. No presente trabalho foram somente utilizadas amostras que exibiram valor de integridade $\geq 8,0$ (Figura 4).

Figura 4. Densitometria da amostra de RNA de paciente com DMG isolada de PBMCs. RNA integrity number (RIN) = 9,0.

4.4 Reação de hibridação com oligo-microarrays

Para análise do transcriptoma das pacientes com DMG e controles foram utilizadas lâminas de *microarrays Whole Human Gene Expression Microarrays Kit (4x44 K)* com AMADID 014850 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Foi utilizada a metodologia monocolor Cy3 (cianina 3). Para a amplificação, marcação e hibridação dos mRNAs das amostras com os *microarrays* foi utilizado o *Kit Agilent Quick Amp Labeling* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), seguindo as recomendações do fabricante. As etapas do procedimento de *microarrays* foram realizadas no Laboratório de Imunogenética Molecular no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Brasil.

As etapas do processo estão esquematizadas na figura 5. As amostras de RNA controle (*spike-in*) foram misturadas a 500 ng de RNA total para transcrição reversa com utilização da

enzima *Moloney Murine Leukemia Virus – Reverse Transcriptase (MMLV-RT)*. Foram utilizados *primers* adaptados com timinas consecutivas acopladas a um promotor T7 para síntese de cDNAs dupla fita. Após essa reação, a enzima *T7 RNA Polimerase* foi adicionada com nucleotídeos marcados com o fluorocromo Cy3 para síntese de cRNAs e posterior amplificação.

Foi realizada a purificação das amostras de cRNAs, que em seguida foram submetidas à hibridação às lâminas de *microarrays*, utilizando-se câmaras de hibridação *Agilent Microarray Hybridization Chambers* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Posteriormente, as lâminas foram incubadas em forno rotativo (Agilent Technologies) a 65°C por 17 horas. Após a hibridação, as lâminas foram lavadas com os tampões *GE Wash Buffer 1* e *GE Wash Buffer 2* para em seguida ser feita a aquisição das imagens (*scanning*).

As imagens de hibridação foram obtidas a partir do *scanning* dos *microarrays* (*Scanner Agilent Bundle®*) por meio do *software Feature Extraction* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Figura 5. Representação das reações de transcrição reversa, amplificação, purificação e hibridação de *microarrays* da plataforma Agilent. Adaptado de (“G4140-90040_GeneExpression_One-color_v6.5.pdf (objeto application/pdf)”.

4.5 Análise dos dados de *microarrays*

A correção e a normalização dos dados foram realizadas utilizando ambiente R. A linguagem de programação R (“*The R Project for Statistical Computing*”) consiste de ambiente estatístico-matemático com inúmeros pacotes de funções múltiplas, amplamente utilizados em análises de dados de *microarrays* (endereço: <http://www.r-project.org/>).

4.5.1 Quantificação e normalização dos dados

A quantificação dos dados e o controle de qualidade foram obtidos por meio do *software Feature Extraction*. A tabela de dados quantificados foi utilizada para seleção das colunas correspondentes as sondas, a mediana dos dados brutos (*gMedianSignal*) e a mediana do *background* (*gBGMedianSignal*). Foram gerados arquivos com extensão “.new” para todas as amostras e controles. Esta etapa foi realizada utilizando o sistema operacional *Linux*.

Em seguida, esses arquivos foram introduzidos em ambiente R versão 2.13.1 para ajuste do *background* a partir da subtração (*gMedianSignal* - *gBGMedianSignal*). Foi realizada a conversão dos valores para escala logarítmica ($\log_2$) para posteriormente ser gerado um único arquivo com todas as amostras e controles apresentando valor de *background* corrigido. Após esta etapa foi calculada mediana dos dados, a fim de eliminar problemas de múltiplas sondas para o mesmo transcrito, mantendo-se apenas um valor de expressão para cada mRNA. Estes procedimentos compreendem a etapa de pré-processamento dos dados.

Os dados gerados no pré-processamento foram submetidos à normalização por *quantile* utilizando o pacote *aroma.light*. Tal método é considerado o mais robusto, corrigindo as diferenças nas densidades de probabilidade de todas as amostras (BOLSTAD et al., 2003). Para a verificação dos dados após a normalização foram criados gráficos em formato *boxplots*.

Além disso, para permitir a comparação direta da expressão gênica transcricional entre grupos biológicos de experimentos independentes, foi utilizada a ferramenta COMBAT (JOHNSON; LI; RABINOVIC, 2007). Este método é baseado em uma correção bayesiana paramétrica, sendo utilizado para retirar o efeito de lote das amostras.

4.5.2 Análise estatística

Para detecção dos mRNAs diferencialmente expressos foi utilizada a análise estatística *Rank Products* (RP), o significado da detecção é avaliado por um teste de permutação não-paramétrico, associado ao *P-value* e a taxa de falsa descoberta (*False Discovery Rates* - FDR) (HONG et al., 2006).

O RP proporciona uma maneira simples, mas estatisticamente rigorosa para determinar o nível de significância para cada transcrito, baseando-se em listas classificadas de acordo com os valores de *fold change*. Atualmente este teste é considerado um dos mais robustos para análise estatística de dados de *microarrays*. Além disso, a abordagem do RP é poderosa na identificação de alterações de expressão biologicamente relevantes (BREITLING et al., 2004). Essas evidências indicam que mesmo mRNAs com níveis de expressão relativamente baixos são considerados na análise, devido sua relevância biológica no estudo.

Neste trabalho, foram considerados mRNAs com valor de $P < 0.01$, sendo o teste aplicado de forma pareada, ou seja, DMG *versus* controle. Os transcritos significativos e diferencialmente expressos obtidos por RP foram submetidos ao agrupamento hierárquico de *Pearson* utilizando o *software Cluster 3.0* ([http://rana.lbl.gov/EisenSoftware .htm](http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm)) (EISEN et al., 1998). O arquivo gerado em extensão “.cdt”, foi usado como arquivo de entrada no programa *TreeView* ([http://rana.lbl.gov/EisenSoftware .htm](http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm)) (EISEN et al., 1998) que constrói dendrogramas com as representações espaciais dos genes.

4.5.3 Análise funcional

A lista dos mRNAs diferencialmente expressos obtida por RP foi submetida à análise de enriquecimento funcional a partir da ferramenta de anotação DAVID (*Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery*) versão 6.7., que integra dados de diversos bancos e está disponível no endereço: <http://david.abcc.ncifcrf.gov>.

Neste trabalho esta ferramenta foi utilizada para identificação dos principais processos biológicos e vias relacionadas à lista dos transcritos significativos resultantes da análise por RP, sendo consideradas apenas categorias com valor de $P < 0.05$ e correção de *Benjamini-Hochberg*.

4.6 Confirmação dos dados de *microarrays* por PCR em tempo real

A PCR em tempo real foi realizada a partir da metodologia *SYBR Green*, de acordo com as instruções do fabricante (Applied Biosystems) utilizando-se o aparelho *StepOne Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, USA).

A primeira etapa do processo consiste na avaliação da especificidade dos produtos de PCR a partir da análise de uma curva de dissociação do cDNA. É então realizada a quantificação absoluta de cada par de *primer*, incluindo um par que representa um gene constitutivo, neste trabalho utilizamos *HPRT1*. São feitas diluições seriadas 1:10 a 1:10000 de cDNA para calcular a eficiência da reação e, consequentemente, a qualidade dos *primers*. A reação consiste de amplificação seguida de dissociação.

Na segunda etapa foi realizada a quantificação relativa para avaliar a expressão dos transcritos estudados em cada uma das amostras e compara-las entre si. A reação final consiste em 20 µl, contendo 0,8 µl de cada *primer*, 1X solução *SYBR Green* e 1 µl de cDNA sintetizado a partir de uma quantidade padronizada de RNA total (2 µg de RNA). Cada *primer* foi desenhado a partir do *software Primer3* (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi).

4.7 Análise estatística dos dados de PCR em tempo real

A análise estatística dos dados de PCR foi realizada em ambiente R, utilizando o teste *t* não pareado (*unpaired t test*), os gráficos foram construídos por meio do *software GraphPad Prism* 4.00 (<http://www.graphpad.com/prism/Prism.htm>).

Figura 6. Delineamento experimental.

Figura 7. Pipeline para as análises de bioinformática dos dados de *microarrays*

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Análise dos Dados de *Microarrays*

Após a obtenção dos dados de *microarrays* a partir do *Software Feature Extraction*, foi realizada a análise em ambiente R.

Para tornar as lâminas comparáveis e reduzir artefatos experimentais, foi realizada a normalização e a correção dos dados, com objetivo de obter valores de intensidade entre as lâminas em uma mesma escala. Na escolha do método de normalização, é fundamental que seja realizado um balanço dos níveis de intensidade ao longo dos experimentos, mantendo-se os efeitos biológicos investigados (DO; CHOI, 2006). A normalização foi realizada entre todos os pacientes e controles a partir do método *quantile* utilizando o pacote *aroma.light*, no qual os valores de expressão, em cada lâmina, são ordenados segundo a intensidade (*ranked*).

Os valores são substituídos pela média de intensidade obtida para determinada posição no *ranking*, obtendo-se um conjunto único de dados para todas as lâminas (BOLSTAD et al., 2003). Para essa normalização, é mais relevante a posição do gene no *ranking* do que a sua intensidade bruta. A figura 8 representa o gráfico *boxplot* que mostra as posições e comprimentos similares dos *microarrays* de todas as lâminas para todas as pacientes e controles avaliados.

Uma primeira análise foi realizada por agrupamento hierárquico onde foi evidenciada uma similaridade de acordo com o lote de hibridação em que cada amostra foi processada, e não com as variações biológicas. Reduzir o efeito “por lote de hibridação” foi um dos maiores desafios deste trabalho. Estes efeitos podem ser ocasionados por fatores diversos, incluindo os lotes de *kits* de amplificação utilizados, lotes das lâminas de marcação, hora que o experimento é realizado ou quando novas amostras são adicionadas a um conjunto de dados pré-existente, como aconteceu neste estudo.

Para correção deste efeito, um método que utiliza bayes empírico para ajustar as amostras foi aplicado. Este método foi proposto especificamente para conjuntos de dados compostos por diversos lotes, com pequeno número de amostras em cada lote, como é o caso do nosso trabalho. Após o processamento dos dados pelo *script* ComBat.R (JOHNSON; LI; RABINOVIC, 2007) disponível <http://statistics.byu.edu/johnson/ComBat/>, o efeito de lote foi eliminado.

Sendo removido o "efeito de lote" dos dados, foi possível observar o agrupamento das amostras de acordo com semelhanças biológicas. O *heatmap* final desta análise, proporcionando uma visão global dos dados, é ilustrado na figura 9.

Após a análise estatística por *Rank Products*, foram apontados 731 mRNAs considerados informativos (Anexo D). No agrupamento hierárquico, a partir da correlação de *Pearson*, esses mRNAs apresentaram-se bons marcadores na separação entre pacientes com DMG e controles saudáveis, uma vez que houve a formação de dois grupos distintos.

Figura 8. Gráficos *boxplot* dos dados de *microarrays* utilizados neste trabalho após normalização a partir da metodologia *quantile*.

Figura 9. Agrupamento hierárquico a partir da correlação de *Pearson*. Em destaque a separação entre os grupos de pacientes e controles.

5.2 Análise funcional a partir da plataforma DAVID

Com a finalidade de encontrar categorias correspondentes aos mRNAs diferencialmente expressos, a lista dos 731 mRNAs modulados no DMG, foi submetida à análise no banco de dados DAVID, utilizando o *Gene Ontology* (GO) para identificação dos principais processos biológicos, e o banco de dados *KEGG* (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* - <http://www.genome.jp/kegg/>) para a busca das vias biológicas relacionadas a estes transcritos.

A figura 10 ilustra um total de 130 processos biológicos envolvidos com DMG. Em ordem decrescente de significância, os principais processos incluem: i) resposta de defesa (53 genes); ii) resposta a bactéria (25 genes); iii) resposta imune (51 genes). Os demais processos relevantes nesta análise foram: iv) resposta inflamatória (27 genes), v) regulação de citocinas (10 genes), vi) desenvolvimento de vasos sanguíneos (21 genes), vii) apoptose (47 genes), viii) regulação da proliferação celular (48 genes), entre outros (Anexo E).

De acordo com a análise funcional de vias de sinalização, um total de 9 vias biológicas foram identificadas (Figura 11). A via de interação entre receptores de citocinas (26 genes) foi a mais significativa, seguida da via de asma (7 genes) e câncer (25 genes). Outras vias incluindo a de lúpus eritematoso sistêmico (11 genes) e a via de sinalização de receptores *NOD-like* (8 genes) também foram identificadas nesta análise (Anexo F).

As tabelas 4 e 5 apontam os genes e a identificação no *Gene Ontology* para cada processo biológico, bem como os respectivos valores de *P-value* para cada uma das categorias de maior relevância para este trabalho. A combinação dos resultados obtidos utilizando o *GO* e o *KEGG* nos proporcionou o levantamento de um conjunto de genes cujas funções são relacionadas ao sistema imune e/ou reações inflamatórias fundamentais na patogênese do DMG. Além disso, os mRNAs discutidos neste estudo são transcritos por genes comuns a maior parte dos processos e vias, e de alguma maneira estão relacionados à inflamação, incluindo *TNF*, *CXCL2*, *VEGF*, *PTX3*, *IL1 β* , *NLRP3*, *IL8*, *NFKBIA*.

Figura 10. Heatmap ilustrativo das categorias identificadas a partir da ferramenta de análise funcional DAVID. Em destaque os processos mais significativos. A escala em cinza representa o valor de P em módulo logarítmico.

Figura 11. Principais vias de sinalização identificadas a partir da análise funcional usando DAVID. A escala em cinza representa o valor de P em módulo logarítmico.

Tabela 4. Processos biológicos de maior relevância para este estudo. Em destaque os genes que fazem parte de cada processo, o valor do *P-value* e o código do *Gene Ontology*.

GO	Processos biológicos	Genes	<i>P-value</i>
0006952	Resposta de defesa	<i>PGLYRP1, FOS, CCL3L3, HIST1H2BJ, IL1-B, LTF, CIITA, NFKBIZ, CRISP3, NCF2, CAMP, CD160, NLRP3, CD84, INHBA, SIGLEC1, CD83, PROK2, BPI, PPBP, LILRB5, DEFA4, DEFA3, CTSG, LALBA, CXCL1, TNF, CXCL3, C6, CLU, CXCL2, RSAD2, GPR68, DEFB127, CCL4, IL23A, CCL20, TFF3, PTX3, SCG2, PTPRC, IL5, CEBPB, RNASE3, IL8, OLR1, GABRA5, IL9, CYP4F11, COTL1, CD19, MPO, SELE</i>	1.52E-07
0006955	Resposta imunológica	<i>PGLYRP1, SKAP1, CCL3L3, CEACAM8, IL1-B, ERAP1, LTF, CIITA, CRISP3, ICAM1, POU2AF1, NCF2, TNFRSF17, NLRP3, HLA-DQA2, OSM, CD83, BPI, LILRB5, PPBP, CTSG, CXCL1, HLA-DQB1, CPLX2, TNF, CXCL5, CXCL3, C6, CLU, CXCL2, RSAD2, DEFB127, PF4V1, CCL4, CHIT1, IL23A, CCL20, CD4, PTX3, HLA-DOA, PTPRC, IL5, CEBPB, IL8, OLR1, IGJ, IL9, GPI, ILF2, ETS1, CD300A</i>	2.20E-05
0006954	Resposta inflamatória	<i>CXCL1, TNF, CXCL3, C6, CLU, CXCL2, GPR68, CCL4, FOS, IL23A, CCL20, CCL3L3, IL1-B, PTX3, SCG2, CIITA, NFKBIZ, IL5, CEBPB, IL8, OLR1, IL9, CYP4F11, NLRP3, SIGLEC1, PROK2, SELE</i>	5.02E-04
0001817	Regulação da produção de citocinas	<i>CEBPB, TNF, IL6ST, IL9, ELANE, NLRP3, IL21, CD83, INHBA, BPI, REL, EREG, IL1-B, RARA, CD4, AGPAT1</i>	0.005334
0001568	Desenvolvimento de vasos sanguíneos	<i>TBX3, IL8, CDX4, PDGFA, FGF10, NCL, TCF7L2, JUNB, ZFP36L1, PROK2, GPI, EREG, ID1, BAX, PLXDC1, TDGF1, CASP8, ERAP1, IL1-B, CEACAM1, SCG2</i>	0.0016817932
0042981	Regulação da Apoptose	<i>LALBA, DPF2, IER3, TNF, PTGS2, MMP9, C6, CLU, PPP3R1, NFKBIA, SOX4, TP63, HSPA1A, TCF7L2, PRUNE2, BLOC1S2, TDGF1, CASP8, IL1-B, NGFRAP1, MYC, SCG2, ARHGEF4, PTPRC, CEBPB, TBX3, GFRAL, SOCS3, BCL2A1, PIM1, PIM3, PDE3A, NLRP3, PPIF, INHBA, PROK2, GCM2, CDKN1B, SSTR3, BTG2, DUSP1, ETS1, BBC3, BAX, MPO, ALOX12, TP53INP1</i>	0.0069653625
0008284	Proliferação celular	<i>TNF, CXCL5, PTGS2, IL6ST, PDGFA, CLU, NAP1L1, FGF10, SOX4, TP63, OSR2, BLOC1S2, TDGF1, IL1-B, MYC, TCF3, THPO, SCG2, AGPAT1, PTPRC, IL5, TBX3, ELANE, IL9, IL21, CAPN1, OSM, VEGFB, CDKN1B, ATF3, EREG, ADM, MAB21L2, ALOX12</i>	9.8E-5

Tabela 5. Vias biológicas de maior relevância para este estudo. Em destaque a categoria e os genes de cada via e o valor do *P-value*.

Categoria	Vias biológicas		Genes	<i>P-value</i>
KEGG	Interação	entre receptores de citocinas	<i>CXCL1, TNF, CXCL5, PDGFA, IL6ST, CXCL3, CXCL2, CXCR3, PF4V1, CCL4, IL23A, CCL20, CCL3L3, IL1-B, AMHR2, IL5, IL8, IL9, TNFRSF17, IL21, VEGFB, GH2, OSM, INHBA, PPBP, IL3RA</i>	4.50E-05
KEGG	Lúpus	eritematoso sistêmico	<i>HLA-DQB1, TNF, C6, HIST1H2AD, HIST1H2AE, HIST1H2BJ, ELANE, HIST1H4E, HLA-DOA, HLA-DQA2, CTSG</i>	0.006392
KEGG	Via de sinalização	do receptor <i>NOD-like</i>	<i>CXCL1, TNF, IL8, CXCL2, CASP8, NFKBIA, IL1-B, NLRP3</i>	0.011997
KEGG	Via de câncer		<i>PTGS2, PDGFA, MMP9, FGF10, NFKBIA, TCF7L2, MMP1, FOS, CDKN2B, CASP8, RARA, MYC, WNT8B, CTBP1, IL8, LEF1, RALGDS, WNT2B, VEGFB, JUP, CDKN1B, EP300, LAMA3, ETS1, BAX</i>	0.0031421885
KEGG	Via de asma		<i>HLA-DQB1, IL5, TNF, RNASE3, IL9, HLA-DOA, HLA-DQA2</i>	8.9E-4

5.3 Perfil de expressão de transcritos envolvidos com metabolismo e componentes do MHC no DMG

Entre os mRNAs diferencialmente expressos envolvidos com metabolismo do diabetes, destacamos de acordo com a análise estatística: *IGFBP2* desempenhando papel importante na patogênese da obesidade, sendo associado à resistência insulínica, *TCF3* como componente da via de sinalização *Wnt*, estando relacionado à patogênese do DM2, *OLR1* participando de etapas chave do metabolismo de ácidos graxos e o *TCF7L2* envolvido na regulação da homeostase da glicose sanguínea, também participando da via *Wnt*. A figura 12 ilustra a expressão destes mRNAs nas pacientes em relação aos controles, chamando atenção para modulação positiva dos transcritos *IGFBP2* e *TCF3* e negativa para *OLR1* e *TCF7L2*, além disso, são mostrados os valores de *fold change* (FC) resultantes da análise estatística *Rank Products*.

Neste estudo também encontramos mRNAs que fazem parte do complexo principal de histocompatibilidade induzidos nas pacientes com DMG. Entre eles: *HLA-DRB6* (*major histocompatibility complex, class II, DR beta 6 - pseudogene*), *HLA-DQA2* (*major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 2*), *HLA-DQB2* (*major histocompatibility complex, class II, DQ beta 2*), *HLA-DQB1* (*major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1*), *HLA-DOA* (*major histocompatibility complex, class II, DO alpha*). A figura 13 mostra o perfil de expressão destes mRNAs nas pacientes em relação aos controles, e os valores de *fold change* obtidos a partir da análise estatística.

Figura 12. Representação do perfil de expressão dos mRNAs envolvidos com metabolismo entre pacientes com DMG e controles saudáveis. A figura ilustra os valores de *fold change* (FC) para cada transcrito e destaca a modulação positiva para *IGFBP2* e *TCF3* e negativa para *OLR1* e *TCF7L2*.

Figura 13. Representação do perfil de expressão dos transcritos dos genes MHC entre pacientes com DMG e controles saudáveis e seus respectivos valores de *fold change* (FC).

5.4 Confirmação da expressão de genes relacionados ao processo inflamatório por PCR em tempo real

Foram utilizadas as mesmas amostras da análise por *microarrays* para a confirmação da expressão dos genes *CXCL2*, *NFKBIA*, *TNF* e *IL1 β* . Estes genes estão associados à resposta inflamatória e seus transcritos apresentaram-se induzidos nas pacientes com DMG de acordo com a análise estatística *Rank Products* realizada neste trabalho. Foram feitas duplicatas experimentais de cada amostra. O gene *HPRT1* foi utilizado como constitutivo para a normalização dos dados.

Os *primers* foram padronizados através da construção da curva padrão, para o cálculo de eficiência dos mesmos, e de uma curva de dissociação, para avaliar a ocorrência da amplificação de apenas um tipo de fragmento. Essas análises confirmaram a eficiência dos *primers* (99%), e a ausência de fragmentos inespecíficos. A tabela 6 mostra as sequências dos *primers* dos genes selecionados para validação.

Tabela 6. Oligonucleotídeos *primers* dos genes humanos utilizados nas reações de PCR.

Gene	Primers
<i>CXCL2</i>	<i>Forward</i> 5' CAACTCAAGAATGGGCAGA 3'
	<i>Reverse</i> 5' AGCTTCCTCCTTCCTTCTGG 3'
<i>TNF</i>	<i>Forward</i> 5' AGCCCATGTTGTAGCAAACC 3'
	<i>Reverse</i> 5' TGAGGTACAGGCCCTCTGAT 3'
<i>NFKBIA</i>	<i>Forward</i> 5' AGACCTGGCCTTCCTCAACT 3'
	<i>Reverse</i> 5' GTCTCGGAGCTCAGGATCAC 3'
<i>IL1β</i>	<i>Forward</i> 5' CCACAGACCTTCAGGAGAA 3'
	<i>Reverse</i> 5' GTGATCGTACAGGTGCATCG 3'
<i>HPRT1</i>	<i>Forward</i> 5' GACCAGTCAACAGGGGACAT 3'
	<i>Reverse</i> 5' CTGCATTGTTTGCCAGTGT 3'

Os gráficos foram construídos de acordo com os valores de RQ (*Relative Quantification*), e os cálculos foram realizados utilizando como calibrador o menor dos valores de ΔC_t . Em vista de o calibrador ser o menor valor de expressão, o perfil de repressão encontra-se próximo ao valor de RQ 0.00, enquanto o perfil de indução com valor próximo de

1.5. Os genes *CXCL2* e *NFKBIA* apresentaram indução significativa nas pacientes com DMG em relação aos controles, aproximando-se dos perfis de expressão gênica gerados pela técnica de *microarrays* (Figura 14).

Figura 14. Gráficos com os valores de expressão gênica relativa (RQ) dos genes *CXCL2* (A), *NFKBIA* (B) (Análise estatística teste t; $P < 0.05$).

Os genes *IL1B* e *TNF* não apresentaram diferença estatística na comparação entre pacientes com DMG e controles (Figura 15).

Figura 15. Gráficos com os valores de expressão gênica relativa (RQ) dos genes *IL1B* (C), *TNF* (D) (Análise estatística teste t; $P > 0.05$).

De acordo com o padrão de expressão observado por PCR em tempo real, constatamos semelhanças no perfil gerado pela técnica de *microarrays*. Devido à reprodução deste padrão para *CXCL2* e *NFKBIA* com valores estatisticamente significativos, a expressão destes foi considerada confirmada.

Discussão

6 DISCUSSÃO

Entre os principais tipos de diabetes, o DMG é o menos compreendido. A maior parte do conhecimento da manifestação desta doença vem de comparações com outros tipos de diabetes (LAUENBORG et al., 2009). Alguns estudos de transcriptoma têm comparado tecido placentário de grávidas acometidas por DM1 e DMG (RADAELLI et al., 2009), cuja maioria dos genes diferenciais também foram identificados em assinaturas de sangue total (ZHAO et al., 2011).

O presente trabalho refere-se ao estudo comparativo do perfil de expressão gênica transcricional em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de mulheres com DMG em relação a gestantes saudáveis, focando em mRNAs relacionados à resposta inflamatória. O objetivo deste tipo de comparação consiste na caracterização dos perfis de expressão transcricionais das PBMCs no DMG. Estas células foram especialmente escolhidas como candidatas com base em estudos anteriores (ZHAO et al., 2011; KAIZER et al., 2007). Além disso, já foi relatado que as PBMCs expressam grande proporção dos mRNAs humanos, possibilitando o estudo de alterações clinicamente relevantes na expressão transcricional de maneira reprodutível (REYNIER et al., 2010; LIEW et al., 2006).

A análise aplicada neste estudo mostrou mRNAs envolvidos em processos biológicos significantes, incluindo resposta inflamatória, imunológica e de defesa. O perfil de expressão das PBMCs no DMG em relação aos controles revelou que mRNAs que regulam respostas inflamatórias representam o principal grupo funcional alterado no DMG. Além disso, transcritos relacionados ao metabolismo e componentes do MHC também estiveram diferencialmente expressos nas pacientes com DMG.

A relevância destas descobertas está de acordo com as evidências de que níveis plasmáticos de vários marcadores de inflamação parecem desempenhar papel importante na tolerância à glicose e na desregulação da sensibilidade à insulina em mulheres com DMG (VRACHNIS et al., 2012), sugerindo que a resistência à insulina é resultado de um meio inflamatório (RAMSAY et al., 2002). Por outro lado, também é sugerido que a via inflamatória não apresenta influência impactante no fenótipo metabólico materno durante a gravidez, embora variações em membros individuais dessa via alterem o metabolismo gestacional (URBANEK et al., 2012). Com relação aos genes do MHC, estudos relatam que alguns antígenos HLA são mais frequentes em mulheres com DMG em comparação a mulheres com gravidez normal (RUBINSTEIN et al., 1981).

Mecanismos imunológicos efetores maternos ativados durante a gestação são de extrema importância para tolerância ao feto e para o desenvolvimento de uma gestação de sucesso. A ação do *TNF* (*tumor necrosis factor*) é inicialmente necessária para a implantação embrionária no útero através da produção de *VEGF* (*vascular endothelial growth factor*), o qual modula a permeabilidade placentária e a angiogênese, essencial para nidação e placentação eficiente (CHUNG et al., 2000). Kirwan et al (2002) demonstraram o *TNF* como importante indicador da resistência à insulina em mulheres grávidas, fornecendo evidências na inclusão deste gene em um novo paradigma para explicar esta resistência durante a gravidez. Vários autores têm descrito o *TNF* como o fator mais importante na contribuição para a resistência à insulina no diabetes e na obesidade (UYSAL; WIESBROCK; HOTAMISLIGIL, 1998). Essas evidências corroboram nossos resultados. Em nossa análise, o *TNF* esteve entre os transcritos mais induzidos nas pacientes com DMG, sendo sugerido como um dos fatores principais no desencadeamento da resistência insulínica para esta condição.

Algumas quimiocinas inflamatórias podem agir em conjunto com o *TNF* potencializando sua ação (RADAELLI et al., 2003). Mudanças imunológicas, incluindo níveis alterados de quimiocinas e citocinas específicas sugerem que a inflamação participa da patogênese do DM2 (DONATH; SHOELSON, 2011). Em nosso estudo, descrevemos um conjunto de transcritos que codificam quimiocinas pró-inflamatórias induzidos, incluindo *CXCL2*, *CXCL1*, *CXCL3*, *CCL3L3*, *CCL4*, destacando *CXCL2* como o mRNA de maior expressão nas pacientes em relação aos controles. Reforçando a hipótese de que a inflamação também pode influenciar no desenvolvimento do DMG como foi descrito para o DM2. Além disso, encontramos a via de interação entre receptores de citocinas como a mais significativa em nossas análises (FDR = 0.053657; Correção de Bonferroni = 0.006682096). Esta via apresenta citocinas de diversas famílias, que são associadas à inflamação e anormalidades metabólicas, por induzir o aumento da resistência insulínica (HAUGUEL-DE MOUZON; GUERRE-MILLO, 2006). Zhao et al (2011) também relataram a via de interação entre receptores de citocinas como a mais significativa, em amostras de placentas de pacientes com DMG, estando de acordo com nossos achados.

Ainda no contexto da inflamação, é válido enfatizar a importância da proliferação vascular. Foi demonstrado que o desenvolvimento dos vasos sanguíneos pode ser afetado por alterações na expressão do gene *VEGF* (THANGARAJAH et al., 2010). Radaelli et al (2003) relataram a expressão diferencial do *VEGF* no DMG reforçando nossos resultados. Em nosso estudo, o *VEGF* esteve induzido, provavelmente por estar envolvido com a angiogênese, que é fundamental para ocorrência da implantação fetal eficiente. Patrelli et al (2012) mostraram

que o *VEGF* pode desempenhar papel importante no diagnóstico e prognóstico da gravidez. Além disso, um estudo apontou associação entre uma variante polimórfica do *VEGF* e o desenvolvimento de retinopatia diabética proliferativa em pacientes com DM2 (FEGHHI et al., 2011). Assim, alterações na expressão transcricional deste gene podem estar associadas a futuras complicações nas pacientes com DMG.

Adicionalmente, o *PTX3* (*pentraxin 3*), componente fundamental da função vascular comprometida (ALTMAYER et al., 1995), esteve induzido em amostras de placenta em pacientes com DMG (RADAELLI et al., 2003; ZHAO et al., 2011), fazendo parte de um *cluster* relacionado com resposta inflamatória (ENQUOBAHRIE; WILLIAMS; QIU; MELLER; et al., 2009). A expressão significativamente modificada do *PTX3* relatada nesse estudo é semelhante aos nossos achados. Essas evidências apoiam a idéia de que a indução de transcritos envolvidos na proliferação vascular representa fator relevante durante a gravidez.

Recentemente a relação entre vias inflamatórias e metabólicas tem sido descrita, indicando que a sinalização a partir de receptores imunes inatos, como os *NOD-like receptors* (*NLRP3*), regula o metabolismo (TANNAHILL; O'NEILL, 2011). Em nosso estudo, encontramos transcritos associados a ambas as vias participando da patogenia do DMG. Neste contexto, o receptor *NLRP3* medeia a produção de *IL1-β*, desencadeando a resistência insulínica (TANNAHILL; O'NEILL, 2011). Nas categorias funcionais identificadas no nosso trabalho o gene *NLRP3*, pertencente à via de sinalização *NOD-like*, teve seu transcrito induzido nas pacientes com DMG. Também fazem parte dessa via os genes *CXCL1*, *CXCL2*, *TNF*, *IL1-β*, *IL8*, *NFKBIA*, *CASP8*, que apresentaram seus mRNAs significativamente *up-regulados* na nossa análise. A indução desses mRNAs indica a influência da inflamação na desregulação metabólica. Embora, tenha sido relatado que o diabetes cria um ambiente pró-inflamatório que altera potencialmente o resultado da gestação (PERTYŃSKA-MARCZEWSKA et al., 2010), de fato, não se sabe ao certo se é a resistência à insulina que leva a perturbações da via inflamatória ou vice-versa. Um estudo recente apoia a hipótese de que são as alterações dentro da via inflamatória as responsáveis pelas mudanças nos fenótipos metabólicos durante a gravidez (URBANEK et al., 2012) sendo necessárias maiores investigações.

A interleucina-1 β é descrita como fator pró-inflamatório preditor do DM2 (DONATH; SHOELSON, 2011). Um estudo de expressão gênica em diabetes relatou a indução diferencial de *IL1-β* em DM1 e DM2, sugerindo que ambas as doenças partilham uma via final comum na disfunção das células β , que inclui a secreção de *IL-1 β* e prostaglandinas a partir de células imunes efetoras, exacerbando a disfunção das células β e causando

hiperglicemia (KAIZER et al., 2007). No nosso estudo, o mRNA do gene *IL1-β* (*interleukin 1, beta*) esteve induzido nas pacientes com DMG, podendo influenciar na hiperglicemia, como descrito para os outros tipos de diabetes (KAIZER et al., 2007). Em uma pesquisa realizada a partir de amostras de sangue e placenta, Zhao et al (2011) apontaram o gene *IL1-β* diferencialmente expresso em mulheres com DMG, corroborando nossos resultados.

Além disso, foi relatado que a interleucina 1β induz a ligação de fatores de transcrição ao promotor do gene *IL-8* (*interleukin 8*) (KHANJANI et al., 2012). Esses ativadores inflamatórios são sugeridos como estratégia na prevenção do parto prematuro (KHANJANI et al., 2012). Os genes *NF-kappaB* (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*) e *CEBP* (*CCAAT/enhancer binding protein (CEBP), beta*) codificam importantes fatores de transcrição, e a expressão destes genes é aumentada em resposta à interleucina 1β . *NF-kappaB* e *CEBP* são expressos no miométrio, e estão envolvidos em funções imunes, inflamatórias e no crescimento e diferenciação celular. Soloff et al (2004) também relataram que a interleucina 1β aumenta a ligação de *NFκBp65* e *CEBPβ* ao promotor de *IL8* em células do miométrio, estando envolvida em um mecanismo importante de prevenção de nascimentos prematuros.

O gene *IL-8* faz parte do *cluster* das quimiocinas da família *CXC*, sendo seu transcrito um dos mais expressos na nossa análise. Uma pesquisa realizada com pacientes grávidas com DM1 concluiu que a produção de citocinas, entre elas a interleucina 8, codificada por esse gene, contribui para complicações durante a gravidez, alterando o progresso gestacional normal (PERTYŃSKA-MARCZEWSKA et al., 2010). A interleucina 8 é produzida no âmnio, foi constatado que seus níveis estão aumentados no início do trabalho de parto, sendo sua produção significativamente maior na presença de *TNF* (KAWANO et al., 2012), transcrito que também esteve superexpresso em nossos resultados. Um estudo baseado em 31 genes que codificam membros de vias inflamatórias identificou vários destes, incluindo *IL-8*, associados a fenótipos metabólicos alterados na gravidez (URBANEK et al., 2012). Esses achados justificam a alta expressão de *IL-8* nas nossas pacientes, alertando para sua influência em complicações gestacionais, destacando o DMG.

Entre os genes que pertencem à família do fator de transcrição *NF-kappaB*, é descrito o gene *NFKBIA* (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*), cuja ativação inapropriada está associada a doenças inflamatórias. Um trabalho avaliou associação do alelo A do gene *NFKBIA* em homozigose para DM2 e lúpus, confirmando sua relação apenas na patogênese do DM2. Além disso, esse trabalho descreveu ligação específica entre *NF-kappaB* e DM2, baseada em resultados negativos para lúpus

(ROMZOVA et al., 2006). Em contrapartida, nossas análises mostraram indução do transcrito *NFKB1A* e da via de lúpus nas pacientes com DMG. Provavelmente a indução da via de lúpus em nosso trabalho pode ser explicada pelo fato do lúpus constituir uma doença inflamatória, semelhante ao que vem sendo relatado para o DMG (REEDQUIST; TAK, 2012; LAPOLLA; DALFRÀ; FEDELE, 2009; RADAELLI et al., 2009).

Além disso, outro estudo relacionando variações polimórficas de genes da família *NF-kappaB* ao diabetes autoimune encontrou associação significativa do alelo G do gene *NFKB1A* em homozigose no *LADA* (*Latent Autoimmune Diabetes in Adults*) (KATARINA et al., 2007). Embora o transcrito deste gene tenha se apresentado superexpresso nas nossas amostras de gestantes com DMG, até o momento, não foi descrita sua associação direta com esta condição. Entretanto, já foi relatada, em aproximadamente 10% de todos os tipos de DMG, ocorrência de DMG autoimune, com alta probabilidade de evolução para DM1 ou LADA (LAPOLLA; DALFRÀ; FEDELE, 2009).

Até o momento, não existem indícios da associação de muitos dos marcadores do DM1 no desenvolvimento do DMG. Recentemente, uma pesquisa com objetivo de encontrar marcadores adicionais para DM1 no MHC identificou associação significativa de uma variante próxima ao gene *HLA-DOA*, e encontrou um novo locus de susceptibilidade dentro do MHC que contribui para o desenvolvimento do DM1 (SANTIN et al., 2009). Entretanto, são necessárias investigações mais aprofundadas no que diz respeito à influência deste gene no diabetes autoimune, visto que outro estudo descreveu ausência de relação entre variantes do gene *HLA-DO* e autoimunidade (VAN LITH; VAN HAM; NEEFJES, 2002). Nossos resultados apontam para a modulação positiva do transcrito *HLA-DOA* nas pacientes com DMG, sendo possível sua contribuição para esta doença, com base no que já foi descrito para DM1.

Embora existam poucos dados sobre marcadores genéticos para DMG, recentemente foi descrito que a triagem de autoanticorpos anti-ilhotas, no momento do parto, é uma estratégia útil para identificar subgrupos de mulheres com lenta evolução para o diabetes autoimune. Um estudo relatou que mulheres com antígenos DR3 ou DR4 apresentam risco maior de desenvolver DM1 após a gravidez (FERBER et al., 1999). Com relação ao DMG, tem sido mostrado que alelos do gene *HLA-DRB* estão associados a esta doença, e que estes alelos estão particularmente envolvidos na regulação da resposta imune humana (SONG et al., 2002; GAO; LIN; QIU, 1998). Neste trabalho, encontramos alta regulação do transcrito *HLA-DRB6* nas nossas pacientes. O *HLA-DRB6* é um pseudogene transcrito em humanos, certo nível de expressão deste gene já foi observado, sendo relatado que transcritos codificados pelo

gene *HLA-DRB6* podem ser expressos na superfície celular (FERNANDEZ-SORIA et al., 1998). Outro estudo apontou que o *HLA-DRB6* codifica pequenos polipeptídeos que se ligam a membrana plasmática, porém sem função apresentadora de antígenos (MORENO-PELAYO et al., 1999). As vias pelas quais moléculas DRB6 podem ser expressas na membrana são incertas, entretanto outros exemplos de expressão de proteínas truncadas já foram descritos dentro do MHC, um exemplo é a molécula HLA-G (FERNANDEZ-SORIA et al., 1998; MOREAU et al., 2002).

A expressão do gene *HLA-G* (*human leukocyte antigen-G*) exerce papel essencial na proteção ao feto, diminuindo o ataque por células T citotóxicas em resposta aos antígenos do trofoblasto, além de atuar na proteção das células nas ilhotas pancreáticas (OZTEKIN, 2007). Um estudo que investigou a expressão de *HLA-G* após transplante de coração, mostrou que nenhum dos pacientes HLA-G-positivos apresentou história de diabetes quando comparados à incidência de 14,3% nos HLA-G-negativos (LILA et al., 2002). Estes dados apoiam a hipótese de que mecanismos imunológicos geradores de tolerância para o transplante de órgãos e para a gravidez, podem partilhar vias comuns, sendo muito provável que estes mecanismos estejam envolvidos no processo diabetogênico (OZTEKIN, 2007). Zhao et al (2011) encontraram mudanças significativas na expressão do *HLA-G* em amostras de sangue e de placenta de mulheres chinesas com DMG em relação a controles saudáveis. No entanto, na nossa análise o transcrito *HLA-G* não esteve diferencialmente expresso. É relatado que níveis plasmáticos elevados de HLA-G são detectados principalmente no primeiro trimestre da gravidez (ALEGRE et al., 2007). Uma possível explicação para a baixa expressão do transcrito *HLA-G* no nosso estudo reside no fato da nossa coleta ter sido realizada após o terceiro mês gestacional.

De acordo com Lenormand et al (2012), a expressão concomitante dos genes *HLA-DQA2* e *HLA-DQB2*, não havia sido detectada em nenhum tipo celular. Nesse trabalho, foi demonstrada expressão desses genes nas células de langerhans. No nosso estudo, confirmamos a indução de *HLA-DQA2* e *HLA-DQB2* em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com DMG, sugerindo a importância imunológica destes transcritos para esta doença. Adicionalmente, encontramos o transcrito *HLA-DQB1* superexpresso em nossa análise. Um estudo relatou influência de alelos deste gene no desenvolvimento do DM1 (FERNANDES; FOSS; DONADI, 2004). No que diz respeito ao DMG, uma pesquisa mostrou que a frequência de genótipos *HLA-DQB1* de risco para DM1, é maior em mulheres com DMG em relação a controles (SHAAT et al., 2004). Papadopoulou et al (2012) constataram que em pacientes com DMG, o alelo *HLA-DQB1*06:02*, considerado protetor

para o desenvolvimento de DM1, é pouco associado ao surgimento do diabetes após a gravidez podendo, eventualmente, conferir proteção no caso do DMG (ALVES et al., 2006; PAPADOPOULOU et al., 2009). Por outro lado, um trabalho apontou que não há diferença significativa na frequência do genótipo *HLA-DQB1* para risco ou proteção no DMG (WENG et al., 2002). Portanto, permanece controversa a associação do *HLA-DQB1* em relação ao DMG.

Uma observação importante é a identificação da associação de variantes polimórficas localizadas entre os genes *HLA-DQB1/HLA-DQA2* e na região 3'-UTR do gene *HLA-DQB1* a patogénia da asma (LI et al., 2010). Outro trabalho apontou alelos *HLA-DR*, implicados no desenvolvimento do DMG, relacionados à susceptibilidade a asma (SONG et al., 2002; GAO; LIN; QIU, 1998). A literatura documenta que a asma materna pode aumentar o risco de prematuridade, pré-eclâmpsia, mortalidade materna e DMG. A administração de corticosteróides eficazes no tratamento de asma tem sido associada ao risco aumentado de DMG (ROCKLIN, 2011). Na nossa análise funcional, encontramos a via de asma significativamente expressa, merecendo destaque os genes *HLA-DQB1*, *HLA-DQA2* e *TNF*, já associados à asma, compondo esta via e apresentando seus transcritos induzidos nas pacientes com DMG. Uma pesquisa realizada em camundongos mostrou que o gene *TNF* é implicado na progressão da doença e do estado inflamatório crônico da obesidade e da asma (WILLIAMS et al., 2012). Além disso, recentemente foi descrito que a obesidade é fator de risco na patogénese da asma, semelhante ao que ocorre para o DMG (SHORE, 2010; DIXON, 2012; TOSCA et al., 2012). Portanto, estas evidências justificam a indução de genes em comum entre essas duas doenças e a expressão da via de asma em nossos resultados.

Entre os transcritos envolvidos com metabolismo, o *IGFBP2* (*insulin-like growth factor binding protein-1*) esteve induzido em nossas análises. Guttula et al (2010) identificaram 50 genes funcionais relacionados a nefropatia diabética em pacientes com DM2, relatando *IGFBP2* entre os mais expressos. *IGFBPs* desempenham papéis importantes na patogénese da obesidade e na resistência à insulina e são sugeridos como marcadores precoces da síndrome metabólica (RUAN; LAI, 2010). Considerando que a expressão anormal de *IGFBPs* tem sido detectada em doenças metabólicas, pode-se justificar a indução do *IGFBP2* nas pacientes com DMG.

O gene *OLRI* (*oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1*) participa de etapas chave do metabolismo de ácidos graxos, é expresso em células placentárias, apresenta alta regulação em condições aterogénicas e está envolvido na patogénese da pré-eclâmpsia (YOSHIDA et al., 1998; KUME et al., 1998; MENG et al., 2008). Ethier-Chiasson et al

(2008) relataram que apesar do aumento dos níveis protéicos de *OLRI* em grávidas com DMG, não foram observadas modificações na expressão do mRNA deste gene entre mulheres com DMG e controles. No nosso trabalho este mRNA apresentou baixa expressão. Um estudo utilizando células trofoblásticas placentárias revelou que a combinação dos esteróides etinilestradiol e desogestrel leva a redução da expressão de *OLRI* (PANDEY et al., 2011). Assim, o uso combinado destes contraceptivos orais antes da gravidez, pode eventualmente ter influenciado de alguma maneira a expressão de *OLRI* neste estudo.

Ainda com relação ao metabolismo do diabetes, sabe-se que a via de sinalização *Wnt* é associada à patogênese do DM2, sendo sugerido que a manipulação desta via consiste em nova abordagem para terapia do diabetes (LEE et al., 2008). O gene *TCF3* (*transcription factor 3*) é membro dessa via e seu transcrito esteve induzido neste estudo. Com base neste achado, ressaltamos as características fisiológicas comuns entre DMG e DM2. Foi relatado risco entre 17%-63% de desenvolvimento de DM2 cerca de 5-16 anos após o parto de mulheres que tiveram DMG (HANNA; PETERS, 2002). Além disso, 11 loci associados ao DM2 já foram relacionados com o risco de desenvolver DMG (LAUENBORG et al., 2009). Essas semelhanças podem explicar a expressão elevada do *TCF3* nas nossas pacientes.

A respeito do *TCF7L2* (*transcription factor 7-like 2*), é relatada associação de variantes polimórficas deste gene com resistência à insulina. Klein et al (2012) encontraram uma variante homozigótica de um dos *SNPs* (*single nucleotide polymorphism*) deste gene, associada ao risco aumentado de DMG. Outros trabalhos também relataram variantes do *TCF7L2* associadas ao DMG, e envolvimento destas com adiposidade e alteração da secreção de insulina (WATANABE et al., 2007; SHAAT et al., 2007). Um estudo associou *TCF7L2* com susceptibilidade a DMG, independente da presença de genótipos *HLA-DQ* e de auto-anticorpos de células das ilhotas (PAPADOPOULOU et al., 2009). Entretanto, a maior parte desses trabalhos é realizada em populações que compõem a América do Norte e a Europa. Poucos estudos relacionam variantes do *TCF7L2* a populações da América do Sul (MARQUEZINE et al., 2008; CAMPBELL et al., 2012). Na nossa análise o *TCF7L2* esteve reprimido nas pacientes com DMG. Em populações nipo-brasileiras que possuem alta prevalência de DM2, variantes comuns do *TCF7L2* não apresentaram grandes contribuições para a incidência de anormalidades na tolerância a glicose (FRANCO et al., 2011), estando de acordo com nossos achados.

Um estudo realizado em linhagens de células beta de camundongos constatou que o silenciamento do *TCF7L2* conduz a uma expressão aumentada dos genes *Tp53* (*tumor protein p53*) e *Tp53inp1* (*tumor protein p53 inducible nuclear protein 1*). A redução da atividade do

TCF7L2 eleva a expressão da proteína *p53INP1*, por um mecanismo dependente de *p53*, resultando no aumento da apoptose das células beta (ZHOU et al., 2012). Em nosso trabalho identificamos a indução do mRNA *TP53INP1*. Além disso, a partir da análise funcional, este gene foi identificado nos processos biológicos de regulação da apoptose e de morte celular. O *TP53INP1* é relatado como um dos loci genéticos associados ao risco de DM2 em europeus, em indivíduos tunisianos e marroquinos (VOIGHT et al., 2010; CAUCHI et al., 2012). Apesar de necessária maior investigação a respeito da via *TCF7L2-p53-p53INP1* em humanos, podemos sugerir que semelhante ao que foi descrito por Zhou et al (2012), a repressão do *TCF7L2* em nossa análise pode estar relacionada com a indução do *TP53INP1*, contribuindo para destruição das células beta nas pacientes com DMG. Zhou et al (2012) sugerem ainda uma possível ligação molecular entre diabetes e câncer a partir da via *TCF7L2-p53*, entretanto são necessários mais estudos a respeito deste assunto.

É válido ressaltar que entre as vias significativas obtidas por análise funcional neste trabalho, encontramos a via de câncer, composta pelo gene *TCF7L2* e por genes envolvidos com morte celular, incluindo *FOS* (*FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog*) e *CASP8* (*caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase*). De acordo com nossa análise, os transcritos dos genes *FOS* e *CASP8* estiveram induzidos nas gestantes com DMG. Outro estudo, já havia relatado envolvimento de genes que participam da resposta à lesão e morte celular, incluindo o *FOS*, apresentando papel significativo na patogênese do DMG, reforçando nossos achados (ENQUOBAHRIE; WILLIAMS; QIU; MELLER; et al., 2009). Pesquisas realizadas em camundongos, demonstraram que a caspase 8 está alterada na embriopatia diabética, sendo requerida para elevação da glicemia e estando associada a mal formação embrionária. Além disso, a caspase 8 é responsável pela apoptose das células beta no DM1 e DM2 (ZHAO et al., 2009; LIADIS et al., 2007). É provável que nas nossas pacientes a indução do transcrito *CASP8* possa eventualmente desencadear lesões nas células beta, como relatado para DM1 e DM2 (LIADIS et al., 2007). Adicionalmente, outros trabalhos apontam redução significativa do risco de câncer de pâncreas e de mama associada a variantes polimórficas do gene *CASP8* (YANG et al., 2008; MACPHERSON et al., 2004).

Uma meta-análise recente indicou que pacientes diabéticos apresentam risco aumentado de desenvolver diferentes tipos de câncer (CHOWDHURY, 2010). Foi demonstrado que a sobrevivência após câncer de mama é reduzida em mulheres com diabetes (LIPSCOMBE et al., 2008). Possíveis mecanismos biológicos e evidências epidemiológicas entre DMG e câncer têm sido elucidados (CHODICK; ZUCKER, 2011). Embora o risco de câncer relacionado ao DMG ainda seja pouco discutido, recentemente foi relatada associação

entre esta condição e a incidência de câncer de pâncreas e de malignidades hematológicas (SELLA et al., 2011).

Finalmente, foram realizados experimentos de PCR em tempo real dos mRNAs de maior significância associados à inflamação (*CXCL2*, *TNF*, *NFKBIA* e *IL1 β*) confirmando os perfis de expressão destes, comparando-se com os dados obtidos por *microarrays*. A quantificação dos transcritos dos genes *CXCL2* e *NFKBIA* mostrou significância estatística por PCR em tempo real. Os transcritos *IL1-B* e *TNF* mostraram padrão de expressão similar ao observado pela técnica de *microarrays* embora sem diferença estatística significativa entre pacientes com DMG e controles.

A partir deste trabalho podemos concluir que vias relacionadas ao sistema imunológico e categorias funcionais associadas à inflamação participam da patogenia do DMG. Além disso, transcritos que pertencem à região do complexo principal de histocompatibilidade e aqueles relacionados ao metabolismo, apresentam papel importante no desenvolvimento desta doença.

Entretanto, uma série de questões permanece sem resposta, visto que o DMG apresenta vias comuns com DM1 e DM2. Para esclarecer o que leva ao desenvolvimento do DMG e para maior reprodutibilidade dos nossos achados, são necessárias maiores investigações a partir de estudos baseados no recrutamento de populações mais miscigenadas. Isto deve reduzir a heterogeneidade dos resultados e auxiliar na obtenção de conclusões mais definitivas.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Neste trabalho estabelecemos um paralelo entre o DMG e a inflamação, a partir da observação da indução transcricional de genes clássicos, envolvidos em processos inflamatórios, nas pacientes com DMG. Vários marcadores de inflamação parecem agir na tolerância à glicose e na desregulação da sensibilidade à insulina desencadeando o DMG. Nosso estudo sugere a participação de genes de inflamação como candidatos potenciais na patogenia do DMG.

Constatamos que a alta expressão transcricional destes genes indica possível influência da inflamação na desregulação metabólica, característica do DMG. Embora, não se saiba ao certo se é a resistência à insulina que leva a perturbações da via inflamatória ou vice-versa, este trabalho traz algumas evidências de que podem ser as alterações na via de inflamação que induzem modificações nos fenótipos metabólicos durante a gravidez.

Encontramos mRNAs envolvidos com metabolismo diferencialmente expressos em nossas amostras. A partir da análise transcricional, encontramos algumas alterações na regulação de genes e processos biológicos implicadas no DMG, até o momento, não relatados pela maioria dos estudos de associação.

Observamos a relevância de análises comparativas a partir de dados do transcriptoma entre pacientes e controles saudáveis para a descoberta de novos mecanismos envolvidos na regulação genética e molecular do DMG, facilitando a seleção de genes de interesse para futuras pesquisas e a contribuição funcional destes na doença.

Nossos resultados contribuem com uma visão mais abrangente dos mecanismos moleculares envolvidos na etiopatogenia do DMG, demonstrando que além de mRNAs de inflamação, mRNAs que pertencem à região do complexo principal de histocompatibilidade e alguns transcritos relacionados ao metabolismo, apresentam papel importante no desenvolvimento desta doença.

Referências Bibliográficas

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, M.J.B; SILVA, S.C. **Genética do diabetes**. In: Lyra R., Cavalcanti N. *Diabetes Mellitus*. 2 ed. Rio de Janeiro: Diagraphic editora. p. 71-73. 2009.

ALBERTI, K. G.; ZIMMET, P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes *mellitus* and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes *mellitus* provisional report of a WHO consultation. **Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association**, v. 15, n. 7, p. 539–553, jul. 1998.

ALEGRE, E., A. DIAZ-LAGARES, et al. Maternal antigen presenting cells are a source of plasmatic HLA-G during pregnancy: longitudinal study during pregnancy. **Hum Immunol**, v.68, n.8, Aug, p.661-7. 2007.

ALTMAYER, A. et al. Promoter structure and transcriptional activation of the murine TSG-14 gene encoding a tumor necrosis factor/interleukin-1-inducible pentraxin protein. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 43, p. 25584–25590, 27 out. 1995.

ALUVIHARE, V. R.; KALLIKOURDIS, M.; BETZ, A. G. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. **Nature immunology**, v. 5, n. 3, p. 266–271, mar. 2004.

ALVES, C. et al. [Distribution and frequency of HLA alleles and haplotypes in Brazilians with type 1 diabetes *mellitus*]. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 50, n. 3, p. 436–444, jun. 2006.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes *Mellitus*. *Diabetes Care*, volume 33, p. 562-569 supplement 1, january 2010.

ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. **Lancet**, v. 358, n. 9277, p. 221–229, 21 jul. 2001.

BENER, A.; SALEH, N. M.; AL-HAMQA, A. Prevalence of gestational diabetes and associated maternal and neonatal complications in a fast-developing community: global comparisons. **International journal of women's health**, v. 3, p. 367–373, 2011.

BOLSTAD, B. M. et al. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 19, n. 2, p. 185–193, 22 jan. 2003.

BÖYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and

sedimentation at 1 g. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum**, v. 97, p. 77–89, 1968.

BRAZMA, A.; VILO, J. Gene expression data analysis. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 3, n. 10, p. 823–829, ago. 2001.

BREITLING, R. et al. Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. **FEBS letters**, v. 573, n. 1-3, p. 83–92, 27 ago. 2004.

BUCHANAN, T. A.; XIANG, A. H. Gestational diabetes *mellitus*. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 3, p. 485–491, mar. 2005.

CAMPBELL, D. D. et al. Amerind ancestry, socioeconomic status and the genetics of type 2 diabetes in a Colombian population. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e33570, 2012.

CAROSELLA, E. D. et al. HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. **Advances in immunology**, v. 81, p. 199–252, 2003.

CAUCHI, S. et al. European genetic variants associated with type 2 diabetes in North African Arabs. **Diabetes & metabolism**, v. 38, n. 4, p. 316–323, out. 2012.

CHODICK, G.; ZUCKER, I. Diabetes, gestational diabetes and the risk of cancer in women: epidemiologic evidence and possible biologic mechanisms. **Women's health (London, England)**, v. 7, n. 2, p. 227–237, mar. 2011.

CHOWDHURY, T. A. Diabetes and cancer. **QJM: monthly journal of the Association of Physicians**, v. 103, n. 12, p. 905–915, dez. 2010.

CHUNG, I. B. et al. Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in a first trimester trophoblast cell line. **Placenta**, v. 21, n. 4, p. 320–324, maio. 2000.

CLARK, D. A.; CROITORU, K. TH1/TH2,3 imbalance due to cytokine-producing NK, gammadelta T and NK-gammadelta T cells in murine pregnancy decidua in success or failure of pregnancy. **American journal of reproductive immunology (New York, N.Y.: 1989)**, v. 45, n. 5, p. 257–265, maio. 2001.

COLOMIERE, M. et al. Defective insulin signaling in placenta from pregnancies complicated by gestational diabetes *mellitus*. **European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies**, v. 160, n. 4, p. 567–578, abr. 2009.

CONCANNON, P.; RICH, S. S.; NEPOM, G. T. Genetics of type 1A diabetes. **The New England journal of medicine**, v. 360, n. 16, p. 1646–1654, 16 abr. 2009.

CROWTHER, C. A. et al. Effect of treatment of gestational diabetes *mellitus* on pregnancy outcomes. **The New England journal of medicine**, v. 352, n. 24, p. 2477–2486, 16 jun. 2005.

DAHER, S. et al. Inflammatory mediator gene polymorphisms and gestational diabetes: a review of the literature. **Journal of reproductive immunology**, v. 90, n. 1, p. 111–116, jun. 2011.

DHAHBI, J. M. et al. Hepatic gene expression profiling of streptozotocin-induced diabetes. **Diabetes technology & therapeutics**, v. 5, n. 3, p. 411–420, 2003.

DIXON, A. E. Obesity: changing asthma in the 21st century. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 186, n. 5, p. 395–396, 1 set. 2012.

DO, J. H.; CHOI, D.-K. Normalization of microarray data: single-labeled and dual-labeled arrays. **Molecules and cells**, v. 22, n. 3, p. 254–261, 31 dez. 2006.

DONATH, M. Y.; SHOELSON, S. E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 2, p. 98–107, fev. 2011.

DÖRNER, G.; PLAGEMANN, A.; REINAGEL, H. Familial diabetes aggregation in type I diabetics: gestational diabetes an apparent risk factor for increased diabetes susceptibility in the offspring. **Experimental and clinical endocrinology**, v. 89, n. 1, p. 84–90, mar. 1987.

EISEN, M. B. et al. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 25, p. 14863–14868, 8 dez. 1998.

ENQUOBAHRIE, D. A.; WILLIAMS, M. A.; QIU, C.; MUHIE, S. Y. et al. Early pregnancy peripheral blood gene expression and risk of preterm delivery: a nested case control study. **BMC pregnancy and childbirth**, v. 9, p. 56, 2009.

ENQUOBAHRIE, D. A.; WILLIAMS, M. A.; QIU, C.; MELLER, M. et al. Global placental gene expression in gestational diabetes *mellitus*. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 200, n. 2, p. 206.e1–13, fev. 2009.

ETHIER-CHIASSEON, M. et al. Modulation of placental protein expression of OLR1: implication in pregnancy-related disorders or pathologies. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 136, n. 4, p. 491–502, out. 2008.

FEGHHI, M. et al. Relationship of vascular endothelial growth factor (VEGF) +405 G/C polymorphism and proliferative retinopathy in patients with type 2 diabetes. **Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine**, v. 158, n. 2, p. 85–91, ago. 2011.

FERBER, K. M. et al. Predictive value of human leukocyte antigen class II typing for the development of islet autoantibodies and insulin-dependent diabetes postpartum in women with gestational diabetes. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 84, n. 7, p. 2342–2348, jul. 1999.

FERNANDES, A. P. M.; FOSS, M. C.; DONADI, E. A. HLA-DQB1 alleles may influence the surface expression of DQ molecules in lymphomononuclear cells of type 1 diabetes *mellitus* patients. **Scandinavian journal of immunology**, v. 59, n. 3, p. 305–309, mar. 2004.

FERNÁNDEZ-MORERA, J. L. et al. The possible role of epigenetics in gestational diabetes: cause, consequence, or both. **Obstetrics and gynecology international**, v. 2010, p. 605163, 2010.

FERNANDEZ-SORIA, V. M. et al. Transcription and weak expression of HLA-DRB6: a gene with anomalies in exon 1 and other regions. **Immunogenetics**, v. 48, n. 1, p. 16–21, jun. 1998.

FRANCO, L. F. et al. Variants of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene and incident glucose intolerance in Japanese-Brazilians. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 44, n. 3, p. 240–244, mar. 2011.

GAO, J.; LIN, Y.; QIU, C. [HLA-DRB alleles polymorphism in susceptibility to asthma in Beijing Chinese]. **Zhonghua yi xue za zhi**, v. 78, n. 8, p. 591–594, ago. 1998.

GROSS, J. L. et al. Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 1, p. 16–26, fev. 2002.

GROUSE, L. H.; MUNSON, P. J.; NELSON, P. S. Sequence databases and microarrays as tools for identifying prostate cancer biomarkers. **Urology**, v. 57, n. 4 Suppl 1, p. 154–159, abr. 2001.

GUEUVOGHLANIAN-SILVA, B. Y. et al. Profile of inflammatory mediators in gestational diabetes *mellitus*: phenotype and genotype. **American journal of reproductive immunology (New York, N.Y.: 1989)**, v. 67, n. 3, p. 241–250, mar. 2012.

GUTTULA, S. V. et al. Cluster analysis and phylogenetic relationship in biomarker identification of type 2 diabetes and nephropathy. **International journal of diabetes in developing countries**, v. 30, n. 1, p. 52–56, jan. 2010.

HANNA, F. W. F.; PETERS, J. R. Screening for gestational diabetes; past, present and future. **Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association**, v. 19, n. 5, p. 351–358, maio. 2002.

HAUGUEL-DE MOUZON, S.; GUERRE-MILLO, M. The placenta cytokine network and inflammatory signals. *Placenta*, v. 27, n. 8, p. 794–798, ago. 2006.

HASELTON, D. R.; LLOYD, P. M.; JOHNSON, W. T. A comparison of the effects of two burs on endodontic access in all-ceramic high lucite crowns. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics**, v. 89, n. 4, p. 486–492, abr. 2000.

HONG, F. et al. RankProd: a bioconductor package for detecting differentially expressed genes in meta-analysis. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 22, n. 22, p. 2825–2827, 15 nov. 2006.

HVIID, T. V. F. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. **Human reproduction update**, v. 12, n. 3, p. 209–232, jun. 2006.

JOHNSON, W. E.; LI, C.; RABINOVIC, A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. **Biostatistics (Oxford, England)**, v. 8, n. 1, p. 118–127, jan. 2007.

KAAJA, R.; RÖNNEMAA, T. Gestational diabetes: pathogenesis and consequences to mother and offspring. **The review of diabetic studies: RDS**, v. 5, n. 4, p. 194–202, 2008.

KAIZER, E. C. et al. Gene expression in peripheral blood mononuclear cells from children with diabetes. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 92, n. 9, p. 3705–3711, set. 2007.

KATARINA, K. et al. HLA, NFKB1 and NFKBIA gene polymorphism profile in autoimmune diabetes *mellitus* patients. **Experimental and clinical endocrinology & diabetes: official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association**, v. 115, n. 2, p. 124–129, fev. 2007.

KAWANO, Y. et al. Regulation of interleukin-1alpha and tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 production by amnion-derived (WISH) cells. **Clinical and experimental obstetrics & gynecology**, v. 39, n. 1, p. 43–48, 2012.

KHANJANI, S. et al. NF κ B and AP-1 drive human myometrial IL8 expression. **Mediators of inflammation**, v. 2012, p. 504952, 2012.

KIRWAN, J. P. et al. TNF-alpha is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. **Diabetes**, v. 51, n. 7, p. 2207–2213, jul. 2002.

KLEIN, K. et al. Transcription factor 7-like 2 gene polymorphisms and gestational diabetes *mellitus*. **The journal of maternal-fetal & neonatal medicine: the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians**, v. 25, n. 9, p. 1783–1786, set. 2012.

KOVATS, S. et al. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. **Science (New York, N.Y.)**, v. 248, n. 4952, p. 220–223, 13 abr. 1990.

KUME, N. et al. Inducible expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells. **Circulation research**, v. 83, n. 3, p. 322–327, 10 ago. 1998.

LAPOLLA, A.; DALFRÀ, M. G.; FEDELE, D. Diabetes related autoimmunity in gestational diabetes *mellitus*: is it important? **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD**, v. 19, n. 9, p. 674–682, nov. 2009a.

LAPOLLA, A.; DALFRÀ, M. G.; FEDELE, D. Diabetes related autoimmunity in gestational diabetes *mellitus*: is it important? **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD**, v. 19, n. 9, p. 674–682, nov. 2009b.

LAUENBORG, J. et al. Common type 2 diabetes risk gene variants associate with gestational diabetes. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 94, n. 1, p. 145–150, jan. 2009.

LEE, S.-H. et al. Islet specific Wnt activation in human type II diabetes. **Experimental diabetes research**, v. 2008, p. 728763, 2008.

LENORMAND, C. et al. HLA-DQA2 and HLA-DQB2 genes are specifically expressed in human Langerhans cells and encode a new HLA class II molecule. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 188, n. 8, p. 3903–3911, 15 abr. 2012.

LI, X. et al. Genome-wide association study of asthma identifies RAD50-IL13 and HLA-DR/DQ regions. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 125, n. 2, p. 328–335.e11, fev. 2010.

LIADIS, N. et al. Distinct in vivo roles of caspase-8 in beta-cells in physiological and diabetes models. **Diabetes**, v. 56, n. 9, p. 2302–2311, set. 2007.

LIEW, C.-C. et al. The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 147, n. 3, p. 126–132, mar. 2006.

LILA, N. et al. Human leukocyte antigen-G expression after heart transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. **Circulation**, v. 105, n. 16, p. 1949–1954, 23 abr. 2002.

LIPSCOMBE, L. L. et al. The impact of diabetes on survival following breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, v. 109, n. 2, p. 389–395, maio. 2008.

LOKE, Y. W.; KING, A. Decidual natural-killer-cell interaction with trophoblast: cytolysis or cytokine production? **Biochemical Society transactions**, v. 28, n. 2, p. 196–198, fev. 2000.

MACPHERSON, G. et al. Association of a common variant of the CASP8 gene with reduced risk of breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 96, n. 24, p. 1866–1869, 15 dez. 2004.

MAKHSEED, M. et al. Th1 and Th2 cytokine profiles in recurrent aborters with successful pregnancy and with subsequent abortions. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 16, n. 10, p. 2219–2226, out. 2001.

MALERBI, D. A.; FRANCO, L. J. Multicenter study of the prevalence of diabetes *mellitus* and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. **Diabetes care**, v. 15, n. 11, p. 1509–1516, nov. 1992.

MARQUEZINE, G. F. et al. TCF7L2 variant genotypes and type 2 diabetes risk in Brazil: significant association, but not a significant tool for risk stratification in the general population. **BMC medical genetics**, v. 9, p. 106, 2008.

MARTIN, A. O. et al. Frequency of diabetes *mellitus* in mothers of probands with gestational diabetes: possible maternal influence on the predisposition to gestational diabetes. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 151, n. 4, p. 471–475, 15 fev. 1985.

MARZI, M. et al. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. **Clinical and experimental immunology**, v. 106, n. 1, p. 127–133, out. 1996.

MCLELLAN, J. A. et al. Prevalence of diabetes *mellitus* and impaired glucose tolerance in parents of women with gestational diabetes. **Diabetologia**, v. 38, n. 6, p. 693–698, jun. 1995a.

MCLELLAN, J. A. et al. Prevalence of diabetes *mellitus* and impaired glucose tolerance in parents of women with gestational diabetes. **Diabetologia**, v. 38, n. 6, p. 693–698, jun. 1995b.

MELANITOU, E. The autoimmune contrivance: genetics in the mouse model. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, v. 117, n. 3, p. 195–206, dez. 2005.

MENG, T. et al. [Relationship between the expressions of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 and apoptosis associated genes in placenta tissues and the pathogenesis of preeclampsia]. **Zhonghua fu chan ke za zhi**, v. 43, n. 6, p. 405–409, jun. 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. CADERNOS DE ATENÇÃO BÁSICA – Diabetes *Mellitus*. **Cadernos de Atenção Básica**, A. Normas e Manuais Técnicos. n. 16, p. 64, 2001.

MOREAU, P. et al. HLA-G protein processing and transport to the cell surface. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 59, n. 9, p. 1460–1466, set. 2002.

MORENO-PELAYO, M. A. et al. Complete cDNA sequences of the DRB6 gene from humans and chimpanzees: a possible model of a stop codon readingthrough mechanism in primates. **Immunogenetics**, v. 49, n. 10, p. 843–850, set. 1999.

MOSMANN, T. R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunology today**, v. 17, n. 3, p. 138–146, mar. 1996.

MULLA, W. R.; HENRY, T. Q.; HOMKO, C. J. Gestational diabetes screening after HAPO: has anything changed? **Current diabetes reports**, v. 10, n. 3, p. 224–228, jun. 2010.

NERUP, J. et al. HL-A antigens and diabetes *mellitus*. **Lancet**, v. 2, n. 7885, p. 864–866, 12 out. 1974.

NOLAN. Anthony Nolan Research Institute. 2008.

ONENGUT-GUMUSCU, S.; CONCANNON, P. The genetics of type 1 diabetes: lessons learned and future challenges. **Journal of autoimmunity**, v. 25 Supl, p. 34–39, 2005.

OZTEKIN, O. New insights into the pathophysiology of gestational diabetes *mellitus*: possible role of human leukocyte antigen-G. **Medical hypotheses**, v. 69, n. 3, p. 526–530, 2007.

PANDEY, H. et al. Reciprocal coordination of a combination oral contraceptive containing desogestrel+ethinyl estradiol on the expression of LOX-1 and LDLR in placental trophoblast cells. **Contraception**, v. 84, n. 6, p. e43–49, dez. 2011.

PAPADOPOULOU, A. et al. The type 1 diabetes protective HLA DQB1*0602 allele is less frequent in gestational diabetes *mellitus*. **Diabetologia**, v. 52, n. 7, p. 1339–1342, jul. 2009.

PAPADOPOULOU, A. et al. HLA-DQB1 genotypes and islet cell autoantibodies against GAD65 and IA-2 in relation to development of diabetes post partum in women with gestational diabetes *mellitus*. **Diabetes research and clinical practice**, v. 95, n. 2, p. 260–264, fev. 2012.

PATRELLI, T. S. et al. The trend of VEGF-A and PlGF in pregnant patients: a perspective case-control study on 214 women. **Clinical and experimental obstetrics & gynecology**, v. 39, n. 1, p. 57–64, 2012.

PERTYŃSKA-MARCZEWSKA, M. et al. Profile of peripheral blood neutrophil cytokines in diabetes type 1 pregnant women and its correlation with selected parameters in the newborns. **American journal of reproductive immunology (New York, N.Y.: 1989)**, v. 63, n. 2, p. 150–160, fev. 2010.

PLANAS, R.; PUJOL-BORRELL, R.; VIVES-PI, M. Global gene expression changes in type 1 diabetes: insights into autoimmune response in the target organ and in the periphery. **Immunology letters**, v. 133, n. 2, p. 55–61, 30 out. 2010.

PONTE, M. et al. Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1-specific receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 10, p. 5674–5679, 11 maio. 1999.

RADAELLI, T. et al. Gestational diabetes induces placental genes for chronic stress and inflammatory pathways. **Diabetes**, v. 52, n. 12, p. 2951–2958, dez. 2003.

RADAELLI, T. et al. Differential regulation of genes for fetoplacental lipid pathways in pregnancy with gestational and type 1 diabetes *mellitus*. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 201, n. 2, p. 209.e1–209.e10, ago. 2009.

RAMSAY, J. E. et al. Maternal obesity is associated with dysregulation of metabolic, vascular, and inflammatory pathways. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 87, n. 9, p. 4231–4237, set. 2002.

RASSI, D. M. et al. Gene expression profiles stratified according to type 1 diabetes *mellitus* susceptibility regions. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1150, p. 282–289, dez. 2008.

RAY, J. G. et al. Gestational prediabetes: a new term for early prevention? **The Indian journal of medical research**, v. 132, p. 251–255, set. 2010.

REEDQUIST, K. A.; TAK, P. P. Signal transduction pathways in chronic inflammatory autoimmune disease: small GTPases. **The open rheumatology journal**, v. 6, p. 259–272, 2012.

REIS, A. F.; VELHO, G. The Genetic Bases of Type 2 Diabetes *Mellitus*. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 426–432, ago. 2002.

REYNIER, F. et al. Specific gene expression signature associated with development of autoimmune type-I diabetes using whole-blood microarray analysis. **Genes and immunity**, v. 11, n. 3, p. 269–278, abr. 2010.

ROCKLIN, R. E. Asthma, asthma medications and their effects on maternal/fetal outcomes during pregnancy. **Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 32, n. 2, p. 189–197, set. 2011.

ROMZOVA, M. et al. NFkappaB and its inhibitor IkappaB in relation to type 2 diabetes and its microvascular and atherosclerotic complications. **Human immunology**, v. 67, n. 9, p. 706–713, set. 2006.

RUAN, W.; LAI, M. Insulin-like growth factor binding protein: a possible marker for the metabolic syndrome? **Acta diabetologica**, v. 47, n. 1, p. 5–14, mar. 2010.

RUAN, Y. et al. Interrogating the transcriptome. **Trends in biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 23–30, jan. 2004.

RUBINSTEIN, P. et al. HLA antigens and islet cell antibodies in gestational diabetes. **Human immunology**, v. 3, n. 3, p. 271–275, nov. 1981.

SAITO, S.; SASAKI, Y.; SAKAI, M. CD4(+)CD25^{high} regulatory T cells in human pregnancy. **Journal of reproductive immunology**, v. 65, n. 2, p. 111–120, abr. 2005.

SANTIN, I. et al. Exploring the diabetogenicity of the HLA-B18-DR3 CEH: independent association with T1D genetic risk close to HLA-DOA. **Genes and immunity**, v. 10, n. 6, p. 596–600, set. 2009.

SCHWARTZ, D. B. et al. Gestational diabetes *mellitus*: metabolic and blood glucose parameters in singleton versus twin pregnancies. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 181, n. 4, p. 912–914, out. 1999.

SELLA, T. et al. Gestational diabetes and risk of incident primary cancer: a large historical cohort study in Israel. **Cancer causes & control: CCC**, v. 22, n. 11, p. 1513–1520, nov. 2011.

SHAAT, N. et al. Genotypic and phenotypic differences between Arabian and Scandinavian women with gestational diabetes *mellitus*. **Diabetologia**, v. 47, n. 5, p. 878–884, maio. 2004.

SHAAT, N. et al. Association of the E23K polymorphism in the KCNJ11 gene with gestational diabetes *mellitus*. **Diabetologia**, v. 48, n. 12, p. 2544–2551, dez. 2005.

SHAAT, N. et al. A variant in the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene is associated with an increased risk of gestational diabetes *mellitus*. **Diabetologia**, v. 50, n. 5, p. 972–979, maio. 2007.

SHORE, S. A. Obesity, airway hyperresponsiveness, and inflammation. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 108, n. 3, p. 735–743, mar. 2010.

SILVA, G. L. et al. Profiling meta-analysis reveals primarily gene coexpression concordance between systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1110, p. 33–46, set. 2007.

SOLOFF, M. S. et al. In situ analysis of interleukin-1-induced transcription of cox-2 and il-8 in cultured human myometrial cells. **Endocrinology**, v. 145, n. 3, p. 1248–1254, mar. 2004.

SONG, D. et al. [Study on the gestational diabetes *mellitus* and histocompatibility human leukocyte antigen DRB allele polymorphism]. **Zhonghua fu chan ke za zhi**, v. 37, n. 5, p. 284–286, maio. 2002.

TAMIMI, R. M. et al. Average energy intake among pregnant women carrying a boy compared with a girl. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 326, n. 7401, p. 1245–1246, 7 jun. 2003.

TANNAHILL, G. M.; O'NEILL, L. A. J. The emerging role of metabolic regulation in the functioning of Toll-like receptors and the NOD-like receptor Nlrp3. **FEBS letters**, v. 585, n. 11, p. 1568–1572, 6 jun. 2011.

THANGARAJAH, H. et al. HIF-1 α dysfunction in diabetes. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 9, n. 1, p. 75–79, 1 jan. 2010.

TORQUATO, M. T. et al. Prevalence of diabetes *mellitus* and impaired glucose tolerance in the urban population aged 30-69 years in Ribeirão Preto (São Paulo), Brazil. **São Paulo medical journal = Revista paulista de medicina**, v. 121, n. 6, p. 224–230, 6 nov. 2003.

TOSCA, M. A. et al. Obesity and asthma in Caucasian preschool children: Is there a gender difference? **Pediatric allergy and immunology: official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology**, 18 set. 2012.

TREVISAN, G. L. et al. Using cDNA microarrays to identify human CD19(+) B cell gene products (ESTs) originated from systemic lupus erythematosus susceptibility loci. **Autoimmunity reviews**, v. 5, n. 5, p. 319–323, maio. 2006.

TROWSDALE, J.; BETZ, A. G. Mother's little helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance. **Nature immunology**, v. 7, n. 3, p. 241–246, mar. 2006.

URBANEK, M. et al. The role of inflammatory pathway genetic variation on maternal metabolic phenotypes during pregnancy. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e32958, 2012.

UYSAL, K. T.; WIESBROCK, S. M.; HOTAMISLIGIL, G. S. Functional analysis of tumor necrosis factor (TNF) receptors in TNF-alpha-mediated insulin resistance in genetic obesity. **Endocrinology**, v. 139, n. 12, p. 4832–4838, dez. 1998.

VAN BELLE, T. L.; COPPIETERS, K. T.; VON HERRATH, M. G. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. **Physiological reviews**, v. 91, n. 1, p. 79–118, jan. 2011.

VAN LITH, M.; VAN HAM, M.; NEEFJES, J. Novel polymorphisms in HLA-DOA and HLA-DOB in B-cell malignancies. **Immunogenetics**, v. 54, n. 8, p. 591–595, nov. 2002.

VAN LUNTEREN, E.; MOYER, M. Oxidoreductase, morphogenesis, extracellular matrix, and calcium ion-binding gene expression in streptozotocin-induced diabetic rat heart. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 293, n. 3, p. E759–768, set. 2007.

VIANNA, P., DALMAZ, C.A., VEIT, T.D., TEDOLDI, C., ROISENBERG, I., CHIES, J.A., 2007. Immunogenetics of pregnancy: role of a 14-bp deletion in the maternal HLA-G gene in primiparous pre-eclamptic Brazilian women. *Hum Immunol* 68, 668–674.

VIANNA, P. Imunorregulação da gestação: rumo ao sucesso. **Tese** (Doutorado em Ciências - Genética e Biologia Molecular) - Porto Alegre - RS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, 2009.

VILLASEÑOR, J.; BENOIST, C.; MATHIS, D. AIRE and APECED: molecular insights into an autoimmune disease. **Immunological reviews**, v. 204, p. 156–164, abr. 2005.

VOIGHT, B. F. et al. Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. **Nature genetics**, v. 42, n. 7, p. 579–589, jul. 2010.

VRACHNIS, N. et al. Role of adipokines and other inflammatory mediators in gestational diabetes *mellitus* and previous gestational diabetes *mellitus*. **International journal of endocrinology**, v. 2012, p. 549748, 2012.

WANG, X. et al. Identification of a molecular signature in human type 1 diabetes *mellitus* using serum and functional genomics. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 180, n. 3, p. 1929–1937, 1 fev. 2008.

WANG, Y. et al. Inferring gene regulatory networks from multiple microarray datasets. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 22, n. 19, p. 2413–2420, 1 out. 2006.

WATANABE, R. M. et al. Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) is associated with gestational diabetes *mellitus* and interacts with adiposity to alter insulin secretion in Mexican Americans. **Diabetes**, v. 56, n. 5, p. 1481–1485, maio. 2007.

WENG, J. et al. Screening for MODY mutations, GAD antibodies, and type 1 diabetes--associated HLA genotypes in women with gestational diabetes *mellitus*. **Diabetes care**, v. 25, n. 1, p. 68–71, jan. 2002.

WILLIAMS, A. S. et al. Obesity and airway responsiveness: Role of TNFR2. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, 11 maio. 2012.

YANG, M. et al. Functional variants in cell death pathway genes and risk of pancreatic cancer. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 14, n. 10, p. 3230–3236, 15 maio. 2008.

YOSHIDA, H. et al. Identification of the lectin-like receptor for oxidized low-density lipoprotein in human macrophages and its potential role as a scavenger receptor. **The Biochemical journal**, v. 334 (Pt 1), p. 9–13, 15 ago. 1998.

ZHAO, Y.-H. et al. Genomic expression profiles of blood and placenta reveal significant immune-related pathways and categories in Chinese women with gestational diabetes *mellitus*. **Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association**, v. 28, n. 2, p. 237–246, fev. 2011.

ZHAO, Z. et al. Caspase-8: a key role in the pathogenesis of diabetic embryopathy. **Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology**, v. 86, n. 1, p. 72–77, fev. 2009.

ZHOU, Y. et al. Survival of pancreatic beta cells is partly controlled by a TCF7L2-p53-p53INP1-dependent pathway. **Human molecular genetics**, v. 21, n. 1, p. 196–207, 1 jan. 2012.

Anexos

9 ANEXOS

ANEXO A

RIB. 13.003-000 - Fone: (13) 3301-3001 - Fax: (13) 3301-3002 - E-mail: rib.13@scmrp.org.br

Ribeirão Preto, 30 de maio de 2011

AUTORIZAÇÃO DE PESQUISA

Prezado(a) Senhor(a),

A Direção Clínica diante da aprovação do Diretor do Hospital de Ensino da Sociedade Beneficente Hospitalar Santa Casa de Ribeirão Preto, autoriza que seja realizado o Projeto de Pesquisa intitulado "PERFIS DE EXPRESSÃO GÊNICA ASSOCIADOS AO PROCESSAMENTO DE DANO OXIDATIVO DO DNA EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS" a ser desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Geraldo A. S. Passos, Prof. Dr. Eduardo Antonio Donadi e Profª Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo (Pesquisadores responsáveis Departamento de Biologia e Genética - FMRP/USP), Paula Takahashi (Pesquisadora responsável - Doutoranda) e Danilo Jordão Xavier (Pesquisador responsável - Doutorando) sem custo algum para nossa Instituição.

Atenciosamente,

Dr. Luiz Cláudio Fontes Mega
Diretor Clínico - SCMRP

Dr. Luis Eduardo Amaral Muniz
Diretor do Hospital de Ensino - SCMRP

Ribeirão Preto, 30 de maio de 2011 - CTD 14003-000 - Fone: (13) 3301-3001 - Fax: (13) 3301-3002 - E-mail: rib.13@scmrp.org.br

ANEXO B

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**
Campus Universitário Monte Alegre, fone: 36366-1000, Fax: 3633-1144
CEP: 14048-900, Ribeirão Preto, São Paulo

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

1) NOME DA PESQUISA: META-ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM LINFÓCITOS DE PACIENTES COM DIABETES MELITUS TIPO 1, TIPO 2 E GESTACIONAL

2) PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Dra. Diane Meyre Rassi

AS INFORMAÇÕES SUPRA-CITADAS DEVEM SER REDIGIDAS EM TERMOS SIMPLES, CONHECIDOS PELOS PACIENTES E DE FORMA QUE POSSAM ENTENDER:

No diabetes, ocorre diminuição da produção de insulina, fazendo com que o paciente necessite tomar insulina diariamente ou fazer dieta. Algumas pessoas desenvolvem a doença na infância (diabetes do tipo 1), outras na fase adulta (diabetes do tipo 2) e outras durante a gravidez (diabetes gestacional). Os motivos pelos quais os pacientes desenvolvem diabetes não são bem conhecidos. Para entender um pouco mais sobre os mecanismos associados com o desenvolvimento do diabetes, estamos propondo estudar os diversos tipos da doença (tipo 1, tipo 2 e gestacional), comparando algumas características, presentes no sangue, que são comuns a todos os tipos de diabetes, e outras que são observadas somente em cada tipo de diabetes. Para fazer este estudo, estamos pedindo ao Sr., Sra., ou responsável pelo paciente, a permissão para colher 10 mL de sangue (correspondente a 1 colher de sopa). O principal desconforto deste estudo é a picada da agulha, durante a colheita de sangue. Para evitar a colheita de sangue somente para este estudo, pretendemos colher o sangue em um dos seus retornos no hospital. Este estudo não traz benefício imediato ao doente, mas poderá, no futuro, trazer contribuições para os grupos de pacientes que vierem apresentar o diabetes, adotando medidas que poderão retardar ou impedir a progressão da doença.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Eu, _____
Registro Geral N° _____, abaixo assinado, tendo recebido as informações acima, e ciente dos meus direitos abaixo relacionados, concordo em participar.

1 – A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa e o tratamento a que serei submetido;

2 – A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isso traga prejuízo à continuação do meu cuidado e tratamento;

3 – A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a minha privacidade;

4 – O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que essa possa afetar minha vontade de continuar participando;

5 – A disponibilidade de tratamento médico e indenização que legalmente teria direito, por parte da Instituição de Saúde, em caso de danos que a justifiquem diretamente causados pela pesquisa e;

6 – Que se existirem gastos adicionais estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

7 – Caso exista qualquer tipo de problema ou dúvidas gerais, questionamentos sobre a pesquisa, entrar em contato com a pesquisadora responsável, Dra. Diane Meyre Rassi, pelos telefones: (16) 3602-2566, (16) 3602-3246 ou (16) 8122-8949 ou e-mail: dianerassi@usp.br

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____

Assinatura do paciente

ANEXO C

Ofício nº 4031/2008
CEP/SPC

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **"META-ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM LINFÓCITOS DE PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 1, TIPO 2 E GESTACIONAL"**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 276ª Reunião Ordinária realizada em 10/11/2008 e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com o Processo HCRP nº 9153/2008.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
DIANE MEYRE RASSI
PROF. DR. EDUARDO ANTÔNIO DONADI (Supervisor)
Depto. de Clínica Médica

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário
PWA - 0000 2732; IRB - 0000 2186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4
Fone (16) 3602-2228 - E-mail: cep@hcrp.fmrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

ANEXO D

Sondas	Genes	Fold change
A_23_P315364	<i>CXCL2</i>	3.3097
A_24_P228130	<i>CCL3L3</i>	2.9034
A_32_P87013	<i>IL8</i>	2.4657
A_23_P74609	<i>G0S2</i>	2.3382
A_23_P70670	<i>CD83</i>	2.12
A_23_P106002	<i>NFKBIA</i>	2.0983
A_23_P212089	<i>NFKBIZ</i>	2.077
A_23_P207564	<i>CCL4</i>	2.07
A_32_P211248	<i>LOC100131138</i>	2.0215
A_23_P110712	<i>DUSP1</i>	1.9666
A_23_P376488	<i>TNF</i>	1.9634
A_23_P216225	<i>EGR3</i>	1.9496
A_24_P412734	<i>PRSS36</i>	1.9457
A_23_P7144	<i>CXCL1</i>	1.933
A_23_P47614	<i>PHLDA2</i>	1.9074
A_32_P36235	<i>IER2</i>	1.8762
A_24_P148907	<i>MAB21L2</i>	1.8596
A_23_P79518	<i>IL1-B</i>	1.8579
A_24_P183150	<i>CXCL3</i>	1.8448
A_23_P117683	<i>C15orf63</i>	1.7859
A_23_P503200	<i>PHF10</i>	1.782
A_23_P214222	<i>MARCKS</i>	1.7587
A_23_P118722	<i>ASGR1</i>	1.7534
A_24_P274615	<i>ARRDC3</i>	1.7496
A_24_P250922	<i>PTGS2</i>	1.7292
A_23_P113572	<i>CD19</i>	1.7208
A_23_P90172	<i>PPP1R15A</i>	1.7005
A_23_P313512	<i>DCP1B</i>	1.6833
A_23_P86330	<i>IER5</i>	1.6724
A_32_P396186	<i>TRIM66</i>	1.6685
A_23_P350059	<i>C1orf152</i>	1.6643
A_24_P169013	<i>HLA-DRB6</i>	1.6586
A_23_P382775	<i>BBC3</i>	1.6584
A_23_P46936	<i>EGR2</i>	1.6581
A_23_P119196	<i>KLF2</i>	1.6578
A_24_P419028	<i>MOP-1</i>	1.6554
A_24_P37409	<i>DUSP2</i>	1.6469
A_23_P114299	<i>CXCR3</i>	1.6439
A_23_P432545	<i>EFCAB4A</i>	1.6422
A_23_P39237	<i>ZFP36</i>	1.6408
A_23_P19673	<i>SGK1</i>	1.6378
A_24_P257416	<i>CXCL2</i>	1.6374
A_23_P50775	<i>LRFN3</i>	1.6365
A_23_P132121	<i>SIK1</i>	1.6306
A_32_P8813	<i>LOC283663</i>	1.6287
A_24_P365365	<i>TCF3</i>	1.6255

Sondas	Genes	Fold change
A_23_P144096	<i>CISH</i>	1.6248
A_23_P300150	<i>NFATC1</i>	1.6242
A_23_P114057	<i>SEMA4C</i>	1.6216
A_23_P162596	<i>ACTR6</i>	1.6169
A_23_P429998	<i>FOSB</i>	1.615
A_24_P215804	<i>CKLF</i>	1.6134
A_23_P43946	<i>SARNP</i>	1.6054
A_23_P78268	<i>GLOD4</i>	1.6032
A_24_P285768	<i>EDEMI</i>	1.6015
A_23_P61398	<i>PIM3</i>	1.6006
A_23_P360874	<i>LRWD1</i>	1.6002
A_24_P393470	<i>MEF2BNB</i>	1.5978
A_24_P542375	<i>PTMA</i>	1.5974
A_23_P157038	<i>CNPY4</i>	1.5955
A_24_P203056	<i>BCL7A</i>	1.594
A_23_P42257	<i>IER3</i>	1.5932
A_24_P142495	<i>KRTAP1-3</i>	1.5895
A_24_P233850	<i>SDHC</i>	1.588
A_24_P239606	<i>GADD45B</i>	1.5865
A_24_P97342	<i>PROK2</i>	1.5839
A_24_P416131	<i>COTL1</i>	1.5791
A_23_P166536	<i>BRD1</i>	1.5776
A_23_P83438	<i>UBE2Z</i>	1.5773
A_23_P360769	<i>MAN2A1</i>	1.5749
A_23_P117082	<i>HEBP1</i>	1.5748
A_24_P751074	<i>ETS1</i>	1.5744
A_23_P434301	<i>PTMA</i>	1.5743
A_23_P40194	<i>DDX27</i>	1.5732
A_23_P117582	<i>JDP2</i>	1.5731
A_23_P73763	<i>LAGE3</i>	1.5689
A_23_P15182	<i>ARL2BP</i>	1.5684
A_23_P45524	<i>NGFRAP1</i>	1.5611
A_23_P135769	<i>ACTB</i>	1.5606
A_23_P42322	<i>COL11A2</i>	1.5598
A_23_P2114	<i>LAMTOR1</i>	1.5584
A_23_P90463	<i>LSM7</i>	1.5567
A_23_P418031	<i>IFFO2</i>	1.5509
A_23_P345674	<i>ZNF71</i>	1.5503
A_23_P1594	<i>VEGFB</i>	1.5486
A_24_P96234	<i>QTRT1</i>	1.5465
A_23_P58466	<i>SMN1</i>	1.5464
A_23_P132793	<i>MANF</i>	1.5427
A_23_P69497	<i>CLEC3B</i>	1.5417
A_24_P414256	<i>CCDC72</i>	1.5417
A_23_P257956	<i>ILF2</i>	1.5413
A_23_P207058	<i>SOCS3</i>	1.5406
A_23_P106194	<i>FOS</i>	1.5389
A_32_P116058	<i>NCRNA00094</i>	1.538
A_23_P411296	<i>CEBPB</i>	1.5335

Sondas	Genes	Fold change
A_32_P19840	<i>LOC100507507</i>	1.5321
A_23_P354341	<i>CD160</i>	1.5318
A_23_P157715	<i>PPP1R16A</i>	1.528
A_23_P377245	<i>LOC653160</i>	1.5259
A_23_P416581	<i>GNAZ</i>	1.5255
A_23_P345118	<i>PIMI</i>	1.5228
A_23_P5551	<i>NCL</i>	1.5226
A_24_P376129	<i>DFNB31</i>	1.5224
A_23_P1833	<i>B3GAT1</i>	1.5219
A_23_P100501	<i>HMOX2</i>	1.5218
A_24_P941167	<i>APOL6</i>	1.5204
A_23_P109171	<i>BFSP1</i>	1.5181
A_23_P426021	<i>SEL1L3</i>	1.5171
A_23_P131139	<i>DIRC1</i>	1.517
A_23_P91590	<i>RANBP1</i>	1.5132
A_24_P161581	<i>SHISA7</i>	1.5129
A_23_P99540	<i>ZFP36L1</i>	1.5118
A_23_P357717	<i>TCL1A</i>	1.5111
A_23_P12173	<i>CRTC2</i>	1.51
A_23_P96087	<i>HIFX</i>	1.509
A_24_P91701	<i>C22orf43</i>	1.509
A_23_P258093	<i>AGPAT1</i>	1.5082
A_23_P17204	<i>ANAPC1</i>	1.5056
A_23_P259071	<i>AREG</i>	1.5052
A_24_P506977	<i>C7orf40</i>	1.5032
A_32_P100258	<i>FLJ37453</i>	1.5029
A_23_P19938	<i>KDELR2</i>	1.5022
A_23_P141555	<i>TBX21</i>	1.5019
A_32_P223189	<i>SUMO1P3</i>	1.5012
A_23_P75330	<i>HNRNPF</i>	1.501
A_23_P312920	<i>POU2AF1</i>	1.5008
A_23_P26254	<i>NDUFAF1</i>	1.4999
A_23_P146284	<i>SQLE</i>	1.4996
A_23_P129064	<i>GATM</i>	1.4993
A_24_P119131	<i>TMEM120B</i>	1.4988
A_23_P208706	<i>BAX</i>	1.4986
A_24_P159434	<i>CD300A</i>	1.496
A_23_P57370	<i>CECR5</i>	1.4958
A_24_P74160	<i>SNRPD2</i>	1.4925
A_23_P100730	<i>SKAP1</i>	1.4922
A_23_P37545	<i>AAGAB</i>	1.4918
A_23_P101960	<i>ZFP36L2</i>	1.4878
A_23_P111273	<i>TBC1D7</i>	1.4858
A_23_P152984	<i>THOC4</i>	1.4854
A_23_P200710	<i>PIK3C2B</i>	1.4854
A_24_P202558	<i>SIPA1L3</i>	1.485
A_23_P10591	<i>METRNL</i>	1.4839
A_23_P145657	<i>STAG3</i>	1.4839
A_23_P107744	<i>SIPR5</i>	1.4821

Sondas	Genes	Fold change
A_23_P428129	<i>CDKN1C</i>	1.4811
A_24_P40551	<i>BEX4</i>	1.4788
A_23_P42802	<i>PDIA4</i>	1.4784
A_23_P76078	<i>IL23A</i>	1.4784
A_23_P135184	<i>RALGDS</i>	1.4777
A_24_P252497	<i>TRIB1</i>	1.4758
A_23_P132226	<i>TPST2</i>	1.4757
A_23_P8339	<i>MRPL18</i>	1.4756
A_24_P250650	<i>RABL2A</i>	1.4755
A_23_P29079	<i>PFKL</i>	1.4745
A_23_P48175	<i>TMEM106C</i>	1.4744
A_23_P360245	<i>NUDCD2</i>	1.4742
A_23_P359655	<i>ZNF664</i>	1.474
A_23_P10559	<i>AATK</i>	1.473
A_23_P119923	<i>CNNM4</i>	1.4719
A_23_P255153	<i>RBMX2</i>	1.4711
A_23_P138835	<i>CAPN1</i>	1.4707
A_24_P942354	<i>PITPNA</i>	1.4702
A_23_P111481	<i>SRRT</i>	1.4699
A_23_P34835	<i>LMNA</i>	1.4692
A_23_P13604	<i>PEBP1</i>	1.4681
A_23_P98580	<i>FADS2</i>	1.4678
A_32_P216426	<i>HNRNPA1L2</i>	1.4678
A_23_P20196	<i>ARPC1B</i>	1.4672
A_32_P191503	<i>NCRNA00265</i>	1.467
A_23_P27894	<i>SAFB2</i>	1.4664
A_23_P37736	<i>TNFRSF17</i>	1.4658
A_23_P151634	<i>SUPT16H</i>	1.4656
A_24_P67988	<i>FRMD8</i>	1.4645
A_32_P209960	<i>CIITA</i>	1.4635
A_23_P168882	<i>TP53INP1</i>	1.4628
A_32_P47754	<i>SLC2A14</i>	1.4619
A_24_P182764	<i>ATG4B</i>	1.4611
A_23_P28057	<i>THOP1</i>	1.4609
A_32_P56249	<i>LOC100131733</i>	1.4607
A_23_P303891	<i>LCE1C</i>	1.4598
A_23_P136683	<i>HLA-DQB1</i>	1.4595
A_23_P36226	<i>SLC25A33</i>	1.4573
A_23_P15582	<i>XYLT2</i>	1.4567
A_24_P277367	<i>CXCL5</i>	1.4565
A_32_P73452	<i>ANO8</i>	1.4564
A_23_P1361	<i>ALDH18A1</i>	1.456
A_32_P234935	<i>TARDBP</i>	1.456
A_23_P11705	<i>BSDC1</i>	1.4557
A_23_P428184	<i>HIST1H2AD</i>	1.4552
A_24_P193295	<i>RAB15</i>	1.4551
A_23_P116414	<i>PLA2G16</i>	1.455
A_24_P295999	<i>CD4</i>	1.4549
A_23_P112452	<i>GGTA1P</i>	1.454

Sondas	Genes	Fold change
A_24_P83738	<i>ASTN2</i>	1.4534
A_32_P74409	<i>C11orf96</i>	1.4509
A_23_P58337	<i>FIP1L1</i>	1.4494
A_23_P416314	<i>HRASLS5</i>	1.449
A_23_P28068	<i>GTPBP3</i>	1.4487
A_23_P103601	<i>MAN1C1</i>	1.4479
A_24_P911676	<i>SOX4</i>	1.4477
A_23_P7056	<i>SDAD1</i>	1.4462
A_23_P89030	<i>C16orf95</i>	1.4457
A_23_P18317	<i>SLC41A3</i>	1.4455
A_23_P128783	<i>EAPP</i>	1.4454
A_23_P57277	<i>C21orf7</i>	1.4454
A_23_P154938	<i>HIRA</i>	1.4448
A_23_P395595	<i>FNBP4</i>	1.4447
A_23_P90612	<i>MCM6</i>	1.4426
A_23_P218131	<i>INF2</i>	1.4418
A_23_P125618	<i>GABRA3</i>	1.4409
A_23_P59677	<i>RINT1</i>	1.4409
A_24_P47681	<i>CAND1</i>	1.44
A_23_P138194	<i>NCF2</i>	1.4397
A_24_P307014	<i>BRD2</i>	1.4393
A_23_P152002	<i>BCL2A1</i>	1.439
A_23_P501435	<i>CSRP2BP</i>	1.4389
A_23_P31315	<i>CBX3</i>	1.4379
A_24_P419309	<i>SNRNP40</i>	1.4376
A_32_P5251	<i>RARA</i>	1.437
A_23_P136413	<i>MMP17</i>	1.4366
A_23_P123905	<i>EXOSC3</i>	1.4365
A_24_P157087	<i>CASP8</i>	1.4363
A_32_P215938	<i>GPSM1</i>	1.4363
A_23_P103476	<i>UBIAD1</i>	1.4356
A_32_P15799	<i>HMG2</i>	1.4344
A_24_P295543	<i>BLOC1S2</i>	1.4321
A_23_P164237	<i>UTP6</i>	1.4317
A_24_P417596	<i>FLYWCH2</i>	1.4315
A_32_P85813	<i>RAP1GDS1</i>	1.4291
A_23_P51646	<i>PLK3</i>	1.4289
A_23_P101551	<i>BCAT2</i>	1.4282
A_23_P166408	<i>OSM</i>	1.4282
A_32_P157945	<i>DSP</i>	1.4282
A_23_P41292	<i>CTBP1</i>	1.428
A_23_P114947	<i>RGS2</i>	1.4271
A_23_P64721	<i>HCAR3</i>	1.4267
A_24_P854492	<i>MIAT</i>	1.4267
A_24_P931443	<i>GPR68</i>	1.4266
A_23_P86570	<i>ANXA7</i>	1.4265
A_23_P98015	<i>CUTC</i>	1.4263
A_24_P20630	<i>LEF1</i>	1.4253
A_32_P74752	<i>LOC100131289</i>	1.4239

Sondas	Genes	Fold change
A_23_P56759	<i>KRCC1</i>	1.4221
A_23_P118203	<i>ZG16B</i>	1.4203
A_23_P53646	<i>NAP1L1</i>	1.42
A_24_P108451	<i>GPI</i>	1.4199
A_23_P42718	<i>NFE2L3</i>	1.4195
A_23_P30254	<i>PLK2</i>	1.4194
A_23_P121011	<i>CSRNP1</i>	1.4183
A_32_P15320	<i>EEF1A1</i>	1.416
A_23_P74178	<i>HCRT1</i>	1.4156
A_23_P120594	<i>ACSS1</i>	1.4154
A_23_P12343	<i>GSTM3</i>	1.4149
A_23_P31686	<i>KIAA1967</i>	1.4144
A_32_P129752	<i>TMEM30B</i>	1.4139
A_32_P184488	<i>PHLDB3</i>	1.4135
A_23_P208788	<i>C19orf33</i>	1.413
A_23_P168403	<i>KCNH2</i>	1.4118
A_24_P241815	<i>JUNB</i>	1.4107
A_23_P120227	<i>LBH</i>	1.4105
A_32_P356316	<i>HLA-DOA</i>	1.4102
A_24_P218970	<i>EIF4B</i>	1.4091
A_23_P98402	<i>SIDT2</i>	1.4089
A_23_P122443	<i>HIST1H1C</i>	1.4082
A_23_P19510	<i>HLA-DQB2</i>	1.4024
A_23_P9883	<i>NLRP3</i>	1.4021
A_23_P126057	<i>SCP2</i>	1.4017
A_23_P103864	<i>TTC13</i>	1.4004
A_23_P126486	<i>CROCCP2</i>	1.3991
A_24_P319354	<i>SUMO1</i>	1.3962
A_23_P201211	<i>FCRL5</i>	1.3942
A_23_P321703	<i>BCL2A1</i>	1.394
A_23_P152235	<i>IRX3</i>	1.3937
A_23_P47208	<i>BANF1</i>	1.3931
A_23_P201672	<i>METTL13</i>	1.3925
A_23_P56703	<i>C2orf89</i>	1.3925
A_23_P307400	<i>CEP95</i>	1.3918
A_23_P131676	<i>CXCR7</i>	1.3913
A_23_P34915	<i>ATF3</i>	1.3891
A_23_P122563	<i>PFDN6</i>	1.3869
A_24_P63347	<i>PF4V1</i>	1.3864
A_23_P121596	<i>PPBP</i>	1.3863
A_23_P87879	<i>CD69</i>	1.385
A_23_P45999	<i>FBXO2</i>	1.3834
A_23_P116890	<i>PRB3</i>	1.3802
A_23_P39067	<i>SPIB</i>	1.3799
A_32_P60459	<i>OTUD1</i>	1.3767
A_23_P108751	<i>FHL2</i>	1.3749
A_24_P406006	<i>LPCAT1</i>	1.3749
A_23_P202269	<i>ANK3</i>	1.373
A_24_P117029	<i>LDLR</i>	1.3723

Sondas	Genes	Fold change
A_23_P215051	<i>ECHDC1</i>	1.3722
A_23_P59045	<i>HIST1H2AE</i>	1.3721
A_23_P202496	<i>NOC3L</i>	1.3718
A_23_P311885	<i>L3MBTL3</i>	1.3713
A_23_P16866	<i>VIL1</i>	1.3712
A_23_P210581	<i>KCNG1</i>	1.371
A_23_P125408	<i>DOHH</i>	1.3699
A_23_P214080	<i>EGR1</i>	1.3673
A_23_P416212	<i>HSPB9</i>	1.3631
A_24_P416961	<i>ARVCF</i>	1.3606
A_23_P156218	<i>GZMK</i>	1.3604
A_23_P63798	<i>KLF6</i>	1.3598
A_24_P64329	<i>STK32C</i>	1.3589
A_23_P216501	<i>TPM2</i>	1.358
A_24_P477051	<i>RPS4XP21</i>	1.3572
A_23_P167168	<i>IGJ</i>	1.3551
A_23_P128598	<i>TUBA3C</i>	1.3536
A_23_P29124	<i>GP1BB</i>	1.3493
A_23_P380614	<i>ATP9A</i>	1.3485
A_23_P255827	<i>FKSG2</i>	1.3467
A_23_P153320	<i>ICAM1</i>	1.3462
A_23_P27207	<i>SCGB1C1</i>	1.3452
A_23_P127446	<i>DPF2</i>	1.3441
A_32_P146659	<i>LOC401431</i>	1.3434
A_23_P202104	<i>PPIF</i>	1.3402
A_24_P517901	<i>HNRNPA1</i>	1.3387
A_23_P253221	<i>ARHGEF4</i>	1.3384
A_24_P63537	<i>ERAP1</i>	1.3358
A_23_P317056	<i>ND6</i>	1.3312
A_23_P145724	<i>C7orf16</i>	1.3309
A_24_P55148	<i>HIST1H2BJ</i>	1.3308
A_23_P1682	<i>TMEM45B</i>	1.3259
A_23_P333129	<i>DUX4L4</i>	1.3239
A_23_P101992	<i>MARCO</i>	1.3194
A_23_P79978	<i>SLC24A3</i>	1.3115
A_32_P217750	<i>IL3RA</i>	1.3067
A_23_P154849	<i>OLIG1</i>	1.3051
A_24_P272845	<i>DOCK3</i>	1.3021
A_23_P121064	<i>PTX3</i>	1.3
A_23_P26468	<i>RHBDL1</i>	1.2994
A_23_P131825	<i>TNNC2</i>	1.2985
A_23_P148541	<i>CTAG1A</i>	1.2935
A_23_P113701	<i>PDGFA</i>	1.2888
A_23_P125233	<i>CNN1</i>	1.2853
A_23_P412214	<i>RAP1GAP2</i>	1.2852
A_23_P26024	<i>C15orf48</i>	1.2798
A_23_P102731	<i>SMOX</i>	1.277
A_23_P250102	<i>CAND2</i>	1.2761
A_23_P215913	<i>CLU</i>	1.2677

Sondas	Genes	Fold change
A_24_P319923	MYLK	1.2658
A_23_P127948	ADM	1.2657
A_23_P17345	MAFB	1.2608
A_23_P306941	RGL4	1.2577
A_23_P152906	ALOX12	1.2564
A_24_P921366	CALDI	1.2541
A_24_P366122	ACBD4	1.2421
A_23_P164927	SYNGR4	1.2409
A_23_P2181	CYB5R2	1.2291
A_23_P371266	DNM3	1.2275
A_23_P41344	EREG	1.227
A_23_P40240	CTSZ	1.2166
A_23_P116694	RPS26	1.204
A_23_P119943	IGFBP2	1.2002
A_24_P943566	PHACTR1	1.1939
A_24_P272451	C17orf87	1.1717
A_24_P289404	RPS26	1.1689
A_23_P120902	LGALS2	1.1688
A_23_P17844	PVALB	1.1523
A_23_P132139	C21orf58	1.1382
A_23_P1691	MMP1	1.1275
A_23_P19291	TUBB2A	1.1195
A_24_P852756	HLA-DQA2	1.108
A_23_P252306	ID1	1.1057
A_23_P500271	IRF5	1.0654
A_24_P45620	UTS2	1.0409
A_23_P76622	DCT	0.9984
A_23_P86021	SELENBP1	0.9595
A_23_P328545	GABRP	0.9115
A_23_P140675	EPB42	0.8972
A_32_P385587	ALAS2	0.8702
A_24_P252996	FOLR3	0.8661
A_23_P89780	LAMA3	0.8306
A_24_P270460	IFI27	0.7769
A_23_P49254	HBQ1	0.7578
A_24_P820037	SLC6A17	0.7425
A_23_P116765	LALBA	0.7412
A_23_P501010	COL17A1	0.7358
A_23_P53137	HBG1	0.7348
A_23_P258912	MYOM2	0.7249
A_23_P141173	MPO	0.7243
A_23_P168916	CAI	0.7197
A_23_P501822	JUP	0.7183
A_24_P398147	NEBL	0.7164
A_24_P15621	SLC6A10P	0.7108
A_23_P310460	MDGA1	0.6964
A_23_P31816	DEFA3	0.6958
A_23_P135486	AHSP	0.6923
A_32_P399187	LOC146336	0.6897

Sondas	Genes	Fold change
A_32_P105549	<i>ANXA8L2</i>	0.6896
A_23_P163025	<i>RNASE3</i>	0.6885
A_32_P144908	<i>ZNF254</i>	0.6816
A_23_P337726	<i>ATP6</i>	0.6812
A_23_P40174	<i>MMP9</i>	0.6761
A_24_P142305	<i>HBA2</i>	0.6759
A_24_P118489	<i>WHAMM</i>	0.6723
A_23_P43412	<i>HEMGN</i>	0.6712
A_23_P156445	<i>DDX43</i>	0.6707
A_24_P382319	<i>CEACAM1</i>	0.6688
A_23_P26358	<i>SMG1</i>	0.6641
A_23_P326080	<i>DEFA4</i>	0.6639
A_24_P247026	<i>FAM154B</i>	0.6637
A_32_P180971	<i>LOC728323</i>	0.6631
A_23_P89380	<i>SLC4A1</i>	0.6567
A_23_P161909	<i>MS4A3</i>	0.6561
A_23_P399255	<i>RNF182</i>	0.6512
A_24_P190541	<i>BRWD1</i>	0.6487
A_23_P68868	<i>TUG1</i>	0.6478
A_23_P201368	<i>CTBS</i>	0.646
A_32_P46191	<i>ZNF727</i>	0.6434
A_24_P190472	<i>SLPI</i>	0.6416
A_23_P46894	<i>CHAT</i>	0.641
A_23_P46725	<i>EPC1</i>	0.6409
A_23_P216080	<i>HOOK3</i>	0.6371
A_23_P149529	<i>TACSTD2</i>	0.637
A_23_P129413	<i>DPEP3</i>	0.6331
A_23_P89155	<i>CDK3</i>	0.6325
A_23_P46606	<i>LPGAT1</i>	0.6311
A_23_P392942	<i>MSR1</i>	0.6309
A_23_P57474	<i>OSBP2</i>	0.6294
A_24_P21770	<i>YPEL4</i>	0.6291
A_23_P65674	<i>TMOD3</i>	0.6279
A_24_P941708	<i>RUFY2</i>	0.6257
A_23_P309779	<i>N4BP2</i>	0.6226
A_23_P320658	<i>BUB3</i>	0.6223
A_24_P230916	<i>MIER1</i>	0.6202
A_23_P253602	<i>BMX</i>	0.6187
A_23_P213199	<i>DNAJB14</i>	0.6174
A_24_P296808	<i>PNMAL1</i>	0.6159
A_24_P332862	<i>ZNF493</i>	0.6155
A_24_P255218	<i>MYO5A</i>	0.6138
A_23_P47484	<i>GLYATL2</i>	0.613
A_24_P161018	<i>PARP14</i>	0.6114
A_32_P142881	<i>SMG1</i>	0.6109
A_23_P131785	<i>BPI</i>	0.6106
A_23_P347541	<i>GRIN3A</i>	0.6103
A_23_P259863	<i>CD177</i>	0.6101
A_23_P50815	<i>TTYH1</i>	0.6101

Sondas	Genes	Fold change
A_23_P204696	<i>CDKN1B</i>	0.6089
A_23_P38457	<i>TAOK1</i>	0.6076
A_24_P923757	<i>ATF7IP</i>	0.6066
A_24_P86240	<i>BMP2K</i>	0.6035
A_23_P57709	<i>PCOLCE2</i>	0.6031
A_23_P156061	<i>LNPEP</i>	0.6026
A_24_P290502	<i>GCC2</i>	0.6018
A_23_P409553	<i>PPM1A</i>	0.6008
A_23_P40936	<i>NR2C2</i>	0.6004
A_23_P139648	<i>IAPP</i>	0.5998
A_24_P82135	<i>SECISBP2L</i>	0.5993
A_24_P85478	<i>ARIH1</i>	0.5978
A_24_P393571	<i>GDA</i>	0.5973
A_23_P121716	<i>ANXA3</i>	0.5938
A_24_P362193	<i>CD84</i>	0.5938
A_23_P140384	<i>CTSG</i>	0.5934
A_24_P400997	<i>SMCHD1</i>	0.5932
A_24_P68311	<i>SYNE2</i>	0.5929
A_32_P163533	<i>ZNF322A</i>	0.5922
A_24_P68088	<i>TCAM1P</i>	0.5909
A_23_P404606	<i>C5orf41</i>	0.5908
A_23_P432591	<i>CCDC125</i>	0.5897
A_23_P344481	<i>STOX1</i>	0.5896
A_24_P239731	<i>B4GALT5</i>	0.5896
A_24_P357536	<i>FBXO11</i>	0.5889
A_23_P303851	<i>TAS2R45</i>	0.5869
A_24_P358425	<i>CCDC75</i>	0.5866
A_24_P380330	<i>PANK3</i>	0.5866
A_23_P161098	<i>ELK4</i>	0.5843
A_23_P323243	<i>PNLDC1</i>	0.584
A_23_P92948	<i>PRRC1</i>	0.583
A_24_P873659	<i>MALAT1</i>	0.5829
A_23_P92786	<i>RBM27</i>	0.5818
A_24_P231057	<i>BODIL</i>	0.5811
A_23_P171336	<i>NXF3</i>	0.581
A_24_P325107	<i>FAM160B1</i>	0.5808
A_23_P96965	<i>SYNC</i>	0.5802
A_32_P79492	<i>LOC100508233</i>	0.5789
A_24_P55496	<i>OSR2</i>	0.5784
A_24_P53353	<i>RAB12</i>	0.5778
A_23_P52176	<i>ZNF124</i>	0.5774
A_32_P173298	<i>SF3B3</i>	0.5768
A_32_P184394	<i>TFEC</i>	0.5768
A_24_P348925	<i>CCNK</i>	0.5756
A_24_P323815	<i>MYCBP2</i>	0.5753
A_24_P124624	<i>OLR1</i>	0.5749
A_23_P383819	<i>TBX3</i>	0.5748
A_23_P67952	<i>MYCNOS</i>	0.5748
A_23_P385843	<i>DEFB127</i>	0.5747

Sondas	Genes	Fold change
A_23_P169437	<i>LCN2</i>	0.5744
A_32_P199429	<i>NCAM2</i>	0.5741
A_24_P453921	<i>DPY19L1P1</i>	0.5733
A_23_P85218	<i>SOX3</i>	0.5731
A_23_P324304	<i>ALK</i>	0.5723
A_23_P37415	<i>SECISBP2L</i>	0.5719
A_24_P143171	<i>TMEM47</i>	0.5705
A_24_P76995	<i>ZDHHC17</i>	0.5703
A_32_P140898	<i>FOXN2</i>	0.5689
A_24_P83379	<i>WDFY3</i>	0.5683
A_23_P167081	<i>REST</i>	0.5677
A_23_P211064	<i>GCFC1</i>	0.5676
A_32_P189204	<i>GAS2L3</i>	0.5671
A_24_P339560	<i>SIGLEC11</i>	0.567
A_24_P215407	<i>DDX6</i>	0.5669
A_32_P212095	<i>C17orf105</i>	0.5669
A_23_P356677	<i>PDE10A</i>	0.5663
A_32_P480177	<i>TNN</i>	0.5659
A_23_P415411	<i>HIST1H4E</i>	0.5653
A_23_P502470	<i>IL6ST</i>	0.5647
A_32_P57057	<i>USP15</i>	0.5644
A_23_P92672	<i>OCLN</i>	0.5595
A_24_P173746	<i>RALGPS2</i>	0.5589
A_23_P207174	<i>GH2</i>	0.5588
A_23_P416395	<i>STC2</i>	0.5577
A_23_P388855	<i>KAT6B</i>	0.5574
A_23_P169293	<i>DMRT1</i>	0.5572
A_24_P126262	<i>BAGE4</i>	0.5572
A_23_P91636	<i>POM121L9P</i>	0.5559
A_23_P200001	<i>NEXN</i>	0.5554
A_24_P932416	<i>TMEM14E</i>	0.5517
A_23_P376060	<i>IKZF3</i>	0.5512
A_23_P35576	<i>ZNF518A</i>	0.5508
A_24_P410582	<i>VGLL4</i>	0.5499
A_23_P11005	<i>ADAMTS7</i>	0.5498
A_24_P269895	<i>HNRNPA3</i>	0.5498
A_23_P205623	<i>DDHD1</i>	0.5486
A_23_P56938	<i>REL</i>	0.5479
A_24_P181254	<i>OLFM4</i>	0.5478
A_24_P401491	<i>MORN5</i>	0.5477
A_23_P163711	<i>FAM57B</i>	0.5475
A_23_P436618	<i>GABRA5</i>	0.5474
A_23_P158851	<i>PCDH10</i>	0.5473
A_23_P99397	<i>ZDHHC20</i>	0.5463
A_24_P136551	<i>NPLOC4</i>	0.5462
A_23_P336663	<i>SLC7A13</i>	0.5461
A_23_P254165	<i>RAI2</i>	0.5457
A_24_P385732	<i>OSTalpha</i>	0.5445
A_24_P231025	<i>BRWD1</i>	0.5438

Sondas	Genes	Fold change
A_23_P40693	<i>EP300</i>	0.5431
A_23_P200772	<i>ZNF644</i>	0.543
A_24_P106839	<i>WHSC1L1</i>	0.543
A_24_P98006	<i>MCHR2</i>	0.543
A_24_P348861	<i>TTY15</i>	0.5423
A_23_P147729	<i>SLC35E3</i>	0.5416
A_24_P209047	<i>IL5</i>	0.5416
A_24_P241183	<i>CLEC2D</i>	0.539
A_24_P28722	<i>RSAD2</i>	0.5384
A_24_P13406	<i>C12orf40</i>	0.5381
A_23_P23873	<i>PAPPA2</i>	0.5379
A_24_P83437	<i>ZNF326</i>	0.5362
A_23_P68511	<i>ANGPT4</i>	0.5359
A_23_P9319	<i>SPIN1</i>	0.5343
A_23_P373541	<i>DSPP</i>	0.5342
A_23_P47885	<i>LRIG3</i>	0.5339
A_24_P12059	<i>GYP A</i>	0.5337
A_24_P942441	<i>NRXN1</i>	0.5328
A_23_P85441	<i>IGSF9</i>	0.5323
A_24_P237757	<i>ZMYM2</i>	0.5322
A_24_P519651	<i>LOC729121</i>	0.532
A_24_P275199	<i>KCNC1</i>	0.5309
A_23_P253791	<i>CAMP</i>	0.5305
A_24_P257579	<i>EPB41L4A</i>	0.5304
A_23_P22761	<i>SHOX</i>	0.5303
A_23_P82567	<i>PRSS58</i>	0.5296
A_23_P413157	<i>CXorf58</i>	0.5293
A_23_P92467	<i>QRFPR</i>	0.529
A_32_P795513	<i>LMOD3</i>	0.529
A_24_P578571	<i>GFRAL</i>	0.5286
A_24_P102053	<i>OCN</i>	0.5277
A_23_P5301	<i>TFCP2L1</i>	0.5271
A_23_P92517	<i>TTC29</i>	0.527
A_24_P203298	<i>IQUB</i>	0.527
A_23_P250385	<i>HIST1H1B</i>	0.5265
A_23_P218784	<i>DDX17</i>	0.5254
A_23_P155931	<i>MEPE</i>	0.5251
A_23_P62336	<i>CPXCR1</i>	0.5249
A_24_P75917	<i>CCDC144A</i>	0.5247
A_23_P154420	<i>HOXD12</i>	0.5244
A_23_P320216	<i>FAM55D</i>	0.5243
A_23_P419760	<i>CRISP3</i>	0.5243
A_23_P126278	<i>CHIT1</i>	0.5239
A_23_P340868	<i>GLRA3</i>	0.5239
A_23_P60837	<i>PDE3A</i>	0.5223
A_32_P155666	<i>ECEL1</i>	0.5213
A_23_P386912	<i>UGT2B4</i>	0.5208
A_32_P191840	<i>LOC644662</i>	0.5204
A_23_P424051	<i>SLC25A48</i>	0.5203

Sondas	Genes	Fold change
A_24_P75220	<i>MAGI1</i>	0.5202
A_24_P693321	<i>LOC100190986</i>	0.5197
A_23_P17173	<i>TRIM43</i>	0.5193
A_23_P393099	<i>TFF3</i>	0.5184
A_23_P5685	<i>TBR1</i>	0.518
A_23_P102607	<i>CHD6</i>	0.5177
A_24_P58673	<i>REG4</i>	0.5175
A_23_P142070	<i>TSPAN16</i>	0.5173
A_23_P253542	<i>SMPX</i>	0.5167
A_24_P231010	<i>MOV10L1</i>	0.5164
A_24_P190873	<i>FAM163A</i>	0.5162
A_23_P303101	<i>PCDHGC4</i>	0.516
A_23_P328145	<i>FAM71D</i>	0.5152
A_24_P235783	<i>SF1</i>	0.5152
A_23_P127495	<i>BBOX1</i>	0.5151
A_23_P88767	<i>PLA2G10</i>	0.5133
A_23_P412508	<i>PDZD9</i>	0.5129
A_23_P389588	<i>TCF7L2</i>	0.5128
A_23_P377750	<i>FGF10</i>	0.5121
A_32_P173662	<i>CRISP2</i>	0.5107
A_32_P186226	<i>IPO7</i>	0.5098
A_23_P24493	<i>MMP8</i>	0.5097
A_23_P409462	<i>DCBLD1</i>	0.5095
A_23_P122924	<i>INHBA</i>	0.5093
A_23_P393025	<i>SPATA4</i>	0.5087
A_24_P100650	<i>C9orf11</i>	0.5079
A_23_P329945	<i>HIPK4</i>	0.5076
A_23_P134204	<i>FAM71F1</i>	0.5073
A_32_P87531	<i>DNAH14</i>	0.5072
A_23_P377839	<i>NCRNA00161</i>	0.5071
A_24_P239419	<i>EPM2A</i>	0.5071
A_23_P164596	<i>SIGLEC12</i>	0.506
A_23_P420610	<i>FCHO2</i>	0.506
A_24_P59459	<i>FAM38B</i>	0.5059
A_23_P86411	<i>MYO3A</i>	0.5056
A_23_P139192	<i>GNG3</i>	0.5051
A_32_P139738	<i>HERC2P4</i>	0.505
A_23_P384532	<i>CCDC11</i>	0.5046
A_23_P41713	<i>FAM71B</i>	0.5031
A_23_P429425	<i>ST6GAL2</i>	0.503
A_23_P121459	<i>THPO</i>	0.5022
A_32_P58872	<i>GSG1L</i>	0.5021
A_23_P130961	<i>ELANE</i>	0.5017
A_23_P97112	<i>SELE</i>	0.5017
A_24_P943922	<i>CACHD1</i>	0.5016
A_23_P90320	<i>ZNF221</i>	0.5011
A_23_P92928	<i>C6</i>	0.501
A_24_P204011	<i>FOXR1</i>	0.5009
A_23_P114314	<i>CDX4</i>	0.5008

Sondas	Genes	Fold change
A_23_P388220	<i>RALYL</i>	0.5002
A_23_P33093	<i>ST6GALNAC5</i>	0.5
A_23_P333951	<i>DNAH14</i>	0.4998
A_24_P115990	<i>AMHR2</i>	0.4988
A_23_P216812	<i>CDKN2B</i>	0.4983
A_23_P35148	<i>TAF13</i>	0.4981
A_23_P5064	<i>CADM4</i>	0.4979
A_23_P161458	<i>OLAH</i>	0.4974
A_23_P216376	<i>CNGB3</i>	0.4973
A_32_P193822	<i>ZC3H11A</i>	0.497
A_32_P70818	<i>PAX9</i>	0.4967
A_32_P13113	<i>FAM71C</i>	0.4956
A_23_P98070	<i>PDE6C</i>	0.4944
A_23_P380240	<i>CEACAM8</i>	0.4938
A_24_P91830	<i>SPANXN3</i>	0.4928
A_24_P353905	<i>MXRA8</i>	0.4924
A_23_P366376	<i>TDGF1</i>	0.4923
A_23_P217498	<i>GDPD2</i>	0.4913
A_23_P428329	<i>PTF1A</i>	0.4913
A_24_P463929	<i>LOC100507203</i>	0.4894
A_24_P223163	<i>NAF1</i>	0.4893
A_24_P36890	<i>RAP1GAP</i>	0.4882
A_23_P364324	<i>ABCA13</i>	0.4878
A_32_P314783	<i>LOC100131496</i>	0.4874
A_23_P96658	<i>CYorf15B</i>	0.4867
A_24_P320410	<i>IL9</i>	0.4865
A_24_P333326	<i>CTAGE5</i>	0.4859
A_23_P140009	<i>SLC10A2</i>	0.4858
A_23_P52430	<i>WNT8B</i>	0.4854
A_23_P143334	<i>MACROD2</i>	0.485
A_23_P165504	<i>TNPI</i>	0.4848
A_23_P335495	<i>ANO7</i>	0.4838
A_32_P402924	<i>LOC400794</i>	0.4836
A_24_P273756	<i>TP63</i>	0.4831
A_23_P208747	<i>PGLYRP1</i>	0.483
A_23_P137665	<i>CHI3L1</i>	0.4824
A_32_P225345	<i>C11orf88</i>	0.4824
A_23_P136870	<i>MAGEA6</i>	0.482
A_24_P88696	<i>SCG2</i>	0.482
A_23_P170888	<i>DPP6</i>	0.4818
A_32_P466877	<i>C3orf45</i>	0.4818
A_23_P83798	<i>ALX1</i>	0.4816
A_23_P357985	<i>RGPD6</i>	0.4798
A_24_P391868	<i>CPLX2</i>	0.4793
A_23_P402778	<i>TRIM40</i>	0.4775
A_32_P536872	<i>TDRD5</i>	0.4766
A_23_P152462	<i>STX1B</i>	0.4762
A_23_P58328	<i>ANXA10</i>	0.4751
A_23_P108082	<i>CREB3L3</i>	0.4749

Sondas	Genes	Fold change
A_24_P192988	<i>CCDC89</i>	0.4749
A_23_P373742	<i>TRIML1</i>	0.4747
A_23_P95453	<i>NRXN1</i>	0.4733
A_24_P941736	<i>ACSBG1</i>	0.4728
A_32_P115050	<i>LOC646576</i>	0.4722
A_23_P12392	<i>PTPRC</i>	0.4715
A_24_P165205	<i>MORN1</i>	0.4708
A_24_P206328	<i>PDE1C</i>	0.4684
A_32_P48134	<i>TPTE2P3</i>	0.4676
A_23_P368805	<i>HHLA2</i>	0.4668
A_32_P341615	<i>C9orf84</i>	0.4665
A_24_P355057	<i>SLC13A1</i>	0.4655
A_24_P365972	<i>LOC286359</i>	0.4639
A_23_P56404	<i>EN1</i>	0.4634
A_23_P318396	<i>CELF1</i>	0.4612
A_32_P74579	<i>GAS2L2</i>	0.4573
A_23_P218079	<i>SLC38A2</i>	0.4572
A_23_P377212	<i>MYEOV2</i>	0.4553
A_23_P68910	<i>SSTR3</i>	0.4553
A_24_P606538	<i>GGNBP1</i>	0.4511
A_23_P167250	<i>IL21</i>	0.4509
A_23_P140614	<i>LOC653061</i>	0.4505
A_23_P18152	<i>ATP2B2</i>	0.4505
A_23_P414519	<i>NRN1</i>	0.4503
A_23_P24966	<i>USP2</i>	0.4482
A_23_P43337	<i>FREM1</i>	0.4482
A_23_P218442	<i>CEACAM6</i>	0.4467
A_23_P150648	<i>KCNQ1DN</i>	0.4429
A_23_P138352	<i>WNT2B</i>	0.4414
A_24_P289208	<i>TFF3</i>	0.4401
A_23_P126349	<i>BARHL2</i>	0.4387
A_23_P59285	<i>GCM2</i>	0.4375
A_23_P64372	<i>TCN1</i>	0.4363
A_23_P166848	<i>LTF</i>	0.4358
A_23_P252082	<i>TMEM176A</i>	0.4319
A_24_P376120	<i>MYPN</i>	0.4309
A_24_P248741	<i>ZNF501</i>	0.4261
A_23_P377996	<i>RNF180</i>	0.4233
A_23_P305914	<i>WSCD2</i>	0.4215
A_24_P153820	<i>HYDIN</i>	0.4143
A_23_P24543	<i>FAM55A</i>	0.4139
A_23_P94275	<i>DKK4</i>	0.412
A_23_P157007	<i>TMEM176B</i>	0.407
A_24_P49106	<i>TCEAL7</i>	0.3972
A_24_P233078	<i>PYY2</i>	0.3869
A_23_P115467	<i>S100A5</i>	0.3775
A_24_P292470	<i>UCP3</i>	0.3686
A_24_P307289	<i>TMEM95</i>	0.3602

ANEXO E

Categoria	Processos Biológicos	p-value	Genes
GOTERM_BP_FAT	GO:0006952~defense response	1.52E-07	PGLYRP1, FOS, CCL3L3, HIST1H2BJ, IL1-B, LTF, CIITA, NFKBIZ, CRISP3, NCF2, CAMP, CD160, NLRP3, CD84, INHBA, SIGLEC1, CD83, PROK2, BPI, PPBP, LILRB5, DEFA4, DEFA3, CTSG, LALBA, CXCL1, TNF, CXCL3, C6, CLU, CXCL2, RSAD2, GPR68, DEFB127, CCL4, IL23A, CCL20, TFF3, PTX3, SCG2, PTPRC, IL5, CEBPB, RNASE3, IL8, OLR1, GABRA5, IL9, CYP4F11, COTL1, CD19, MPO, SELE
GOTERM_BP_FAT	GO:0009617~response to bacterium	6.03E-07	LALBA, TNF, PTGS2, PGLYRP1, NFKBIA, DEFB127, CHIT1, TRIB1, FOS, CCL20, HIST1H2BJ, ERAP1, LTF, IL1-B, THPO, RNASE3, SOCS3, CAMP, BPI, ADM, PPBP, DEFA4, DEFA3, SELE, CTSG
GOTERM_BP_FAT	GO:0006955~immune response	2.20E-05	PGLYRP1, SKAP1, CCL3L3, CEACAM8, IL1-B, ERAP1, LTF, CIITA, CRISP3, ICAM1, POU2AF1, NCF2, TNFRSF17, NLRP3, HLA-DQA2, OSM, CD83, BPI, LILRB5, PPBP, CTSG, CXCL1, HLA-DQB1, CPLX2, TNF, CXCL5, CXCL3, C6, CLU, CXCL2, RSAD2, DEFB127, PF4V1, CCL4, CHIT1, IL23A, CCL20, CD4, PTX3, HLA-DOA, PTPRC, IL5, CEBPB, IL8, OLR1, IGJ, IL9, GPI, ILF2, ETS1, CD300A
GOTERM_BP_FAT	GO:0051173~positive regulation of nitrogen compound metabolic process	3.27E-05	TNF, PDGFA, TBX21, PPM1A, FHL2, NFKBIA, SOX4, TP63, TCF7L2, SKAP1, FOS, EPC1, BLOC1S2, REL, PAX9, TDGF1, IL1-B, PTX3, MYC, TCF3, ALX1, SREBF1, CIITA, EGR1, ATF7IP, ICAM1, PTPRC, KLF6, CEBPB, EGR2, IL5, TBX3, MAFB, PTF1A, LEF1, TBR1, JUNB, OSM, INHBA, EP300, ILF2, EREG, ETS1, CSRNPI, PEBP1, CAND1, AREG, KLF2
GOTERM_BP_FAT	GO:0031328~positive regulation of cellular biosynthetic process	3.73E-05	PDGFA, TP63, SKAP1, FOS, EPC1, PAX9, TDGF1, IL1-B, MYC, ALX1, CIITA, EGR1, ATF7IP, ICAM1, EGR2, PTF1A, BARHL2, ELANE, LEF1, IL21, TBR1, JUNB, OSM, INHBA, EP300, EREG, CAND1, TNF, PPM1A, FHL2, SOX4, NFKBIA, TCF7L2, BLOC1S2, REL, CD4, PTX3, TCF3, SREBF1, KLF6, IL5, CEBPB, TBX3, MAFB, IL9, ILF2, ETS1, CSRNPI, AREG, KLF2
GOTERM_BP_FAT	GO:0010557~positive regulation of macromolecule biosynthetic process	4.80E-05	TNF, PDGFA, PPM1A, FHL2, NFKBIA, SOX4, TP63, TCF7L2, SKAP1, FOS, EPC1, BLOC1S2, REL, PAX9, TDGF1, IL1-B, CD4, MYC, TCF3, ALX1, SREBF1, CIITA, EGR1, ATF7IP, KLF6, CEBPB, EGR2, IL5, TBX3, MAFB, ELANE, IL9, PTF1A, BARHL2, LEF1, IL21, TBR1, JUNB, OSM, INHBA, EP300, ILF2, EREG, ETS1, CSRNPI, CAND1, AREG, KLF2
GOTERM_BP_FAT	GO:0009891~positive regulation of biosynthetic process	5.36E-05	PDGFA, TP63, SKAP1, FOS, EPC1, PAX9, TDGF1, IL1-B, MYC, ALX1, CIITA, EGR1, ATF7IP, ICAM1, EGR2, PTF1A, BARHL2, ELANE, LEF1, IL21, TBR1, JUNB, OSM, INHBA, EP300, EREG, CAND1, TNF, PPM1A, FHL2, SOX4, NFKBIA, TCF7L2, BLOC1S2, REL, CD4, PTX3, TCF3, SREBF1, KLF6, IL5, CEBPB, TBX3, MAFB, IL9, ILF2, ETS1, CSRNPI, AREG, KLF2
GOTERM_BP_FAT	GO:0008284~positive regulation of cell proliferation	9.82E-05	TNF, CXCL5, PTGS2, IL6ST, PDGFA, CLU, NAP1L1, FGF10, SOX4, TP63, OSR2, BLOC1S2, TDGF1, IL1-B, MYC, TCF3, THPO, SCG2, AGPAT1, PTPRC, IL5, TBX3, ELANE, IL9, IL21, CAPN1, OSM, VEGFB, CDKN1B, ATF3, EREG, ADM, MAB21L2, ALOX12

Categoria	Processos Biológicos	p-value	Genes
GOTERM_BP_FAT	GO:0051726~regulation of cell cycle	1.21E-04	TNF, PTGS2, MOV10L1, MYCBP2, CDKN2B, IL1-B, RANBP1, SIK1, MYC, TCF3, BUB3, PTPRC, PLA2G16, CCNK, TBX3, RINT1, PIM1, PDE3A, PIM3, JUNB, CDKN1C, OSM, INHBA, CDKN1B, EREG, ETS1, BAX, PEBP1, GADD45B
GOTERM_BP_FAT	GO:0045935~positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	2.54E-04	TNF, PDGFA, TBX21, PPM1A, FHL2, NFKBIA, SOX4, TP63, TCF7L2, SKAP1, FOS, EPC1, BLOC1S2, REL, PAX9, TDGF1, MYC, TCF3, ALX1, SREBF1, CIITA, EGR1, ATF7IP, PTPRC, KLF6, CEBPB, EGR2, IL5, TBX3, MAFB, PTF1A, LEF1, TBR1, JUNB, OSM, INHBA, EP300, EREG, ILF2, ETS1, CSRNPI, CAND1, AREG, KLF2
GOTERM_BP_FAT	GO:0045893~positive regulation of transcription, DNA-dependent	3.05E-04	TNF, PPM1A, NFKBIA, FHL2, SOX4, TP63, TCF7L2, SKAP1, FOS, EPC1, REL, PAX9, TDGF1, MYC, TCF3, ALX1, SREBF1, EGR1, CIITA, ATF7IP, KLF6, CEBPB, IL5, EGR2, TBX3, MAFB, LEF1, TBR1, JUNB, OSM, INHBA, EP300, ILF2, ETS1, CSRNPI, CAND1
GOTERM_BP_FAT	GO:0051254~positive regulation of RNA metabolic process	3.56E-04	TNF, PPM1A, NFKBIA, FHL2, SOX4, TP63, TCF7L2, SKAP1, FOS, EPC1, REL, PAX9, TDGF1, MYC, TCF3, ALX1, SREBF1, EGR1, CIITA, ATF7IP, KLF6, CEBPB, IL5, EGR2, TBX3, MAFB, LEF1, TBR1, JUNB, OSM, INHBA, EP300, ILF2, ETS1, CSRNPI, CAND1
GOTERM_BP_FAT	GO:0010604~positive regulation of macromolecule metabolic process	4.06E-04	IL6ST, PDGFA, TBX21, TP63, SKAP1, FOS, EPC1, PAX9, TDGF1, IL1-B, MYC, ALX1, ANAPC1, CIITA, EGR1, ATF7IP, EGR2, ELANE, PTF1A, BARHL2, LEF1, IL21, TBR1, JUNB, RNF180, OSM, INHBA, EP300, EREG, CAND1, TNF, PPM1A, SOX4, FHL2, NFKBIA, TCF7L2, BLOC1S2, REL, CD4, TCF3, SREBF1, KLF6, PTPRC, IL5, CEBPB, PLA2G10, TBX3, MAFB, IL9, ILF2, ETS1, CSRNPI, AREG, KLF2, SELE
GOTERM_BP_FAT	GO:0042742~defense response to bacterium	4.56E-04	LALBA, TNF, RNASE3, CAMP, PGLYRP1, DEFB127, BPI, CCL20, PPBP, HIST1H2BJ, DEFA4, DEFA3, LTF, CTSG
GOTERM_BP_FAT	GO:0006954~inflammatory response	5.02E-04	CXCL1, TNF, CXCL3, C6, CLU, CXCL2, GPR68, CCL4, FOS, IL23A, CCL20, CCL3L3, IL1-B, PTX3, SCG2, CIITA, NFKBIZ, IL5, CEBPB, IL8, OLR1, IL9, CYP4F11, NLRP3, SIGLEC1, PROK2, SELE
GOTERM_BP_FAT	GO:0009611~response to wounding	5.40E-04	CXCL1, TNF, PDGFA, C6, CXCL3, CLU, CXCL2, FGF10, GPR68, CCL4, FOS, IL23A, CCL20, GPIBB, CCL3L3, IL1-B, PTX3, SCG2, CIITA, NFKBIZ, KLF6, CEBPB, IL5, GATM, IL8, OLR1, IL9, CYP4F11, NLRP3, SIGLEC1, PROK2, ADM, EREG, BAX, PEBP1, DSP, ANXA8L2, SELE
GOTERM_BP_FAT	GO:0010033~response to organic substance	8.38E-04	RBP4, TNF, LDLR, PTGS2, IL6ST, PDGFA, NFKBIA, FHL2, HSPA1A, GRIN3A, EDEMI, MANF, TRIB1, SRRT, FOS, GSTM3, CDKN2B, CASP8, IL1-B, TFF3, RARA, CD4, CREB3L3, GNG3, MYC, THPO, CIITA, EGR1, EGR2, PFKL, GATM, SOCS3, LEF1, PDE3A, JUNB, RETN, CD83, EP300, BTG2, DUSP1, ADM, ID1, SQLE, PEBP1, IGFBP2, SELE, PPP1R15A
GOTERM_BP_FAT	GO:0045941~positive regulation of transcription	8.87E-04	TNF, PPM1A, NFKBIA, FHL2, SOX4, TP63, TCF7L2, SKAP1, FOS, EPC1, BLOC1S2, REL, PAX9, TDGF1, MYC, TCF3, ALX1, SREBF1, EGR1, CIITA, ATF7IP, KLF6, CEBPB, IL5, EGR2, TBX3, MAFB, PTF1A, LEF1, TBR1, JUNB, OSM, INHBA, EP300, ILF2, ETS1, CSRNPI, CAND1, KLF2
GOTERM_BP_FAT	GO:0010628~positive regulation of gene expression	0.001539315	TNF, PPM1A, NFKBIA, FHL2, SOX4, TP63, TCF7L2, SKAP1, FOS, EPC1, BLOC1S2, REL, PAX9, TDGF1, MYC, TCF3, ALX1, SREBF1, EGR1, CIITA, ATF7IP, KLF6, CEBPB, IL5, EGR2, TBX3, MAFB, PTF1A, LEF1, TBR1, JUNB, OSM, INHBA, EP300, ILF2, ETS1, CSRNPI, CAND1, KLF2

Categoria	Processos Biológicos	p-value	Genes
GOTERM_BP_FAT	GO:0045944~positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	0.001624206	TNF, NFKBIA, TP63, SKAP1, TCF7L2, EPC1, FOS, PAX9, TDGF1, MYC, TCF3, ALX1, EGR1, CIITA, SREBF1, KLF6, EGR2, CEBPB, MAFB, LEF1, TBR1, JUNB, OSM, INHBA, EP300, ETS1, CSRNPI, CAND1
GOTERM_BP_FAT	GO:0006935~chemotaxis	0.001640461	CXCL1, IL8, CXCL5, PDGFA, CXCL3, CXCL2, FGF10, CXCR3, CCL4, PROK2, PPBP, CCL20, CKLF, CCL3L3, IL1-B, SCG2
GOTERM_BP_FAT	GO:0042330~taxis	0.001640461	CXCL1, IL8, CXCL5, PDGFA, CXCL3, CXCL2, FGF10, CXCR3, CCL4, PROK2, PPBP, CCL20, CKLF, CCL3L3, IL1-B, SCG2
GOTERM_BP_FAT	GO:0050900~leukocyte migration	0.00166078	ICAM1, TNF, IL8, CXCL3, ELANE, CKLF, IL1-B, SELE, SCG2
GOTERM_BP_FAT	GO:0001568~blood vessel development	0.001681793	TBX3, IL8, CDX4, PDGFA, FGF10, NCL, TCF7L2, JUNB, ZFP36L1, PROK2, GPI, EREG, ID1, BAX, PLXDC1, TDGF1, CASP8, ERAP1, IL1-B, CEACAM1, SCG2
GOTERM_BP_FAT	GO:0045449~regulation of transcription	0.002228513	JDP2, HMGN2, CDX4, HOXD12, HIRA, FGF10, CBX3, REST, TCEAL7, ZNF254, EPC1, MIER1, TARDBP, TDGF1, IL1-B, RARA, OLIG1, CREB3L3, BCL7A, CIITA, POU2AF1, ZNF644, BARHL2, PIM1, ZNF501, FOXN2, TBR1, JUNB, EP300, PARP14, SHOX, VGLL4, NFE2L3, CRTC2, SUMO1P3, TFCEP2L1, SOX3, NFKBIA, SOX4, NR2C2, TRIM66, BLOC1S2, ELK4, ZNF326, TFEC, ZNF71, ZNF124, TCF3, SREBF1, KLF6, ZMYM2, IKZF3, MAFB, EN1, ZNF221, GCFC1, SAFB2, CDKN1C, GCM2, CDKN1B, ATF3, ETS1, CSRNPI, SUPT16H, KLF2, TBX21, ZNF12, TP63, ZNF518A, SKAP1, FOS, LBH, PAX9, ZNF727, SPIB, SIK1, MYC, ZNF493, ALX1, ATF7IP, EGR1, ICAM1, NFKBIZ, CTBP1, EGR3, CCNK, EGR2, PTF1A, DMRT1, SF1, LEF1, FOSB, NLRP3, FOXR1, MCM6, SARNP, OSM, INHBA, TAF13, BRWD1, BTG2, EREG, ZNF714, CAND2, CAND1, KCNH2, DPF2, IRX3, TNF, PPM1A, FHL2, TCF7L2, C5ORF41, MYCBP2, TRIB1, SUMO1, REL, CHD6, NFATC1, IL5, CEBPB, TBX3, L3MBTL3, TNPI, PHF10, ZNF664, IRF5, ZNF322A, ILF2, ID1, WHSCIL1
GOTERM_BP_FAT	GO:0001944~vasculature development	0.002244136	TBX3, IL8, CDX4, PDGFA, FGF10, NCL, TCF7L2, JUNB, ZFP36L1, PROK2, GPI, EREG, ID1, BAX, PLXDC1, TDGF1, CASP8, ERAP1, IL1-B, CEACAM1, SCG2
GOTERM_BP_FAT	GO:0007050~cell cycle arrest	0.002412528	CDKN1C, GAS2L3, INHBA, CDKN1B, MACF1, CDKN2B, IL8, GAS2L2, PPP1R15A, MYC, TCF7L2, TP53INP1
GOTERM_BP_FAT	GO:0042035~regulation of cytokine biosynthetic process	0.002418426	INHBA, CEBPB, TNF, REL, EREG, IL9, ELANE, IL1-B, CD4, IL21
GOTERM_BP_FAT	GO:0042108~positive regulation of cytokine biosynthetic process	0.002565328	TNF, REL, EREG, IL9, ELANE, IL1-B, CD4, IL21
GOTERM_BP_FAT	GO:0042127~regulation of cell proliferation	0.002782877	CXCL1, RBP4, TNF, CXCL5, PTGS2, IL6ST, PDGFA, CLU, NAPILI, NFKBIA, SOX4, TP63, FGF10, TRIB1, OSR2, CDKN2B, BLOC1S2, TDGF1, CCL3L3, IL1-B, MYC, TCF3, THPO, SCG2, AGPAT1, PTPRC, CTBP1, IL5, IL8, TBX3, ELANE, IL9, SF1, IL21, CAPN1, OSM, VEGFB, CDKN1C, SSTR3, CDKN1B, ATF3, BTG2, EREG, ADM, ETS1, BAX, MAB21L2, ALOX12
GOTERM_BP_FAT	GO:0006357~regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	0.003032418	JDP2, TNF, CDX4, TFCEP2L1, HIRA, FHL2, NFKBIA, TP63, ZNF254, TCF7L2, SKAP1, FOS, EPC1, PAX9, TDGF1, SPIB, SIK1, MYC, TCF3, ALX1, SREBF1, CIITA, EGR1, ATF7IP, KLF6, IKZF3, CTBP1, CEBPB, EGR2, TBX3, MAFB, BARHL2, LEF1, FOSB, TBR1, JUNB, OSM, CDKN1C, INHBA, BRWD1, EP300, ID1, ETS1, CSRNPI, CAND1

Categoria	Processos Biológicos	p-value	Genes
GOTERM_BP_FAT	GO:0006916~anti-apoptosis	0.003265785	IER3, TNF, CEBPB, TBX3, SOCS3, GFRAL, CLU, BCL2A1, NFKBIA, TP63, HSPA1A, TCF7L2, PROK2, BAX, MPO, IL1-B, MYC, ALOX12
GOTERM_BP_FAT	GO:0051384~response to glucocorticoid stimulus	0.0034746	FOS, TNF, EP300, PTGS2, DUSP1, ADM, PEBP1, IL1-B, IGFBP2, JUNB
GOTERM_BP_FAT	GO:0043066~negative regulation of apoptosis	0.003545067	IER3, TNF, CLU, SOX4, TP63, NFKBIA, HSPA1A, TCF7L2, TDGF1, IL1-B, MYC, SCG2, CEBPB, TBX3, SOCS3, GFRAL, BCL2A1, PIM1, PDE3A, PIM3, PROK2, GCM2, BTG2, BAX, MPO, ALOX12
GOTERM_BP_FAT	GO:0006928~cell motion	0.004105305	SHROOM2, TNF, PTGS2, CXCL3, CALD1, CXCR3, CCL4, MYCBP2, MACF1, ANK3, CKLF, IL1-B, TNN, CEACAM1, SCG2, ACTB, ICAM1, EGR2, PLA2G10, IL8, MDGA1, BARHL2, ELANE, TNPI, NRXN1, TBRI, ARPC1B, ID1, ETS1, BAX, SELE, ALOX12
GOTERM_BP_FAT	GO:0048514~blood vessel morphogenesis	0.00416959	IL8, PDGFA, FGF10, NCL, JUNB, ZFP36L1, PROK2, GPI, EREG, ID1, BAX, PLXDC1, TDGF1, CASP8, ERAP1, IL1-B, CEACAM1, SCG2
GOTERM_BP_FAT	GO:0043069~negative regulation of programmed cell death	0.004237002	IER3, TNF, CLU, SOX4, TP63, NFKBIA, HSPA1A, TCF7L2, TDGF1, IL1-B, MYC, SCG2, CEBPB, TBX3, SOCS3, GFRAL, BCL2A1, PIM1, PDE3A, PIM3, PROK2, GCM2, BTG2, BAX, MPO, ALOX12
GOTERM_BP_FAT	GO:0060548~negative regulation of cell death	0.004387555	IER3, TNF, CLU, SOX4, TP63, NFKBIA, HSPA1A, TCF7L2, TDGF1, IL1-B, MYC, SCG2, CEBPB, TBX3, SOCS3, GFRAL, BCL2A1, PIM1, PDE3A, PIM3, PROK2, GCM2, BTG2, BAX, MPO, ALOX12
GOTERM_BP_FAT	GO:0001817~regulation of cytokine production	0.005333642	CEBPB, TNF, IL6ST, IL9, ELANE, NLRP3, IL21, CD83, INHBA, BPI, REL, EREG, IL1-B, RARA, CD4, AGPAT1
GOTERM_BP_FAT	GO:0001525~angiogenesis	0.00568685	IL8, PDGFA, FGF10, NCL, GPI, PROK2, EREG, ID1, PLXDC1, CASP8, IL1-B, ERAP1, CEACAM1, SCG2
GOTERM_BP_FAT	GO:0020027~hemoglobin metabolic process	0.005931589	INHBA, ALAS2, EPB42, AHSP
GOTERM_BP_FAT	GO:0031960~response to corticosteroid stimulus	0.006161289	FOS, TNF, EP300, PTGS2, DUSP1, ADM, PEBP1, IL1-B, IGFBP2, JUNB
GOTERM_BP_FAT	GO:0009967~positive regulation of signal transduction	0.006563109	PTPRC, TNF, IL5, IL6ST, PPM1A, TP63, SOX4, FGF10, CDKN1C, OSM, ZDHHC17, CDKN2B, EREG, REL, PLK2, MIER1, CASP8, SEMA4C, PEBP1, IL1-B, CD4, AGPAT1
GOTERM_BP_FAT	GO:0042981~regulation of apoptosis	0.006965363	LALBA, DPF2, IER3, TNF, PTGS2, MMP9, C6, CLU, PPP3R1, NFKBIA, SOX4, TP63, HSPA1A, TCF7L2, PRUNE2, BLOC1S2, TDGF1, CASP8, IL1-B, NGFRAP1, MYC, SCG2, ARHGEF4, PTPRC, CEBPB, TBX3, GFRAL, SOCS3, BCL2A1, PIM1, PIM3, PDE3A, NLRP3, PPIF, INHBA, PROK2, GCM2, CDKN1B, SSTR3, BTG2, DUSP1, ETS1, BBC3, BAX, MPO, ALOX12, TP53INP1
GOTERM_BP_FAT	GO:0051090~regulation of transcription factor activity	0.007344563	ICAM1, SUMO1, IL5, TNF, EP300, SUMO1P3, ID1, PIM1, NFKBIA, IL1-B, NLRP3, TRIB1
GOTERM_BP_FAT	GO:0042326~negative regulation of phosphorylation	0.008027567	CDKN1C, INHBA, PTPRC, CDKN1B, CDKN2B, BAX, PEBP1

Categoria	Processos Biológicos	p-value	Genes
GOTERM_BP_FAT	GO:0043067~regulation of programmed cell death	0.008067452	LALBA, DPF2, IER3, TNF, PTGS2, MMP9, C6, CLU, PPP3R1, NFKBIA, SOX4, TP63, HSPA1A, TCF7L2, PRUNE2, BLOC1S2, TDGF1, CASP8, IL1-B, NGFRAP1, MYC, SCG2, ARHGEF4, PTPRC, CEBPB, TBX3, GFRAL, SOCS3, BCL2A1, PIM1, PIM3, PDE3A, NLRP3, PPIF, INHBA, PROK2, GCM2, CDKN1B, SSTR3, BTG2, DUSP1, ETS1, BBC3, BAX, MPO, ALOX12, TP53INP1
GOTERM_BP_FAT	GO:0010941~regulation of cell death	0.008702601	LALBA, DPF2, IER3, TNF, PTGS2, MMP9, C6, CLU, PPP3R1, NFKBIA, SOX4, TP63, HSPA1A, TCF7L2, PRUNE2, BLOC1S2, TDGF1, CASP8, IL1-B, NGFRAP1, MYC, SCG2, ARHGEF4, PTPRC, CEBPB, TBX3, GFRAL, SOCS3, BCL2A1, PIM1, PIM3, PDE3A, NLRP3, PPIF, INHBA, PROK2, GCM2, CDKN1B, SSTR3, BTG2, DUSP1, ETS1, BBC3, BAX, MPO, ALOX12, TP53INP1
GOTERM_BP_FAT	GO:0030540~female genitalia development	0.00881776	RBP4, TBX3, TP63
GOTERM_BP_FAT	GO:0048660~regulation of smooth muscle cell proliferation	0.008932384	TNF, PTGS2, EREG, ELANE, SF1, TRIB1, AGPAT1
GOTERM_BP_FAT	GO:0050865~regulation of cell activation	0.009403292	PTPRC, IL5, PLA2G10, PDGFA, IL6ST, TBX21, IL21, CD83, INHBA, BPI, IL1-B, CD4, RARA, HLA-DOA, TCF3
GOTERM_BP_FAT	GO:0032496~response to lipopolysaccharide	0.010683025	FOS, PTGS2, ADM, SOCS3, NFKBIA, IL1-B, SELE, THPO, TRIB1
GOTERM_BP_FAT	GO:0034728~nucleosome organization	0.010932811	HIST1H1C, HIST1H1B, HIST1H2AD, HIST1H2AE, HIST1H2BJ, NAP1L1, SUPT16H, HIST1H4E, TNPI, H1FX
GOTERM_BP_FAT	GO:0010563~negative regulation of phosphorus metabolic process	0.010956796	CDKN1C, INHBA, PTPRC, CDKN1B, CDKN2B, BAX, PEBP1
GOTERM_BP_FAT	GO:0045936~negative regulation of phosphate metabolic process	0.010956796	CDKN1C, INHBA, PTPRC, CDKN1B, CDKN2B, BAX, PEBP1
GOTERM_BP_FAT	GO:0010647~positive regulation of cell communication	0.01102327	PTPRC, TNF, IL5, PTGS2, IL6ST, PPM1A, FGF10, TP63, SOX4, CDKN1C, OSM, ZDHHC17, CDKN2B, EREG, REL, PLK2, MIER1, CASP8, SEMA4C, PEBP1, IL1-B, CD4, AGPAT1
GOTERM_BP_FAT	GO:0007610~behavior	0.011068435	CXCL1, PTGS2, CXCL5, PDGFA, CXCL3, CXCL2, PGLYRP1, FGF10, CXCR3, CCL4, ATP2B2, FOS, HCRT1, CCL20, CCL3L3, CKLF, IL1-B, CHAT, SCG2, EGR1, EGR2, IL8, EPM2A, GABRA5, FOSB, OSM, PROK2, PPBP, C7ORF16, PEBP1
GOTERM_BP_FAT	GO:0051252~regulation of RNA metabolic process	0.01118047	JDP2, HMGN2, CDX4, TBX21, HOXD12, HIRA, ZNF12, TP63, CBX3, REST, ZNF254, SKAP1, EPC1, FOS, PAX9, ZNF727, TDGF1, RARA, SPIB, CREB3L3, SIK1, MYC, ZNF493, ALX1, ATF7IP, EGR1, CIITA, ZFP36, CTBP1, EGR2, PTF1A, BARHL2, DMRT1, LEF1, FOXN2, FOSB, TBR1, JUNB, FOXR1, OSM, SARNP, INHBA, BRWD1, EP300, ZNF714, SHOX, CAND1, NFE2L3, KCNH2, IRX3, TNF, TFCP2L1, PPM1A, SOX4, NFKBIA, FHL2, TCF7L2, C5ORF41, NR2C2, ZFP36L1, ZFP36L2, RPS26, TRIM66, REL, ELK4, HNRNPF, ZNF71, ZNF124, CHD6, TCF3, NFATC1, SREBF1, KLF6, IKZF3, CEBPB, IL5, TBX3, MAFB, TNPI, EN1, ZNF221, GCFC1, CDKN1C, GCM2, CDKN1B, ATF3, ILF2, IRF5, ETS1, ID1, CSRNPI

Categoria	Processos Biológicos	p-value	Genes
GOTERM_BP_FAT	GO:0006333~chromatin assembly or disassembly	0.011612887	HIST1H1C, HIST1H1B, HIST1H2AD, HIST1H2AE, HIST1H2BJ, NAP1L1, SUPT16H, HIST1H4E, CBX3, TNP1, H1FX, CHD6
GOTERM_BP_FAT	GO:0034097~response to cytokine stimulus	0.01237656	CIITA, FOS, PTGS2, CDKN2B, SOCS3, IL6ST, CASP8, SELE, JUNB
GOTERM_BP_FAT	GO:0009991~response to extracellular stimulus	0.013597025	SREBF1, RBP4, GATM, PTGS2, STC2, SOCS3, PDGFA, IL6ST, AXL, ASGR1, FOS, DUSP1, CDKN2B, ADM, IL1-B, RARA, IGFBP2
GOTERM_BP_FAT	GO:0055066~di-, tri-valent inorganic cation homeostasis	0.013708867	PTPRC, EPB42, IL6ST, ELANE, CXCR3, ANXA7, ATP2B2, PROK2, GCM2, ALAS2, ADM, SLC24A3, BAX, LTF, IL1-B, GNG3, CUTC, MYC
GOTERM_BP_FAT	GO:0008283~cell proliferation	0.01389099	CXCL1, RBP4, PDGFA, FGF10, TP63, MOV10L1, TCF7L2, NR2C2, ANXA7, ZFP36L2, SRRT, IL23A, CKLF, MYC, BUB3, THPO, PTPRC, PIM1, CD160, TNFRSF17, CDK3, VEGFB, OSM, PROK2, EREG, TACSTD2, BAX, AREG
GOTERM_BP_FAT	GO:0051094~positive regulation of developmental process	0.014105601	PTPRC, IRX3, TNF, IL5, MSRI, PLA2G10, SOCS3, IL6ST, CLU, HPS4, IL21, JUNB, CD83, INHBA, CDKN2B, ETS1, BAX, ERAP1, IL1-B, RARA
GOTERM_BP_FAT	GO:0051251~positive regulation of lymphocyte activation	0.014164097	CD83, PTPRC, IL5, IL6ST, TBX21, IL1-B, RARA, CD4, IL21, TCF3
GOTERM_BP_FAT	GO:0002694~regulation of leukocyte activation	0.01422976	PTPRC, IL5, PLA2G10, IL6ST, TBX21, IL21, INHBA, CD83, BPI, IL1-B, CD4, RARA, HLA-DOA, TCF3
GOTERM_BP_FAT	GO:0000288~nuclear-transcribed mRNA catabolic process, deadenylation-dependent decay	0.014314187	ZFP36, ZFP36L1, ZFP36L2
GOTERM_BP_FAT	GO:0003006~reproductive developmental process	0.01581599	AMHR2, RBP4, PTGS2, TBX3, SOX3, SF1, DMRT1, TP63, TNP1, PDE3A, MOV10L1, TCF7L2, JUNB, NR2C2, INHBA, EREG, BAX, PEBP1, CELF1
GOTERM_BP_FAT	GO:0045767~regulation of anti-apoptosis	0.015983932	DUSP1, BTG2, ADM, IL6ST, BAX, RARA
GOTERM_BP_FAT	GO:0051253~negative regulation of RNA metabolic process	0.016638248	EGR1, ATF7IP, CIITA, JDP2, CTBP1, TNF, TBX3, CDX4, TFCP2L1, LEF1, TNP1, TP63, CBX3, REST, FOSB, ZNF254, CDKN1C, EPC1, RPS26, TRIM66, CDKN1B, ID1, SIK1, ALX1
GOTERM_BP_FAT	GO:0045444~fat cell differentiation	0.017396722	RETN, CTBP1, CEBPB, RGS2, NOC3L, ERAP1, TCF7L2
GOTERM_BP_FAT	GO:0051781~positive regulation of cell division	0.017757874	OSM, VEGFB, PPBP, EREG, PDGFA, IL1-B
GOTERM_BP_FAT	GO:0051098~regulation of binding	0.017889683	ICAM1, IL5, TNF, SUMO1P3, CALD1, PIM1, NFKBIA, NLRP3, TRIB1, SUMO1, EP300, ID1, BAX, IL1-B
GOTERM_BP_FAT	GO:0032355~response to estradiol stimulus	0.018941398	PTGS2, DUSP1, PDGFA, SOCS3, IL1-B, RARA, IGFBP2
GOTERM_BP_FAT	GO:0048545~response to steroid hormone stimulus	0.019813703	TNF, PTGS2, LDLR, SOCS3, PDGFA, JUNB, FOS, GSTM3, EP300, ADM, DUSP1, PEBP1, IL1-B, RARA, IGFBP2
GOTERM_BP_FAT	GO:0002237~response to molecule of bacterial origin	0.019866059	FOS, PTGS2, ADM, SOCS3, NFKBIA, IL1-B, SELE, THPO, TRIB1

Categoria	Processos Biológicos	p-value	Genes
GOTERM_BP_FAT	GO:0045637~regulation of myeloid cell differentiation	0.019964496	ZFP36, INHBA, IL5, TNF, ETS1, MAFB, HIST1H4E, NFKBIA
GOTERM_BP_FAT	GO:0051101~regulation of DNA binding	0.021148201	ICAM1, SUMO1, IL5, TNF, EP300, SUMO1P3, ID1, PIM1, NFKBIA, IL1-B, NLRP3, TRIB1
GOTERM_BP_FAT	GO:0009612~response to mechanical stimulus	0.022306019	ATP2B2, FOS, TNF, BTG2, IGFBP2, MYC, JUNB
GOTERM_BP_FAT	GO:0007159~leukocyte adhesion	0.023033897	ICAM1, PTPRC, TNF, OLR1, SELE
GOTERM_BP_FAT	GO:0002696~positive regulation of leukocyte activation	0.023937577	CD83, PTPRC, IL5, IL6ST, TBX21, IL1-B, RARA, CD4, IL21, TCF3
GOTERM_BP_FAT	GO:0045787~positive regulation of cell cycle	0.024130164	TNF, TBX3, EREG, PIM1, PEBP1, IL1-B, TCF3
GOTERM_BP_FAT	GO:0045892~negative regulation of transcription, DNA-dependent	0.024931596	EGR1, ATF7IP, CIITA, JDP2, CTBP1, TNF, TBX3, CDX4, TFCEP2L1, LEF1, TNF1, TP63, CBX3, REST, FOSB, ZNF254, CDKN1C, EPC1, TRIM66, CDKN1B, ID1, SIK1, ALX1
GOTERM_BP_FAT	GO:0001819~positive regulation of cytokine production	0.025363151	CD83, TNF, EREG, IL6ST, IL1-B, RARA, IL21, NLRP3, AGPAT1
GOTERM_BP_FAT	GO:0006402~mRNA catabolic process	0.026136694	ZFP36, ZFP36L1, ZFP36L2, DCP1B, SMG1, HSPA1A
GOTERM_BP_FAT	GO:0002684~positive regulation of immune system process	0.026448207	PTPRC, ICAM1, IL5, IL6ST, TBX21, C6, CLU, NFKBIA, IL21, SKAP1, CD83, CD19, EREG, IL1-B, RARA, CD4, TCF3
GOTERM_BP_FAT	GO:0010629~negative regulation of gene expression	0.026575856	JDP2, TNF, SUMO1P3, CDX4, TFCEP2L1, TP63, CBX3, REST, ZNF254, EPC1, SRRT, SUMO1, TRIM66, SIK1, BCL7A, MYC, ALX1, EGR1, CIITA, ATF7IP, CTBP1, TBX3, LEF1, TNF1, FOSB, CDKN1C, CDKN1B, EREG, ID1, BAX, CELF1
GOTERM_BP_FAT	GO:0006030~chitin metabolic process	0.028524795	CHI3L1, CTBS, CHIT1
GOTERM_BP_FAT	GO:0006032~chitin catabolic process	0.028524795	CHI3L1, CTBS, CHIT1
GOTERM_BP_FAT	GO:0035112~genitalia morphogenesis	0.028524795	RBP4, TP63, TCF7L2
GOTERM_BP_FAT	GO:0045638~negative regulation of myeloid cell differentiation	0.028994887	ZFP36, INHBA, MAFB, HIST1H4E, NFKBIA
GOTERM_BP_FAT	GO:0007568~aging	0.029543138	FOS, TBX3, ADM, SOCS3, TFCEP2L1, PEBP1, IL1-B, TP63, IGFBP2, AGPAT1
GOTERM_BP_FAT	GO:0006355~regulation of transcription, DNA-dependent	0.03038912	JDP2, HMGN2, CDX4, TBX21, HOXD12, HIRA, CBX3, ZNF12, TP63, REST, ZNF254, SKAP1, EPC1, FOS, PAX9, ZNF727, TDGF1, RARA, SPIB, CREB3L3, SIK1, MYC, ZNF493, ALX1, ATF7IP, EGR1, CIITA, CTBP1, EGR2, PTF1A, BARHL2, DMRT1, LEF1, FOXN2, FOSB, TBRI, JUNB, FOXR1, OSM, SARNP, INHBA, BRWD1, EP300, ZNF714, SHOX, CAND1, NFE2L3, KCNH2, IRX3, TNF, TFCEP2L1, PPM1A, SOX4, NFKBIA, FHL2, TCF7L2, C5ORF41, NR2C2, TRIM66, REL, ELK4, ZNF71, ZNF124, CHD6, TCF3, NFATC1, SREBF1, KLF6, IKZF3, CEBPB, IL5, TBX3, MAFB, TNF1, EN1, ZNF221, GCFC1, CDKN1C, GCM2, CDKN1B, ATF3, ILF2, IRF5, ETS1, ID1, CSRNPI
GOTERM_BP_FAT	GO:0050867~positive regulation of cell activation	0.031076725	CD83, PTPRC, IL5, IL6ST, TBX21, IL1-B, RARA, CD4, IL21, TCF3

Categoria	Processos Biológicos	p-value	Genes
GOTERM_BP_FAT	GO:0043433~negative regulation of transcription factor activity	0.031132949	SUMO1, SUMO1P3, ID1, PIM1, NFKBIA, NLRP3, TRIB1
GOTERM_BP_FAT	GO:0030593~neutrophil chemotaxis	0.031935924	IL8, CXCL3, CKLF, IL1-B
GOTERM_BP_FAT	GO:0051249~regulation of lymphocyte activation	0.032200849	CD83, INHBA, PTPRC, IL5, IL6ST, TBX21, IL1-B, RARA, CD4, HLA-DOA, IL21, TCF3
GOTERM_BP_FAT	GO:0048661~positive regulation of smooth muscle cell proliferation	0.032286845	TNF, PTGS2, EREG, ELANE, AGPAT1
GOTERM_BP_FAT	GO:0010035~response to inorganic substance	0.032385469	ACTB, GATM, PTGS2, OLR1, PDGFA, LEF1, FOS, SRRT, EP300, UCP3, DUSP1, MPO, PEBP1, IGFBP2, ND6
GOTERM_BP_FAT	GO:0010740~positive regulation of protein kinase cascade	0.0326303	PTPRC, IL5, TNF, IL6ST, PPM1A, OSM, ZDHHC17, REL, PLK2, MIER1, CASP8, SEMA4C, IL1-B
GOTERM_BP_FAT	GO:0009725~response to hormone stimulus	0.03343646	RBP4, TNF, EGR2, LDLR, GATM, PTGS2, SOCS3, PDGFA, FHL2, JUNB, RETN, FOS, GSTM3, EP300, DUSP1, BTG2, ADM, PEBP1, IL1-B, TFF3, RARA, GNG3, IGFBP2
GOTERM_BP_FAT	GO:0043065~positive regulation of apoptosis	0.034073948	DPF2, LALBA, TNF, PTGS2, C6, MMP9, PPP3R1, SOX4, TP63, PRUNE2, CASP8, IL1-B, NGFRAP1, MYC, ARHGEF4, PTPRC, CEBPB, NLRP3, INHBA, CDKN1B, SSTR3, DUSP1, BBC3, ETS1, BAX, TP53INP1
GOTERM_BP_FAT	GO:0030005~cellular di-, tri-valent inorganic cation homeostasis	0.03512816	PTPRC, IL6ST, ELANE, CXCR3, ANXA7, ATP2B2, PROK2, GCM2, ALAS2, ADM, SLC24A3, BAX, IL1-B, LTF, GNG3, MYC
GOTERM_BP_FAT	GO:0043068~positive regulation of programmed cell death	0.036250673	DPF2, LALBA, TNF, PTGS2, C6, MMP9, PPP3R1, SOX4, TP63, PRUNE2, CASP8, IL1-B, NGFRAP1, MYC, ARHGEF4, PTPRC, CEBPB, NLRP3, INHBA, CDKN1B, SSTR3, DUSP1, BBC3, ETS1, BAX, TP53INP1
GOTERM_BP_FAT	GO:0051302~regulation of cell division	0.036689439	OSM, VEGFB, PPBP, EREG, PDGFA, IL1-B
GOTERM_BP_FAT	GO:0035272~exocrine system development	0.036843728	TFCP2L1, PTF1A, SOX4, FGF10
GOTERM_BP_FAT	GO:0030177~positive regulation of Wnt receptor signaling pathway	0.037054294	PPM1A, SOX4, FGF10
GOTERM_BP_FAT	GO:0006350~transcription	0.037493294	JDP2, CDX4, HIRA, HOXD12, CBX3, REST, TCEAL7, ZNF254, EPC1, MIER1, TARDBP, RARA, OLIG1, CREB3L3, CHTA, POU2AF1, ZNF644, BARHL2, ZNF501, FOXN2, SPOCD1, TBR1, JUNB, EP300, PARP14, SHOX, VGLL4, NFE2L3, CRT2, TFCP2L1, SOX3, SOX4, NR2C2, ZNF326, TFEC, ZNF124, ZNF71, TCF3, SREBF1, KLF6, ZMYM2, IKZF3, MAFB, ZNF221, SAFB2, GCFC1, GCM2, ATF3, ETS1, CSRNPI, SUPT16H, KLF2, TBX21, ZNF12, TP63, ZNF518A, PTMA, LBH, PAX9, ZNF727, SPIB, MYC, ZNF493, ALX1, EGR1, ATF7IP, NFKBIZ, EGR3, CCNK, EGR2, PTF1A, DMRT1, SF1, LEF1, FOXR1, MCM6, SARNP, TAF13, BRWD1, EREG, BTG2, ZNF714, CAND2, CAND1, DPF2, FHL2, TCF7L2, MYCBP2, REL, CHD6, NFATC1, CEBPB, TBX3, PHF10, ZNF664, ILF2, IRF5, ZNF322A, WHSC1L1
GOTERM_BP_FAT	GO:0010942~positive regulation of cell death	0.038341245	DPF2, LALBA, TNF, PTGS2, C6, MMP9, PPP3R1, SOX4, TP63, PRUNE2, CASP8, IL1-B, NGFRAP1, MYC, ARHGEF4, PTPRC, CEBPB, NLRP3, INHBA, CDKN1B, SSTR3, DUSP1, BBC3, ETS1, BAX, TP53INP1

Categoria	Processos Biológicos	p-value	Genes
GOTERM_BP_FAT	GO:0032526~response to retinoic acid	0.039501282	RBP4, DUSP1, PDGFA, RARA, IGFBP2
GOTERM_BP_FAT	GO:0035282~segmentation	0.039681607	EP300, EGR2, TBX3, MAFB, TDGF1, LEF1
GOTERM_BP_FAT	GO:0030182~neuron differentiation	0.040787615	TUBB2A, CLU, GRIN3A, MYCBP2, DFNB31, ATP2B2, MACF1, ANK3, OLIG1, TNN, CHAT, ACTB, EGR2, CEBPB, PLA2G10, MDGA1, PTF1A, BARHL2, EN1, NRXN1, TBR1, CDKN1C, NCAM2, ADM, BTG2, IGSF9
GOTERM_BP_FAT	GO:0006401~RNA catabolic process	0.0423593	ZFP36, ZFP36L1, ZFP36L2, RNASE3, DCP1B, SMG1, HSPA1A
GOTERM_BP_FAT	GO:0007626~locomotory behavior	0.043489508	CXCL1, IL8, CXCL5, PDGFA, CXCL3, CXCL2, FGF10, CXCR3, CCL4, ATP2B2, PROK2, PPBP, CCL20, CKLF, CCL3L3, IL1-B, CHAT, SCG2
GOTERM_BP_FAT	GO:0046883~regulation of hormone secretion	0.045113287	OSM, INHBA, RBP4, TNF, PFKL, IL1-B, TCF7L2
GOTERM_BP_FAT	GO:0033273~response to vitamin	0.045113287	RBP4, PTGS2, DUSP1, PDGFA, IL1-B, RARA, IGFBP2
GOTERM_BP_FAT	GO:0007281~germ cell development	0.045738435	RBP4, EREG, BAX, PEBP1, TNPI, PDE3A, MOV10L1, CELF1, NR2C2
GOTERM_BP_FAT	GO:0010876~lipid localization	0.046239955	RBP4, OSBP2, MSRI, TNF, LDLR, PLA2G10, PITPNA, ATP9A, CLU, IL1-B, APOL6, SCP2
GOTERM_BP_FAT	GO:0048584~positive regulation of response to stimulus	0.046665644	PTPRC, TNF, IL8, IL6ST, C6, CLU, NFKBIA, FGF10, IL21, SKAP1, OSM, CD19, EREG, SEMA4C, IL1-B, SCG2
GOTERM_BP_FAT	GO:0006334~nucleosome assembly	0.047472127	HIST1H1C, HIST1H1B, HIST1H2AD, HIST1H2AE, HIST1H2BJ, NAP1L1, HIST1H4E, H1FX
GOTERM_BP_FAT	GO:0031016~pancreas development	0.047559879	CLU, PTF1A, SOX4, FGF10, TCF7L2
GOTERM_BP_FAT	GO:0000956~nuclear-transcribed mRNA catabolic process	0.047559879	ZFP36, ZFP36L1, ZFP36L2, DCP1B, SMG1
GOTERM_BP_FAT	GO:0006026~aminoglycan catabolic process	0.047739517	PGLYRP1, CHI3L1, CTBS, CHIT1
GOTERM_BP_FAT	GO:0045429~positive regulation of nitric oxide biosynthetic process	0.047739517	ICAM1, TNF, IL1-B, PTX3
GOTERM_BP_FAT	GO:0001836~release of cytochrome c from mitochondria	0.047739517	BBC3, BAX, CLU, MYC
GOTERM_BP_FAT	GO:0031667~response to nutrient levels	0.04814378	SREBF1, RBP4, GATM, PTGS2, STC2, SOCS3, PDGFA, IL6ST, ADM, CDKN2B, DUSP1, IL1-B, RARA, IGFBP2
GOTERM_BP_FAT	GO:0033043~regulation of organelle organization	0.048221197	SHROOM2, TNF, PDGFA, VILI, NEXN, NEBL, MYCBP2, ARPC1B, CDKN1B, MACF1, EREG, PEBP1, IL1-B, RANBP1, MYC
GOTERM_BP_FAT	GO:0008285~negative regulation of cell proliferation	0.048479912	CXCL1, RBP4, CTBP1, TNF, IL8, PTGS2, SF1, FGF10, TRIB1, CDKN1C, OSM, SSTR3, CDKN1B, CDKN2B, BTG2, EREG, ADM, ETS1, BAX, CCL3L3, IL1-B, SCG2
GOTERM_BP_FAT	GO:0043392~negative regulation of DNA binding	0.049526215	SUMO1, SUMO1P3, ID1, PIM1, NFKBIA, NLRP3, TRIB1
GOTERM_BP_FAT	GO:0014070~response to organic cyclic substance	0.049535255	CD83, FOS, PTGS2, CDKN2B, BTG2, SOCS3, PEBP1, LEF1, IL1-B, JUNB

ANEXO F

Categoria	Vias biológicas	<i>p</i> - value	Genes
KEGG_PATHWAY	<i>hsa04060:Cytokine-cytokine receptor interaction</i>	4.50E-05	<i>CXCL1, TNF, CXCL5, PDGFA, IL6ST, CXCL3, CXCL2, CXCR3, PF4V1, CCL4, IL23A, CCL20, CCL3L3, IL1-B, AMHR2, IL5, IL8, IL9, TNFRSF17, IL21, VEGFB, GH2, OSM, INHBA, PPBP, IL3RA</i>
KEGG_PATHWAY	<i>hsa05310:Asthma</i>	8.93E-04	<i>HLA-DQB1, IL5, TNF, RNASE3, IL9, HLA-DOA, HLA-DQA2</i>
KEGG_PATHWAY	<i>hsa05200:Pathways in cancer</i>	0.003142	<i>PTGS2, PDGFA, MMP9, FGF10, NFKBIA, TCF7L2, MMP1, FOS, CDKN2B, CASP8, RARA, MYC, WNT8B, CTBP1, IL8, LEF1, RALGDS, WNT2B, VEGFB, JUP, CDKN1B, EP300, LAMA3, ETS1, BAX</i>
KEGG_PATHWAY	<i>hsa05322:Systemic lupus erythematosus</i>	0.006392	<i>HLA-DQB1, TNF, C6, HIST1H2AD, HIST1H2AE, HIST1H2BJ, ELANE, HIST1H4E, HLA-DOA, HLA-DQA2, CTSG</i>
KEGG_PATHWAY	<i>hsa04621:NOD-like receptor signaling pathway</i>	0.011997	<i>CXCL1, TNF, IL8, CXCL2, CASP8, NFKBIA, IL1-B, NLRP3</i>
KEGG_PATHWAY	<i>hsa05020:Prion diseases</i>	0.012523	<i>EGR1, NCAM2, C6, BAX, IL1-B, HSPA1A</i>
KEGG_PATHWAY	<i>hsa04514:Cell adhesion molecules (CAMs)</i>	0.01742	<i>HLA-DQB1, ICAM1, NCAM2, ITGA9, SIGLEC1, PTPRC, OCLN, CD4, NRXN1, HLA-DOA, SELE, HLA-DQA2</i>
KEGG_PATHWAY	<i>hsa04640:Hematopoietic cell lineage</i>	0.022366	<i>IL5, TNF, CD19, GP1BB, GYP A, IL1-B, CD4, IL3RA, THPO</i>
KEGG_PATHWAY	<i>hsa04630:Jak-STAT signaling pathway</i>	0.022568	<i>IL5, SOCS3, IL6ST, IL9, PIM1, IL21, CISH, GH2, OSM, EP300, IL23A, MYC, IL3RA</i>