



AMANDA VANSAN MARANGON

IMPORTÂNCIA DOS GENES *KIR* E GENES DE CITOCINAS NO
LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B

CAMPINAS

2014

i



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

AMANDA VANSAN MARANGON

IMPORTÂNCIA DOS GENES *KIR* E GENES DE CITOCINAS NO
LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B

ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. CARMINO ANTONIO DE SOUZA

CO-ORIENTAÇÃO: Prof. Dra. JEANE ELIETE LAGUILA VISENTAINER

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Doutora em Clínica Médica na área de concentração Clínica Médica.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA POR
AMANDA VANSAN MARANGON E ORIENTADA PELO
PROF. DR. CARMINO ANTONIO DE SOUZA

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2014

iii

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

M325i Marangon, Amanda Vansan, 1985-
Importância dos genes *KIR* e dos genes de citocinas no Linfoma difuso de grandes células B / Amanda Vansan Marangon. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Carmino Antonio de Souza.

Coorientador: Jeane Eliete Laguila Visentainer.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Receptores *KIR*. 2. Linfoma difuso de grandes células B. 3. Citocinas. 4. Células matadoras naturais. I. Souza, Carmino Antonio de, 1951-. II. Visentainer, Jeane Eliete Laguila. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Importance of *KIR* genes and cytokine genes in diffuse large B cell lymphoma

Palavras-chave em inglês:

KIR receptors

Diffuse Large-Cell lymphoma

Cytokines

Natural killer cells

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Clínica Médica

Banca examinadora:

Carmino Antonio de Souza [Orientador]

Ana Maria Sell

Luiza Tamie Tsuneto

Erich Vinicius de Paula

Carmen Silvia Passos Lima

Data de defesa: 25-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

AMANDA VANSAN MARANGON

ORIENTADOR: PROF. DR. CARMINO ANTONIO DE SOUZA

COORDINADORA: PROF. DR. JEANE ELIETE LAGUILA VISENTAINER

MEMBROS:

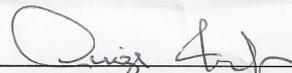
1. PROF. DR. CARMINO ANTONIO DE SOUZA



2. PROF. DR. ANA MARIA SELL

Ana Maria Sell

3. PROF. DR. LUIZA TAMIE TSUNETO



4. PROF. DR. ERICH VINICIUS DE PAULA



5. PROF. DR. CARMEN SILVIA PASSOS LIMA



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 25 de fevereiro de 2014

DEDICATÓRIA(S)

Dedico este trabalho aos meus pais: Roberto e Edna, que tantas vezes desistiram dos próprios sonhos para que eu pudesse realizar os meus. A vocês todo o meu amor e a minha gratidão.

AGRADECIMENTO(S)

Agradeço primeiramente a Deus, pela saúde, sabedoria e por ser tão generoso comigo;

Ao Dr. Cármino Antônio de Souza, orientador e incentivador, pela confiança transmitida ao longo desses quatro anos;

Aos meus pais: Roberto Miguel Marangon e Edna Maria Vansan Marangon, e a minha irmã Aline Vansan Marangon, pelo apoio, amor e carinho. Sem vocês, com certeza, eu não teria conseguido;

Ao meu marido Fábio, pelo amor, dedicação, paciência e compreensão nos momentos difíceis e por estar ao meu lado em todos os momentos importantes da minha vida;

A minha querida co-orientadora Jeane que em todos esses anos de convivência sempre me apoiou, me ensinou e incentivou, pela grande amizade, praticidade em resolver os meus problemas e pela prontidão em me ajudar e me ouvir nos momentos difíceis. Ainda, pela correção e adequação deste trabalho;

Ao Dr. José Francisco Penteado Aranha pelos momentos engraçados na co-orientação do trabalho, e por estimular o meu lado criativo e questionador;

A Dra Márcia Torresan Delamain que muito generosamente me ajudou a coletar as amostras dos pacientes e foi responsável direta pela coleta dos dados clínicos, indispensáveis para a realização deste estudo;

A toda Equipe do Laboratório Especializado do Caism, principalmente ao Dr. Fernando Guimarães pelas nossas discussões, pelo companheirismo, pelos ensinamentos passados e pela leitura da tese.

A toda Equipe do Laboratório de genes eritrocitários, à Dra Lillian Castilho e ao Dr. Wagner pela oportunidade de utilizar o espaço físico do

laboratório para realizar parte da prática, às queridas amigas: Gláucia, Dé, Kellian, Anne, Bia, Telminha, Carol e Thainá;

A toda equipe do Laboratório de Histocompatibilidade da Universidade Estadual de Campinas, à Dra Silvia Marques por disponibilizar espaço físico e equipamentos, à Edilaine Gildo e à Adriana que me ajudaram na execução do projeto e, especialmente, a Dra. Sofia pela seleção dos indivíduos controles do estudo e pela prontidão em me ajudar quando necessário;

A todos do Laboratório de Hematologia do Hemocentro da Universidade Estadual de Campinas, Dra Moniquinha, Beth, Janeth, Liliane e Bruno que permitiram utilizar o espaço físico para armazenar amostras e coletar dados dos pacientes;

A toda equipe do Laboratório de Imunologia Básica da Universidade Estadual de Maringá, aos professores Jeane, Ana, Luíza, Márcia, Rafael, Ricardo e Sueli e aos funcionários Marco, Fabiano, Helen e Edna o meu eterno carinho, pela amizade, pelas palavras de incentivo e pela disponibilidade em me deixar utilizar o laboratório sempre que necessário;

As Dras Margareth Afonso Torres e Maria Elisa de Moraes por tornarem disponível o suporte técnico do Laboratório de Imunogenética de São Paulo, para realização das tipificações de citocinas, além disso, pela paciência e pelas folgas do trabalho a mim concedidas para eu poder terminar a tese;

As minhas queridas amigas Gláucia e Daniela pela amizade e companheirismo;

Ao Roberto Zulli que realizou grande parte das análises estatísticas;

A secretária Nicete, pela presteza;

A todos os pacientes com Linfoma Difuso de grandes células B e todos os doadores de medula óssea sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado e pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste projeto, ao INCTs (Instituto de Ciência e Tecnologia do Sangue) pelo apoio financeiro e ao Hemocentro da Unicamp, pela estrutura adequada para a realização do trabalho.

E ainda, a todos aqueles que indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

EPÍGRAFE

A Chave de todo ser humano é seu pensamento.

Resistente e desafiante aos olhares, tem oculto um estandarte que obedece, que é a ideia ante a qual todos os seus fatos são interpretados. O ser humano pode, somente, ser reformado mostrando-lhe uma ideia nova que supere a antiga e traga comandos próprios.

(Ralph Waldo Emerson)

RESUMO

O Linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) representa o subtipo mais prevalente de linfoma maligno não-Hodgkin, sendo responsável por 30-40% de todos os casos de LNH. O LDGCB não tem etiologia e patogênese bem definidas, porém o seu desenvolvimento parece estar relacionado a respostas imunes ineficazes, devido a frequente associação desse linfoma com estados de imunossupressão. Os fatores genéticos envolvidos no desenvolvimento e evolução da doença não são bem entendidos. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência dos genes *KIR*, dos ligantes HLA e do polimorfismo em genes de citocinas na susceptibilidade ou resistência ao desenvolvimento de LDGCB, bem como na evolução clínica e resposta ao tratamento. Para tanto, foram selecionados 112 pacientes com diagnóstico de LDGCB e 292 doadores de sangue e medula óssea como grupo controle. As tipificações dos genes *KIR* e dos ligantes HLA foram realizadas com a técnica de PCR-SSO e a tipificação de citocinas foi realizada com a técnica PCR-SSP. As análises estatísticas foram realizadas pelo pacote estatístico “R” versão 3.0.2 para o programa Windows e os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. A distribuição dos genes *KIR* nos grupos estudados mostrou uma menor frequência do gene *KIR2DL2* nos pacientes quando comparados aos controles (45,5% vs 58,1%; $P=0,036$), essa associação mostrou-se significativa também na combinação de *KIR2DL2* com *C1* (33,0% vs 45,9%; $P=0,026$) sugerindo um papel de proteção desse gene ao desenvolvimento de LDGCB. Em relação à evolução clínica da doença, os ligantes HLA-Bw4 e HLA-Bw4 80I foram mais frequentes nos pacientes com estádios mais avançados da doença (64,7% vs 40,9%; $P=0,020$ e 44,1% vs 25,0%; $P=0,046$, respectivamente) sugerindo que a presença desses ligantes pode ser fator de prognóstico ruim ao LDGCB. Em relação à resposta terapêutica, o gene *KIR2DL3* apresentou uma tendência positiva ao tratamento do LDGCB, pois esse gene foi mais frequente nos indivíduos com resposta completa que nos indivíduos não respondedores (90,3% vs 76,0%; $P=0,09$). A respeito dos genes reguladores de

citocinas, o genótipo IFN-gama-874/A:A foi associado positivamente ao LDGCB, sendo encontrado mais frequente nos pacientes que nos controles (50,9% vs 27,9%; $P=0,001$). Contrariamente os genótipos: IFN-gama-874/T:A, IL10-819/C:C e IL10-592/C:C foram menos frequentes nos pacientes que nos controles ($P=0,001$; $P=0,025$; $P=0,025$). Ademais, o genótipo IL10-1082/G:G foi relacionado a maior sobrevida livre de progressão. Os resultados encontrados sugerem que os genes *KIR*, os ligantes HLA e os genes de citocinas parecem ter envolvimento na proteção, susceptibilidade, evolução clínica e resposta ao tratamento do LDGCB.

ABSTRACT

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most prevalent subtype of malignant non-Hodgkin lymphoma and affects approximately 30-40 % of all cases. The DLBCL has no clearly defined etiology and pathogenesis, but its development seems to be related to ineffective immune responses due to frequent association of lymphoma with immunosuppression. Genetic factors involved in the development and progression of the disease are not well understood. The aim of this study was to evaluate the influence of KIR genes, HLA ligands and cytokine polymorphisms in the susceptibility or resistance to the development of DLBCL, as well as influence in the clinical course and response to treatment. To this end, we selected 112 patients with DLBCL and 292 bone marrow donors as control group. The typing of *KIR* genes and HLA ligands were performed by PCR-SSO and typing of cytokine genes was performed by PCR-SSP technique. Statistical analyzes were performed by the statistical package " R " version 3.0.2 for Windows program. P values < 0.05 were considered significant. The distribution of *KIR* genes in both groups showed a lower frequency of the *KIR2DL2* gene in patients compared to controls (45.5% vs 58.1% $P=0.036$), this association was significant also in combination *KIR2DL2* with C1 (33.0% vs 45.9%, $P=0.026$) suggesting a protective role of this gene to the development of DLBCL. Regarding the clinical course of the disease, HLA-Bw4 and HLA-Bw4 80I ligands were more frequent in patients with more advanced stages of the disease (64.7% vs 40.9%, $P=0.020$ and 44.1% vs 25 0%, $P=0.046$, respectively) suggesting that the presence of these ligands may be poor prognostic factor to DLBCL. In regard to treatment response, the *KIR2DL3* gene was positively associated with the treatment of DLBCL, because this gene was more frequent in individuals with complete response than in nonresponders individuals ((90,3% vs 76,0%; $P=0,09$). Regarding the cytokine genes, IFNG+874/A genotype:A/A was positively associated with DLBCL, it was more frequently in patients than in controls (50.9% vs 27.9%, $P=0.001$). On other hand genotypes: IFNG+874 /T:A, IL10-819/C:C and IL10 -592 /C:C were less frequent in

patients than in controls ($P=0.001$, $P=0.025$, $P=0.025$ respectively). Moreover, the genotype IL-1082/G:G was related to increased progression-free survival. The results suggest that the *KIR* genes, HLA ligands and cytokine genes seem to be involved in the protection, susceptibility, clinical course and response to treatment of DLBCL.

|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADCC	citotoxicidade dependente de anticorpos
CHOP	ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, e prednisona
EBV	Epstein Barr Virus
GPVI	Receptor do colágeno de plaquetas glicorotéina VI
HHV8	Herpes vírus
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida
HLA	Antígeno leucocitário humano
HTLV	Vírus linfotrópico da célula humana
IFN	Interferon
IFN- γ	Interferon Gama
IL	Interleucinas
ILTs	Transcritos semelhantes à imunoglobulina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPI	Índice Internacional Prognóstico
ITAM	Motivos de ativação baseados em tirosina
ITIM	Motivos de inibição baseados em tirosina
KIR	Receptores semelhantes à imunoglobulina das células <i>natural killer</i>
LAIRS	Receptores semelhantes a imunoglobulina associado aos leucócitos
LDGCB	Linfoma difuso de grandes células B
LDH	Lactato Desidrogenase
LH	Linfoma de Hodgkin
LILRs	Receptores semelhantes a imunoglobulina dos linfócitos
LNH	Linfoma não-Hodgkin
LRC	Complexo de Receptores Leucocitários
LyTh1	Linfócito T helper 1
LyTH2	Linfócito T helper 2
μ g	Micrograma
ul	Microlitros

mL	MiLilitro
NK	Célula <i>Natural Killer</i>
ng	Nanograma
OR	Odds ratio
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SAPE	Estreptavidina conjugada com R-ficoeritrina
SNPs	polimorfismo de único nucleotídeo
SSO	Sonda oligonucleotídica sequência específica
TGF	Fator transformante de crescimento
TNF	Fator de necrose tumoral
WHO	Organização Mundial da Saúde

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Balanço de sinais ativadores e inibidores no controle de ativação das NK.....	49
Figura 2. Estrutura dos receptores KIR.....	51
Figura 3. Localização cromossômica dos genes <i>KIR</i>	53
Figura 4. Organização <i>exon-intron</i> dos genes <i>KIR</i>	54
Figura 5. Estrutura de uma molécula HLA de classe I.....	57
Figura 6. Localização do gene <i>IL10</i>	63
Figura 7. Localização do gene <i>TNF</i>	64
Figura 8. Localização do gene <i>TGFB1</i>	65
Figura 9. Localização do gene <i>IFNG</i>	66
Figura 10. Localização do gene <i>IL6</i>	67
Figura 11. Citômetro de Fluxo.....	83
Figura 12. Leitura no citômetro de fluxo.....	83
Figura 13. Interpretação dos resultados pelo Software HLA-Fusion.....	85
Figura 14. Eletroforese para citocinas.....	87
Figura 15. Perfis de genótipos <i>KIR</i> e frequências observadas na população brasileira.....	117
Figura 16. Genótipos <i>KIR</i> e frequências observadas na população de Campinas (n=292), Curitiba (n=164) e Belo Horizonte (n=90).....	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Receptores KIR e seus ligantes HLA.....	59
Tabela 2. Características dos pacientes com LDGCB e dos controles.....	94
Tabela 3. Distribuição dos genes <i>KIR</i> nos pacientes com LDGCB e nos controles	96
Tabela 4. Distribuição dos ligantes nos pacientes com LDGCB e nos controles	97
Tabela 5. Distribuição de <i>KIR-HLA</i> de classe I considerando a associação do receptor KIR e seu respectivo ligante HLA nos pacientes com LDGCB e nos controles.....	98
Tabela 6. Distribuição dos genótipos <i>KIR</i> A/A e B/x nos pacientes com LDGCB e nos controles.....	99
Tabela 7. Distribuição do gene <i>KIR2DS4</i> e suas variantes nos pacientes com LDGCB e nos controles.....	101
Tabela 8. Número de genes inibidores e ativadores nos pacientes com LDGCB e nos controles.....	102
Tabela 9. Distribuição dos ligantes HLA nos pacientes com LDGCB e nos pacientes com estádios avançados e não avançados do LDGCB.....	103
Tabela 10. Distribuição dos genes <i>KIR</i> nos pacientes com LDGCB respondedores e não respondedores ao tratamento com RCHOP.....	106
Tabela 11. Distribuição das frequências genotípicas dos polimorfismos nos genes de citocinas nos pacientes com LDGCB e nos controles.....	108
Tabela 12. Distribuição das frequências genotípicas dos polimorfismos nos genes de citocinas nos pacientes com LDGCB e nos controles de acordo com o fenótipo relativo.....	109
Tabela 13. Frequências dos genes <i>KIR</i> na população de Campinas e outras populações.....	114
Tabela 14. Frequências dos genes <i>KIR</i> na região de Campinas e comparação com oito populações brasileiras.....	114
Tabela 15. Ligantes HLA e combinação dos genes <i>KIR</i> com seus respectivos ligantes.....	120
Tabela 16. Combinação dos pares KIR+HLA e suas frequências na população de Campinas.....	121

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Sobrevida global nos pacientes com LDGCB de acordo com a presença dos genótipos <i>A/A</i> e <i>B/x</i>	104
Gráfico 2. Sobrevida Livre de Progressão nos pacientes com LDGCB de acordo com a presença e ausência do gene <i>KIR2DL3</i>	105
Gráfico 3. Sobrevida Livre de Progressão nos pacientes com LDGCB de acordo com os genótipos de <i>IL10-1082</i>	111

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	41
1.1 Linfoma Difuso de Grandes células B (LDGCB)	43
1.1.1 Aspectos gerais e clínicos.....	43
1.1.2 Etiologia e fatores de predisposição.....	45
1.1.3 Tratamento do LDGCB.....	46
1.2 Célula <i>Natural Killer</i>	47
1.2.1 Receptores das células NK.....	49
1.2.2 Diversidade genética e organização dos genes <i>KIR</i>	52
1.2.3 Ligantes de KIR- Moléculas HLA.....	56
1.2.4 Genes <i>KIR</i> e o Câncer.....	59
1.3 Citocinas	60
1.3.1 Interleucina-10 (IL-10) e o gene <i>IL10</i>	62
1.3.2 Fator de necrose tumoral- α (TNF α) e o gene <i>TNF</i>	63
1.3.3.Fator transformante de crescimento- β 1 (TGF- β 1) e o gene <i>TGFB1</i>	64
1.3.4 Interferon- γ (IFN- γ) e o gene <i>IFNG</i>	65
1.3.5 Interleucina-6 (IL-6) e o gene <i>IL6</i>	67
2. JUSTIFICATIVA	69
3. OBJETIVOS	73
3.1. Objetivo geral	75
3.2. Objetivos específicos	75
4. MATERIAL E MÉTODOS	77
4.1 Casuística	79
4.1.1. Elegibilidade	79
4.1.1.a Pacientes com LDGCB.....	79
4.1.1.b Doadores voluntários de sangue e medula óssea.....	80

4.2 Técnicas	81
4.2.1 Extração de DNA.....	81
4.2.2. Técnica de PCR-SSO.....	81
4.2.3 Determinação dos ligantes Bw4, Bw4 80I, Bw4 80T, HLA-C do grupo 1 (C1) e do grupo 2 (C2).....	85
4.2.4 Pesquisa de deleção de 22 pb no gene <i>KIR2DS4</i>	86
4.2.5 Tipificação de citocinas.....	86
4.3 Análise estatística	87
5. RESULTADOS	91
5.1. Características dos pacientes e controles	93
5.2 Influência dos genes <i>KIR</i> e ligantes HLA no LDGCB	95
5.2.1 Frequências dos genes <i>KIR</i> nos pacientes e controles.....	95
5.2.2 Frequências dos ligantes de <i>KIR</i> nos pacientes e controles.....	96
5.2.3 Frequências das combinações <i>KIR-HLA</i> nos pacientes e controles	97
5.2.4 Frequências dos genótipos <i>KIR</i> nos pacientes e controles.....	99
5.2.5 Frequências das variantes de <i>KIR2DS4</i> e dos genótipos <i>A/A</i> nos pacientes e controles.....	100
5.2.6 Número de genes <i>KIR</i> inibidores e ativadores nos pacientes e controles.....	101
5.2.7 Frequências dos genes <i>KIR</i> , ligantes de <i>KIR</i> , combinações <i>KIR-HLA</i> , genótipos <i>KIR</i> , variantes de <i>KIR2DS4</i> e número de genes inibidores e ativadores nos subgrupos de pacientes.....	102
5.2.8 Análises de sobrevida global e livre de progressão	103
5.2.9 Análise dos genes <i>KIR</i> , ligantes de <i>KIR</i> , combinações <i>KIR-HLA</i> , variantes de <i>KIR2DS4</i> e número de genes inibidores e ativadores com a resposta ao tratamento com RCHOP.....	105
5.3. Influência dos polimorfismos em genes de citocinas no LDGCB	107
5.3.1 Frequências dos genótipos de citocinas nos pacientes e controles.....	107
5.3.2 Frequências dos genótipos de citocinas nos subgrupos de pacientes.....	110
5.3.3 Análises de sobrevida global e livre de progressão	110

5.4 Distribuição dos genes <i>KIR</i> na população de Campinas, SP.....	111
5.4.1 Distribuição dos genes <i>KIR</i> na população de Campinas/SP.....	111
5.4.2 Genótipos <i>KIR</i> na população de Campinas/SP.....	115
5.4.3 Frequências das variantes de <i>KIR2DS4</i> na população de Campinas/SP.....	118
5.4.4 Frequências dos ligantes HLA na população de Campinas/SP.....	119
5.4.5 Número de pares de <i>KIR</i> inibidores com seus respectivos ligantes.....	121
6. DISCUSSÃO.....	123
7. CONCLUSÃO.....	133
8. REFERÊNCIAS	137

1. Introdução

1.1 LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B

1.1.1 Aspectos gerais e clínicos

Os Linfomas são transformações neoplásicas das células linfóides normais que residem predominantemente em tecidos linfóides. Morfologicamente podem ser divididos em dois tipos: linfomas de Hodgkin (LH) e não-Hodgkin (LNH).(1-3)

O linfoma não-Hodgkin (LNH) é a sétima neoplasia mais incidente nos Estados Unidos, sendo responsável por 4,2% de todas as malignidades.(4-6) No Brasil, os dados epidemiológicos não são totalmente conhecidos, porém, estatísticas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) indicam alta incidência desses linfomas no país, e relatam que o número de casos de LNH duplicou nos últimos 25 anos, principalmente em indivíduos com mais de 60 anos.(7)

O LNH compreende diferentes subtipos que podem ser divididos em alto grau de malignidade (agressivos), ou baixo grau de malignidade (indolentes), e podem ser de derivação T ou B. Os linfomas indolentes apresentam curso clínico lento e progressivo por vários anos. Contrariamente, os linfomas agressivos crescem rapidamente e, se não tratados podem levar a óbito em poucos meses. Dentre os LNH agressivos, destaca-se o linfoma difuso de grandes células B (LDGCB). (1-3,8)

O LDGCB representa o tipo mais comum de linfoma maligno não-Hodgkin, sendo responsável por aproximadamente 60-70% dos LNH classificados como agressivos e 30-40% de todos os casos de LNH.(9-11)

Morfologicamente apresentam-se como um grupo heterogêneo de malignidades composta por células grandes com núcleo duas vezes o tamanho de um linfócito pequeno e usualmente igual ao núcleo de um macrófago tecidual.

Adicionalmente, as células alteradas nesse linfoma, frequentemente apresentam nucléolo proeminente, citoplasma basofílico e alta taxa de proliferação celular.(2)

Os LDGCB primariamente têm origem nos linfonodos e baço, mas também podem se desenvolver em outros sítios, sendo então denominados extranodais. Os principais sítios acometidos no LDGCB são: o trato gastrointestinal, pele, ossos, mama, cérebro, baço, glândulas salivares, tireoide, fígado, rins, ovários e testículos.(10-11) Além disso, o LDGCB também pode se desenvolver como resultado da progressão ou transformação de neoplasias menos agressivas tais como leucemia linfocítica crônica, linfoma de zona marginal entre outras.

Indivíduos em idade adulta avançada representam a faixa etária mais acometida pelo LDGCB, porém crianças e adultos jovens também podem desenvolver a doença. O LDGCB parece acometer ligeiramente mais homens(4,7) e a maioria dos pacientes encontra-se em estágio avançado da doença ao diagnóstico.

O estadiamento do LDGCB, bem como de outros linfomas, é baseado na classificação Ann Arbor, desenvolvida em 1971.(12) Nesse sistema os pacientes são classificados em quatro estádios (I a IV) de acordo com o número de sítios acometidos e de suas localizações. O estágio I representa o estágio inicial e o estágio IV representa o estágio mais avançado.

Alguns pacientes podem apresentar sintomas específicos ao diagnóstico, relacionados aos linfomas, tais como: sudorese noturna, febre e perda de peso inexplicável (mais de 10% do peso habitual nos seis meses anteriores ao diagnóstico). Esses sintomas são denominados “sintomas B” e aos pacientes que os apresentam são acrescentados a letra “B” após os estádios de I a IV.(13)

Dentre os fatores de risco associados ao aumento da mortalidade pelo LDGCB, estão incluídos: idade maior que 60 anos, performance status na

escala ECOG >2 (do inglês: *Eastern Cooperative Oncology Group* >2), nível da enzima Lactato desidrogenase (LDH) elevado, presença de mais de um sítio extranodal e estádios Ann Arbor avançados (III e IV). Esses cinco parâmetros de mau prognóstico constituem o índice Internacional prognóstico (IPI) e são aplicados no LDGCB bem como nos demais LNH agressivos.(14)

1.1.2 Etiologia e fatores de predisposição

A maioria dos casos de LDGCB não tem uma etiologia definida, porém fatores de predisposição incluem agentes desencadeadores de aberrações moleculares, tais como pesticidas, fertilizantes e fármacos, bem como alguns agentes infecciosos, tais como o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), o vírus Epstein-Barr (EBV) e o herpes vírus (HHV8).(15-18) Esses vírus foram associados a um grande espectro de doenças linfoproliferativas e sugerem que o desenvolvimento de linfomas pode estar relacionado a infecções, bem como na resposta imune envolvida no controle de algumas infecções.(19)

Outro dado interessante é que o LDGCB é frequentemente relatado em indivíduos portadores de doenças autoimunes, portadores de doenças de deficiência imunológica adquiridas ou pacientes em estados imunossuprimidos (Por .ex. após transplante de órgãos).(2,19)

Uma metaanálise avaliou a incidência de Linfomas Hodgkin e Não Hodgkin em pacientes infectados com o vírus HIV (N=444.172) e pacientes que receberam transplantes de órgãos (N=31.977) e encontrou altas incidências de ambos os linfomas nos grupos de pacientes.(20) Sendo que a maioria dos linfomas relacionados à imunodeficiência são de histologia do LDGCB.(2,19)

De forma geral, o desenvolvimento dos linfomas parecem estar relacionados à resposta imune, de forma que, na ausência de uma resposta imune

adequada, bem como na ausência de controle efetivo de infecções, as células B podem persistir, expandir e adquirir lesões adicionais(21) e, como consequência, levar ao desenvolvimento de malignidade.

Nesse contexto, as células do sistema imune envolvidas nesses processos talvez possam influenciar na susceptibilidade ou proteção ao desenvolvimento desses linfomas.

1.1.3 Tratamento do LDGCB

O principal objetivo do tratamento é obter total remissão do tumor, bem como aumentar a sobrevivência dos pacientes. As estratégias de tratamento variam de acordo com a idade e o índice prognóstico do paciente.

A quimioterapia padrão para os pacientes com LDGCB envolve os fármacos ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina, e prednisona (CHOP) em diferentes combinações e dosagens.(2, 22)

Nos últimos anos a quimioterapia padrão tem sido associada ao anticorpo monoclonal anti-CD20 rituximabe com bons resultados.(23) Essa combinação é conhecida como R-CHOP e cerca de 60% dos pacientes com LDGCB que recebem esse tratamento alcançam a cura, os outros 40% adquirem doença refratária ou evoluem para óbito.(23-30)

O rituximabe age nos linfomas pela interação com o antígeno CD20 que é expresso em células B e pré-B normais, bem como em células B malignas. O mecanismo de ação do Rituximabe não está totalmente esclarecido, porém um dos modelos propostos envolve a citotoxicidade dependente de anticorpos (do inglês: *antibody-dependent cellular cytotoxicity*, sigla: ADCC) desencadeada pelas células exterminadoras naturais (do inglês: *natural killer*, sigla: NK).(31) Nesse modelo, o anticorpo anti-CD20 se liga pela porção Fab ao antígeno expresso nas

células B e a porção Fc do anticorpo se liga ao receptor Fcγ IIIa (FcγRIIIa, CD16) na superfície de células NK resultando em depleção da células alvo.(31)

Considerando o papel crucial das células NK na resposta imune inata contra diversos vírus e células cancerosas, bem como sua capacidade de desencadear citotoxicidade dependente de anticorpos na interação com o Rituximabe, essas células, assim como, os receptores presentes na superfície que regulam a sua função, talvez possam influenciar na susceptibilidade ou proteção ao desenvolvimento de linfomas, na evolução clínica e variabilidade da resposta ao tratamento, sendo potenciais alvos de estudo.

1.2 CÉLULA *NATURAL KILLER*

As células *natural killer* (NK) são uma linhagem de células relacionadas com linfócitos especialmente importantes na resposta imune contra vírus e tumores, pois são capazes de eliminar as células-alvo via citólise direta e citotoxicidade celular dependente de anticorpos e podem ser rapidamente recrutadas para tecidos ou órgãos por fatores quimiotáticos produzidos por alterações celulares. As células NK também são responsáveis por secretar interferon-gama (IFN-γ) que ativa macrófagos e células dendríticas (CDs) e direciona a resposta imune adaptativa mediada por linfócitos T-Helper 1 (LyTh1). (32)

As células neoplásicas desenvolvem vários mecanismos para evadir ao sistema imune. Um destes mecanismos é diminuir a expressão de moléculas HLA de classe I na célula transformada. De fato, nos linfomas vem sendo relatadas perdas completas ou parciais de moléculas HLA, bem como anormalidades em

transportadores associados ao processamento de antígenos, β 2-microglobulina perda de heterozigidade.(33,34)

As moléculas HLA de classe I apresentam fragmentos antigênicos aos linfócitos TCD8+, os quais necessitam dessa interação para reconhecer, tornar-se ativados e lisar a célula infectada ou alterada.(32) Sendo assim, a diminuição na expressão de HLA classe I em células transformadas, por um lado, leva a uma resistência à citólise por linfócitos TCD8+, mas por outro lado, pode levar a uma susceptibilidade à destruição espontânea por células NK, um conceito conhecido como hipótese do “*missing-self*”.(35-37) Nessa hipótese as células NK são capazes de reconhecer diminuição na expressão de moléculas HLA de classe I (sinal de anormalidade), desencadeando citotoxicidade contra as células que estiverem alteradas. Nesse contexto, as células NK passam a ser componentes especialmente importantes a resposta imune contra os linfomas.(32-37)

Além deste mecanismo, as células NK podem tornar-se ativadas mediante interação com receptores ativadores presentes na sua superfície. A figura 1 representa o balanço entre sinais ativadores e inibidores no controle da ativação da célula NK.

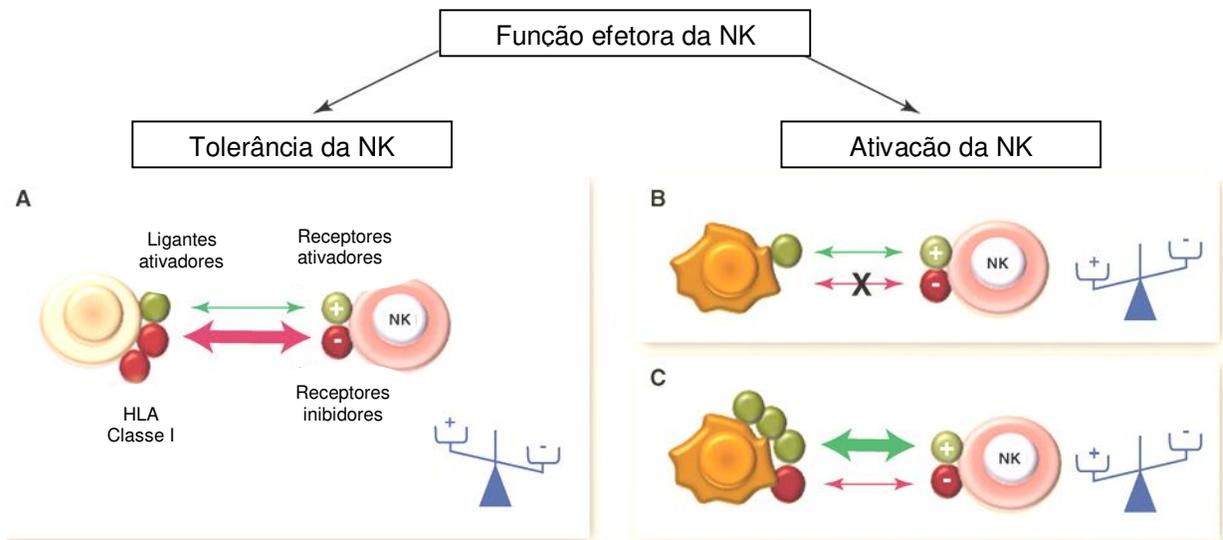


Figura 1 Balanço de sinais ativadores e inibidores no controle da ativação das NK. (A) Os sinais inibidores preponderam sobre os ativadores, a célula não é ativada (tolerância). (B) A ausência de sinais inibidores permite que sinais ativadores levem a ativação da célula NK. (C) Similarmente, se o conjunto de sinais ativadores se sobrepõe ao grupo de sinais inibidores, a célula NK será ativada. FONTE: Vivier et al, 2011 (37).

1.2.1 Receptores das células NK

Como descrito anteriormente a atividade das células NK é regulada pelo balanço entre diferentes receptores presentes em sua superfície, dos quais se destacam os receptores conhecidos como KIR (do inglês: *killer cell immunoglobulin-like receptors*: receptores semelhantes à imunoglobulina das células *natural killer*). (32,35-39)

Os receptores KIR podem ser de inibição ou de ativação das células NK e a função efetora desses receptores é controlada por diferenças nas caudas citoplasmática e na porção transmembrana desses receptores. Os receptores KIR que possuem cauda citoplasmática longa têm função de inibição das células NK pela presença nos domínios citoplasmáticos de um ou dois motivos de inibição

baseados em tirosina (ITIM: do inglês: *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs*), os quais liberam sinais inibidores. Contrariamente, os receptores KIR com cauda citoplasmática curta possuem um resíduo de aminoácido no domínio transmembrana que permite associação do receptor KIR com a molécula DAP-12, a qual libera sinais ativadores através de motivos de ativação baseados em tirosina (ITAM: do inglês: *Immunoreceptor Tyrosine-based Activating Motifs*). Uma exceção é o receptor KIR2DL4, pois o mesmo tem uma cauda longa com a presença de um ITIM e possui um resíduo de aminoácido na região transmembrana que pode permitir ativação. As características estruturais dos receptores KIR são apresentadas na figura 2.(39,40)

A expressão dos receptores KIR não é idêntica em todas as células de um mesmo organismo. As células NK podem apresentar conjuntos diferentes de receptores selecionados ao acaso que podem estar relacionadas a maior ou menor resposta contra célula alvo.(41)

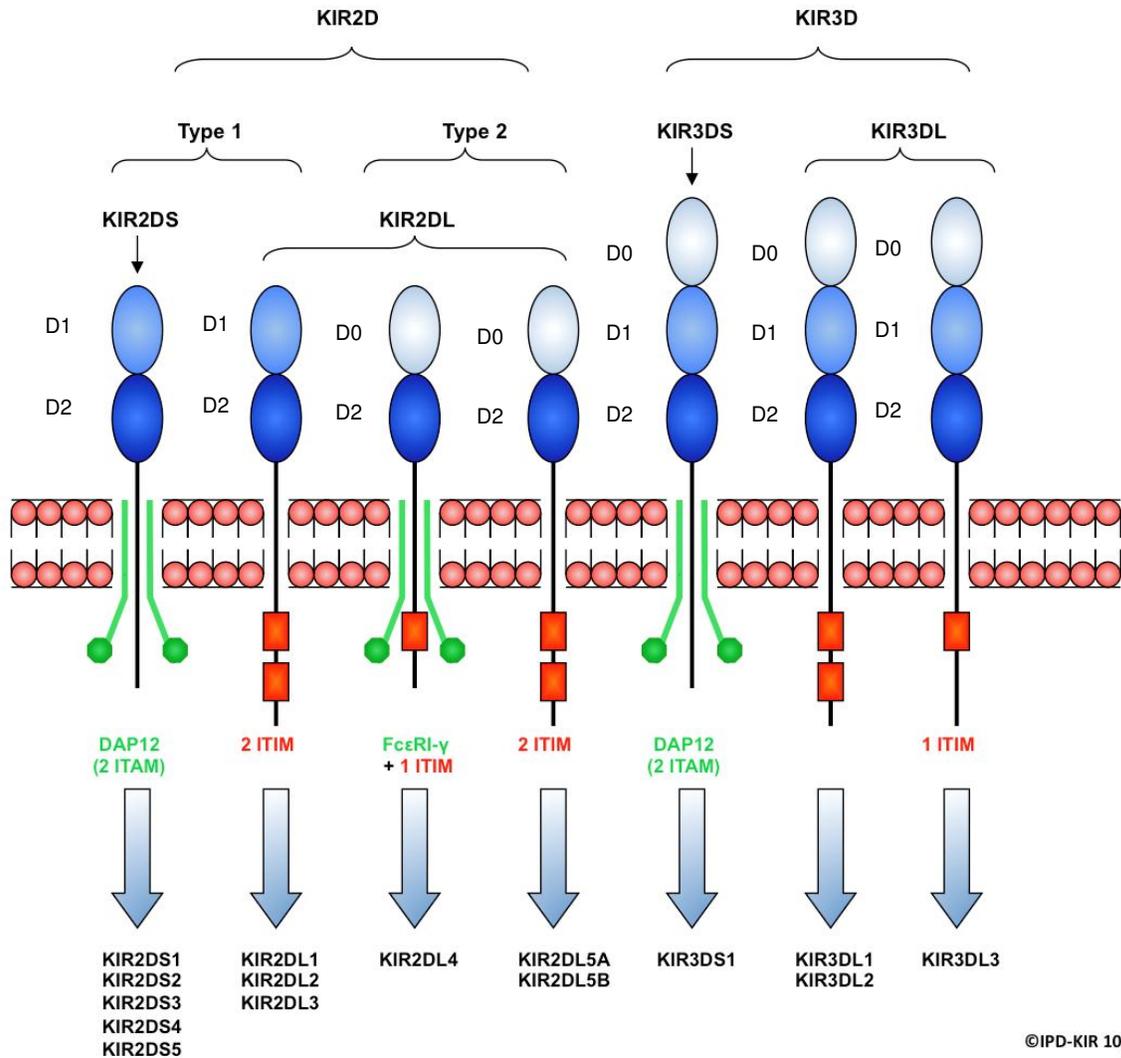


Figura 2. Estrutura dos receptores KIR. Características estruturais das proteínas KIR com dois (KIR2D) ou três (KIR3D) domínios extracelulares semelhantes à Ig. A associação dos receptores KIR ativadores com as proteínas adaptadoras é mostrada em verde, enquanto os motivos de inibição baseados em tirosina (ITIM) dos receptores inibidores são mostrados em vermelho. A letra D indica os domínios extracelulares semelhantes à Ig. Os receptores do tipo 1 apresentam os domínios extracelulares D1 e D2 e os receptores do tipo 2 apresentam os domínios extracelulares D0 e D2. Adaptado de: FONTE: Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html> Acesso em: outubro de 2013.

1.2.2 Diversidade genética e organização dos genes *KIR*

Os genes que codificam os receptores KIR em humanos ocupam um espaço de aproximadamente 150Kb dentro do Complexo de Receptores Leucocitários (LRC: do inglês: *Leukocyte Receptor Complex*) no cromossomo 19q13.4 (figura 3). Atualmente são bem caracterizados 14 genes *KIR* (*2DL1*, *2DL2*, *2DL3*, *2DL4*, *2DL5*, *3DL1*, *3DL2*, *3DL3*, *2DS1*, *2DS2*, *2DS3*, *2DS4*, *2DS5* e *3DS1*) e 2 pseudogenes (*2DP1* e *3DP1*) que variam em tamanho (4 a 16kb) e em número de exons (4 a 9). (40)

Estruturalmente os receptores KIR podem ser formados por até três domínios semelhantes a imunoglobulinas denominados D0, D1 e D2, codificados pelos exons três, quatro e cinco respectivamente. Possuem uma região de inserção da molécula na membrana plasmática codificada pelo exon seis, e uma região transmembrana codificada pelo exon sete. Os *exons* oito e nove codificam os domínios citoplasmáticos.(40,42) A nomenclatura dos genes *KIR* é baseada nos domínios extracelulares e podem ser divididos em dois tipos: tipo 1 e tipo 2. Os genes *KIR* do tipo 1 têm uma organização genômica idêntica àquela que codifica moléculas KIR com três domínios semelhantes às imunoglobulinas. No entanto, nesses genes, o exon três é um pseudoexon, que não codifica o domínio D0, sendo codificados apenas os domínios D1 e D2. Exemplos desta classe são os genes *KIR2DL1* (OMIM:604936) , *KIR2DL2* (OMIM:604937), *KIR2DL3* (OMIM:604938) e todos os genes *KIR2DS*. Os genes *KIR* do tipo dois têm completa ausência do *exon* quatro; como consequência, os receptores desta classe não possuem o domínio D1, apresentando somente os domínios D0 e D2. Os genes que pertencem a esta classe são os genes *KIR2DL4*(OMIM:604945) e *KIR2DL5* (OMIM: 605305). *KIR2DP1* é um pseudogene juntamente com *KIR3DP1* (OMIM: 610604). A organização dos genes *KIR* está apresentada na figura 4.(40)

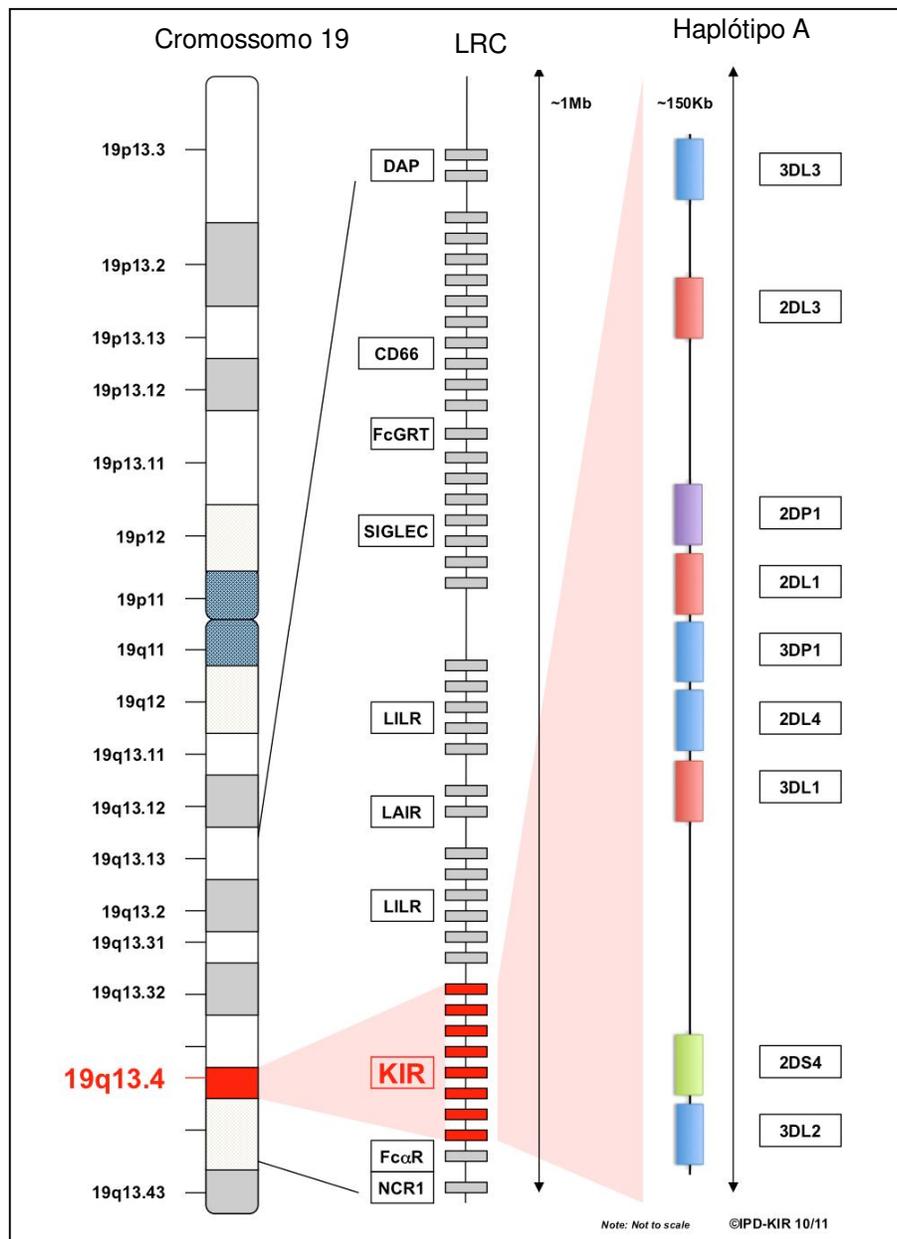


Figura 3. Localização cromossômica dos genes *KIR*. Localização cromossômica do LRC (complexo de receptores leucocitários, do inglês: leucocyte receptors complex) destacando os genes *KIR* que se situam no cromossomo 19 (19q13.4). Dentro do LRC encontram-se várias famílias de genes, dentre elas estão os LILRs (leukocyte Ig-like receptors); os ILTs (Ig-like transcripts); os KIRs (killer cell immunoglobulin-like receptors); os GPVI: (platelet collagen receptor glycoprotein VI); os receptores IgAFc, FCAR e NKp46; além dos LAIRs (leukocyte-associated Ig-like receptors) e genes das proteínas adaptadoras transmembrânicas. Um haplótipo muito conhecido é o haplótipo A que possui 9 genes e está representado na figura. FONTE: disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html> acesso em outubro 2013.

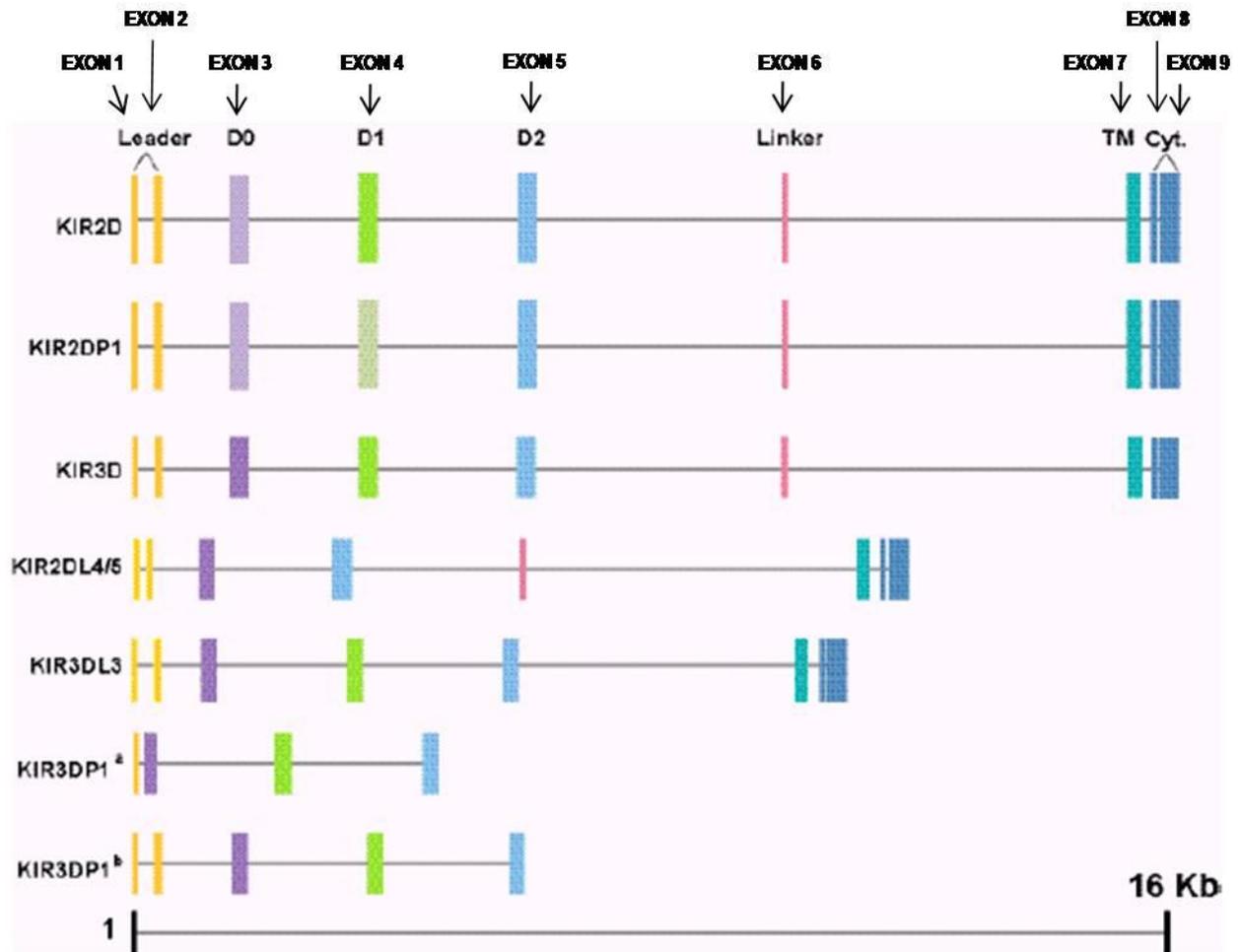


Figura 4. Organização exon-intron dos genes KIR. Exon 1 e 2 (em amarelo) codificam a sequência sinal ou líder; exon 3 (em roxo) codifica o domínio extracelular D0, exon 4 (em verde-claro) codifica o domínio D1, exon 5 (em azul-claro) codifica o domínio D2; exon 6 (em rosa) codifica a sequência de união; exon 7 (em azul-turquesa) codifica a região transmembranar; e exons 8 e 9 (em azul-escuro) que codificam a cauda citoplasmática. Os genes *KIR* do tipo 1 (*KIR2DL1*, *2DL2/3* e todos os *2DS*), tem uma organização genômica semelhante, porém, o exon 3 nesses genes é um pseudoexon (lilás). O exon 3 também é um pseudoexon no *KIR2DP1*, que também contém um pseudoexon 4 (verde mais claro). Os genes *KIR* do tipo 2 que incluem *2DL4* e *2DL5* são caracterizados pela completa ausência do exon 4. (Adaptado de Carrington e Norman, 2003)(39)

Estudos populacionais realizados nos últimos anos revelaram uma ampla diversidade nos locus dos genes *KIR* e relacionaram esse polimorfismo à susceptibilidade a diversas doenças e neoplasias. Alguns genes *KIR* estão presentes na maioria dos indivíduos enquanto outros genes exibem flexibilidade de presença e ausência em diferentes populações. O polimorfismo de ausência e presença, pouco comum para maioria dos genes humanos permite que o repertório dos genes *KIR* varie de um indivíduo para outro, fazendo com que existam inúmeros haplótipos *KIR*, os quais diferem tanto em número quanto em conteúdo gênico. (40,43)

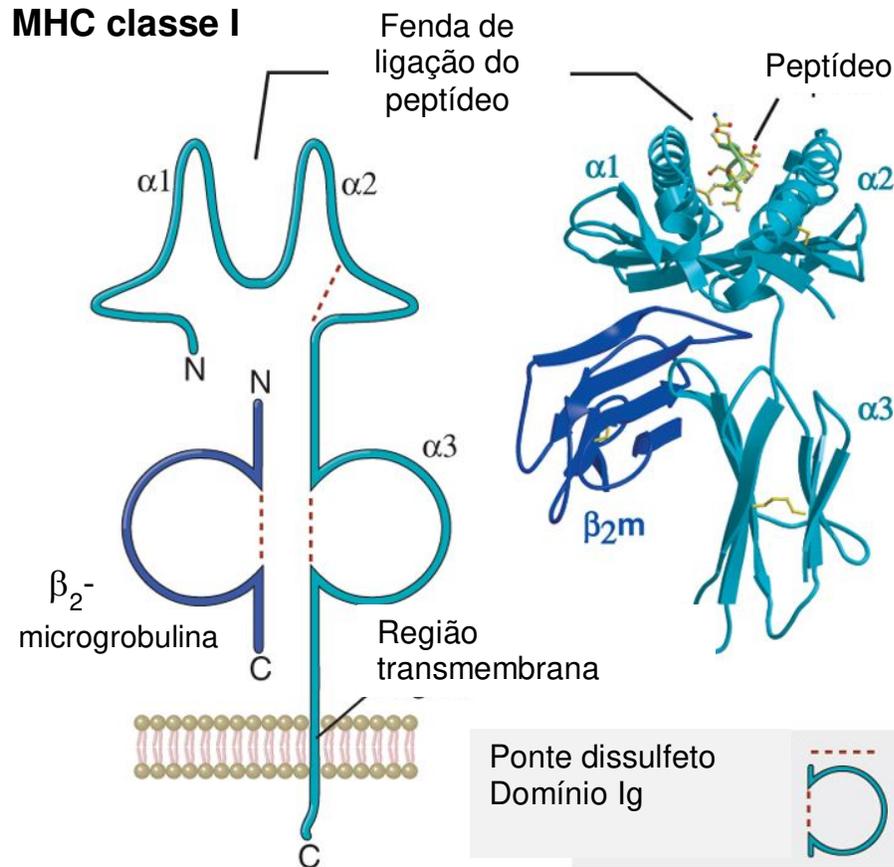
Os haplótipos *KIR* são flanqueados na sua porção terminal centromérica pelo gene *KIR3DL3*, na região telomérica pelo *KIR3DL2* e no centro encontram-se os genes *KIR3DP1* e *KIR2DL4*. Esses genes estão presentes virtualmente em todos os indivíduos e são conhecidos como “genes de moldura do haplótipo” (do inglês: *framework*).

Dois diferentes haplótipos dos genes *KIR* são bem conhecidos e são denominados A e B. (44) O haplótipo A é muito frequente em diversas populações, possui sete genes (*KIR2DL1*, *2DL3*, *2DL4*, *2DS4*, *3DL1*, *3DL2* e *3DL3*), dois pseudogenes (*KIR2DP1* e *3DP1*) e apresenta uma característica importante: a presença de apenas um gene ativador (*KIR2DS4*). Esse gene, frequentemente, exibe uma deleção de 22 pares de bases no exon 5, na porção que determina a inserção da molécula na membrana celular, que, conseqüentemente, faz com que o receptor não consiga ser ancorado na superfície da célula e seja secretado na forma solúvel. Sendo assim, indivíduos homocigotos para o haplótipo A e para a deleção no gene *KIR2DS4* não possuem nenhum gene *KIR* ativador clássico.(45-46) Em populações caucasianas essa deleção tem sido encontrada entre 70 a 82%.O Haplótipo B apresenta número variado de genes e de combinações, podendo ter até seis genes ativadores.(45,47)

1.2.3 Ligantes de KIR - Moléculas HLA

Os ligantes dos receptores KIR são as moléculas HLA (antígenos leucocitários humanos do inglês: *Human Leucocyte Antigen*) de classe I. As moléculas HLA possuem participação efetiva na resposta imune pois promovem à interação entre os epítomos de um dado patógeno e o repertório de células T do hospedeiro. Desta forma, um indivíduo pode responder de forma diferente ao mesmo antígeno de acordo com a variante HLA que ele possui. (48)

As moléculas HLA de classe I (HLA-A, -B e -C), possuem distribuição variada e são encontradas em todas as células nucleadas e plaquetas, exceto em células neurais, espermatozoides e células trofoblásticas. São formadas por duas cadeias polipeptídicas ligadas de forma não-covalente; uma cadeia α composta por três domínios ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$) codificada por genes do locus do MHC (complexo principal de Histocompatibilidade, do inglês: *Major Histocompatibility Complex*) e outra cadeia que não é codificada por genes do MHC chamada de $\beta 2$ -microglobulina.(48) A estrutura de uma molécula do MHC de classe I está apresentada na figura 5.



© Elsevier, Abbas et al: Cellular and Molecular Immunology 6e - www.studentconsult.com

Figura 5. Estrutura de uma molécula HLA de classe I. O diagrama da esquerda ilustra as diversas regiões da molécula. Domínios $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ da cadeia α , codificados por diferentes exons. Cadeia polipeptídica $\beta 2$ -microglobulina não codificada pelo MHC, ligada não-covalentemente à cadeia α . O diagrama a direita mostra a estrutura da porção extracelular da molécula HLA-B27 ligada a um peptídeo, exibido pela cristalografia de raios X. FONTE: disponível em: www.studentconsult.com acesso em março de 2011.

As moléculas HLA de classe I HLA-A3 e A11 são ligantes para o receptor KIR3DL2.(49) As moléculas de classe I HLA-B podem ser divididas em Bw4 e Bw6 de acordo com a expressão de um ou dois epítomos sorológicos mutuamente exclusivos, que são especificados por cinco variações de aminoácidos nas posições 77, 80, 81, 82 e 83. Bw6 é encontrado exclusivamente em moléculas HLA-B, enquanto o equivalente sorológico Bw4 está presente

também em moléculas HLA-A (A23, A24, A25, A24:03, A32).(50) As moléculas HLA Bw4 são ligantes para o receptor KIR3DL1.(51,52) Alguns estudos sugerem que há diferença de afinidade entre o KIR3DL1 e as moléculas HLA Bw4. As moléculas HLA-B com Isoleucina na posição 80 (HLA-B Bw480I) se ligam ao receptor KIR3DL1 com mais afinidade que moléculas HLA-B com Treonina na posição 80 (HLA-B Bw4 80T).(53,54)

As moléculas HLA-C possuem dois polimorfismos nas posições 77 e 80 da sequência de aminoácidos da alfa hélice, que permite dividi-las em dois grupos: grupo 1 (HLA-C1) possui o aminoácido serina na posição 77 e asparagina na posição 80 (Ser77/Asn80) e o grupo 2 (HLA-C2) que possui uma asparagina na posição 77 e uma lisina na posição 80 (Asn77/Lys80).(55-58) KIR2DL1 se liga especificamente as moléculas HLA-C2 enquanto KIR2DL2/2DL3 se ligam preferencialmente as moléculas HLA-C1. O grupo C2 inclui: C*03:07; C*03:15; Cw4; Cw5; Cw6; C*07:07, C*07:09; C*12:05; C*12:04:1/2; C*15 (exceto C*15:07);C*16:02; C*17 e C*18, e o grupo C1 inclui: C*03 (exceto C*03:07, 03:10, 03:15); C*07 (exceto C*07:07, 07:09); C*08; C*12 (exceto C*12:05, 12:04:1/2); C*13; C*14 (exceto C*14:04); C*15:07 e C*16 (exceto C*16:02).

Além disso, o receptor KIR2DL4 se liga especificamente a molécula HLA-G, uma molécula HLA não clássica que é primariamente expressa no trofoblasto fetal, células endoteliais tímicas e na córnea.(59) Os receptores ativadores KIR2DS1, KIR2DS2 e KIR3DS1 possuem grande similaridade em seus domínios extracelulares com os receptores inibidores KIR2DL1, KIR2DL2/3 e KIR3DL1, respectivamente e, portanto parecem se ligar aos mesmos ligantes HLA dos seus correspondentes inibidores. KIR2DS4 se liga especificamente a alelos HLA-C*04.(60) Ligantes para os receptores KIR2DL5, KIR2DS5, KIR2DS3 e KIR3DL3 ainda não foram identificados.

Os genes que codificam as moléculas HLA estão localizados no braço curto do cromossomo 6 (6p21.31) dentro da região MHC (do inglês: *Major Histocompatibility Complex*) e constituem os genes mais polimórficos do genoma

humano. Os genes HLA são herdados seguindo as leis de Mendel e são expressos de forma co-dominante em cada indivíduo.(48) Diversos pesquisadores avaliam os genes KIR com os genes e alelos HLA nas análises em estudos de associações com doença. A tabela 1 apresenta um resumo simplificado dos receptores KIR e seus respectivos ligantes.

Tabela 1 Receptores KIR e seus ligantes.

Ligantes	Receptores KIR
HLA-C do grupo 2	2DL1, 2DS1
HLA-C do grupo 1	2DL2, 2DL3 e 2DS2
HLA- Bw4	3DL1 e 3DS1
HLA A3 e A11	3DL2
HLA-G	2DL4
<i>HLA-C*04</i>	2DS4

1.2.4 Genes *KIR* e o câncer

Estudos realizados nos últimos anos revelaram extensa diversidade nos *loci* dos genes *KIR* e a relacionaram à susceptibilidade a diversas neoplasias. Em um estudo realizado por Zhang et al. (61), o gene *KIR2DS4* foi associado a susceptibilidade a leucemia mielóide crônica. Em um estudo realizado por Naumova et al. (62), os genes *KIR2DL2/2DL3* e o ligante HLA-C1 foram associados a susceptibilidade ao desenvolvimento de melanoma. Em outro estudo, o gene *KIR3DS1* foi associado a proteção contra o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em pacientes infectados pelo VHC.(63) Contrariamente, a presença de *KIR3DS1* foi associada a um aumento no risco de desenvolvimento de câncer cervical.(64)

Em relação aos linfomas, poucos dados são encontrados relacionando os genes *KIR* com os linfomas. Em um estudo com pacientes com linfoma de Hodgkin foi encontrado efeito protetor do gene *KIR3DS1/KIR2DS1*.(65)

Khalaf et al. (66) avaliaram pacientes com linfoma folicular e não encontraram associação significativa dos genes *KIR* com esse tipo de linfoma.

Em outro estudo, o genótipo *KIR2DL2/KIR2DS2* foi relacionado foi relacionado ao aumento no risco de morte em pacientes com linfoma não Hodgkin desenvolvido pós-transplante (n=136).(67)

Esses dados sugerem que os genes *KIR* podem estar envolvidos na patogênese de tumores e, portanto, parece indicar a influência desses genes no desenvolvimento e ou progressão do linfoma difuso de grandes células B.

Além dos genes *KIR*, outros marcadores genéticos podem influenciar na evolução clínica de diversas doenças. Um desses marcadores pode estar relacionado com a produção de citocinas.

1.3 CITOCINAS

A imunidade adaptativa humana apresenta dois tipos de resposta: a resposta imune humoral que estimula linfócitos B a produzirem anticorpos para proteção contra os patógenos extracelulares e a resposta imune mediada por células na qual os linfócitos T CD8+ com ação citotóxica, as células NK e os macrófagos ativados têm como alvo os patógenos intracelulares. As células T helper CD4+ são cruciais para a regulação de ambos os tipos de respostas e podem ser classificadas em duas subpopulações: T helper tipo 1(Ly-Th1) e T helper tipo 2 (Ly-Th2).(68)

As células Th1 direcionam a imunidade celular na defesa, principalmente contra vírus e células cancerosas, pela produção de citocinas IL-2 e interferon-gama que induzem reações inflamatórias e ativam a função de fagocitose dos macrófagos. Os linfócitos T helper 2 (Th2) são importantes na resposta imune humoral, pois produzem citocinas IL-4, IL -5, IL -6, IL-9, IL -10 e IL -13 que favorecem ativação de células B e produção de imunoglobulinas e inibição da resposta Th1. (68-70)

Estudos demonstraram que os polimorfismos em regiões reguladoras e transcritas nos genes de citocinas podem alterar a expressão gênica, modular o balanço entre as respostas Th1/Th2 e influenciar a susceptibilidade para as doenças autoimunes, as doenças infecciosas e o câncer.(71-74)

As citocinas são glicoproteínas ou proteínas de baixo peso molecular produzidas e secretadas por várias células do organismo humano em resposta a um número variado de estímulos. Elas têm um papel crucial na regulação da imunidade, pois podem modular o desenvolvimento linfóide e a função imune.(71, 75-76)

Como descrito anteriormente, as células tumorais podem induzir respostas imunológicas fracas na tentativa de escapar do sistema imune. Nesse contexto, as citocinas também parecem ter papel importante, pois tem sido descrito que o tratamento com citocinas de indivíduos portadores de tumor estimulam a proliferação e diferenciação de linfócitos T e células NK aumentando a imunidade contra tumores.(77)

As citocinas agem mediante ligação a receptores específicos presentes na superfície de células alvo. A atuação dessas proteínas pode ser parácrina, na qual a célula alvo está próxima a célula que produz a citocina, ou pode ser autócrina, na qual o receptor está localizado na própria célula secretora

da citocina. Ocasionalmente, também agem como mediadores endócrinos, alcançando células alvo distantes via corrente sanguínea.(75,76)

De acordo com sua estrutura, as citocinas são agrupadas em famílias (interferons, hematopietinas e TNF) e de acordo com sua função e genética podem ser divididas em subfamílias.(77)

Os genes que codificam as citocinas podem apresentar variações nucleotídicas em sítios específicos, denominadas polimorfismo de único nucleotídeo (do Inglês: *single nucleotide polymorphisms* - sigla SNPs). Esses polimorfismos localizados dentro de regiões reguladoras de genes de citocinas podem influenciar a produção de citocinas. De modo que um indivíduo pode ter diferentes fenótipos de produção de citocinas variando de baixa produção a alta produção de citocinas.(78)

A seguir serão descritas algumas citocinas e genes de citocinas que sugerem o envolvimento na patogênese dos linfomas.

1.3.1 Interleucina-10 (IL-10) e o gene *IL10*

A IL-10 é membro da família de citocinas tipo II e é expressa principalmente por macrófagos, linfócitos T e B, células NK e monócitos. Apresenta importante ação regulatória, e sua principal função biológica parece envolver a supressão da síntese de citocinas nas células Th1. (79-82)

O gene *IL10* (3586) está localizado no cromossomo 1q31-32, contém cinco exons e ocupa aproximadamente 5,1 kb. A produção celular de IL-10 parece ser influenciada por três SNPs localizados na região promotora do gene *IL10*: -1082G>A (rs1800896), -819C>T (rs1800871) e -592C>A (rs1800872), possivelmente por resultarem em alteração de sítios específicos de reconhecimento de fatores transcricionais. (83-84) A presença da base

nitrogenada A na posição -1082, por exemplo, foi correlacionada a produção diminuída da IL-10 *in vitro*. (84)

Em relação aos linfomas, estudos sugerem que a imunossupressão e inibição de respostas Th1 estão relacionadas ao risco de desenvolver linfomas. (74, 85)

Lan *et al.* (74) em um estudo com 518 pacientes com LNH, avaliaram quatro SNPs no gene *IL10* (-3575T>A, -1082A>G, -819C>T e -592C>A) e encontraram os haplótipos AGCC (OR=1,54; 95%IC=1,21-1,96, P<0,001) e TATA (OR=1,37; 95%IC=1,05-1,79; P=0,02) associados a maior risco de desenvolver linfomas de células B.

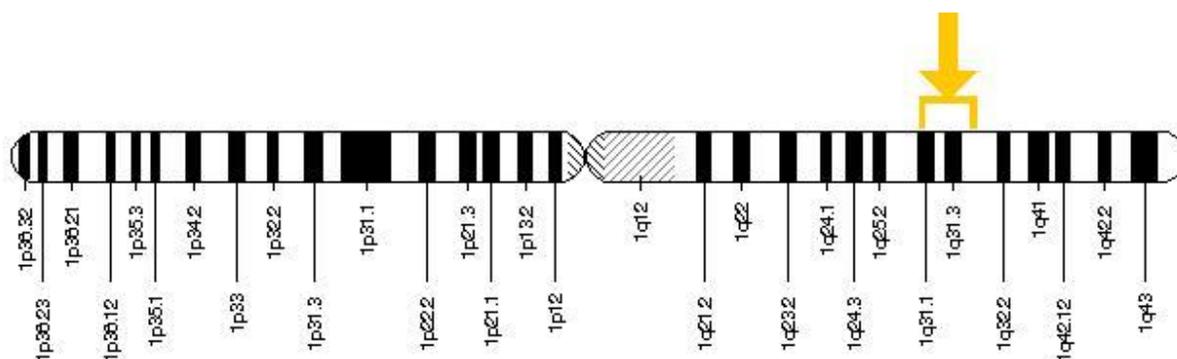


Figura 6. Localização do gene *IL10*. FONTE: disponível em: <http://ghr.nlm.nih.gov/> acesso em março de 2013.

1.3.2. Fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e o gene *TNF*

O TNF- α é membro da superfamília de citocinas e é uma citocina pró inflamatória com papel central em respostas imunes, tem envolvimento no desenvolvimento linfoide e age como um indutor de secreção de IL-10 *in vitro*. As principais células produtoras de TNF são os macrófagos, células NK e linfócitos T e B. (77,86)

O gene *TNF* (7124) está localizado no cromossomo 6p21.3, possui quatro exons e três íntrons dispostos em um segmento de 3,6kb. Um dos SNPs observados no gene *TNF* está localizado na região promotora, na posição -308 com substituição da base guanina por adenina (-308G>A, rs1800629) e o alelo *TNF-308A* tem sido associado à alta produção de citocinas. (87)

A produção desregulada de TNF- α foi observada em linfomas não Hodgkin (88-89) e o genótipo *TNF -308 AG/AA* foi relacionado a menor sobrevida global (P=0,048) e sobrevida livre de doença (P=0,07) em pacientes com LDGCB tratados com RCHOP em um estudo na Sérvia. (90)

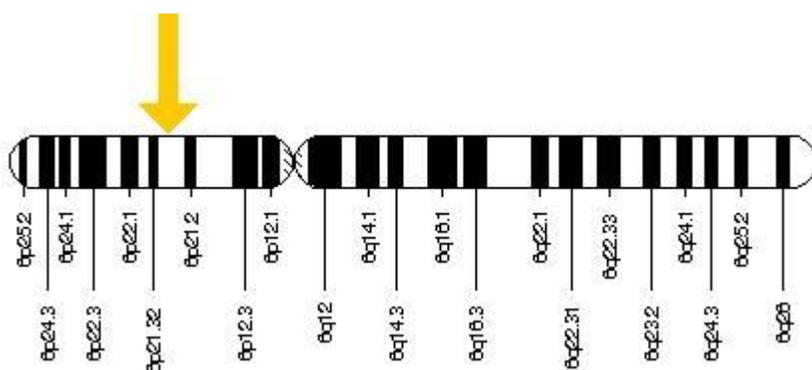


Figura 7. Localização do gene *TNF*. FONTE: disponível em: <http://ghr.nlm.nih.gov/> acesso em março de 2013.

1.3.3. Fator transformante de crescimento- β 1 (TGF- β 1) e o gene *TGFB1*

O TGF- β 1 é produzido e secretado por diversas células, tais como plaquetas, macrófagos, fibroblastos, linfócitos T e B, em resposta a estresse, injúria e ação viral, além de participar da resposta imunológica durante a carcinogênese.(77, 91-92)

O gene TGF- β 1 está localizado no cromossomo 19q13.1-13.3 com 7 exons e 6 introns. Dentre os SNPs identificados no gene *TGFB1* encontra-se o SNP rs1982073 localizado no primeiro exon, também conhecido como códon 10, + 10T/C ou T869C que resulta em uma substituição de aminoácidos na sequência peptídica do códon 10 (Leu \rightarrow Pro). Outro SNP bastante estudado é o rs1800471 no códon 25 que resulta na troca do aminoácido arginina por prolina.(93) Em um indivíduo se o códon 10 traduzir para o aminoácido leucina, e o códon 25 para a arginina ele será considerado alto produtor de TGF- β 1. Ao contrário, se traduzir para prolina em ambos os códons será considerado baixo produtor (94,95). Awad *et al.* (93) também estudaram a influência das variantes polimórficas de *TGFB1* na produção de TGF- β 1 por leucócitos de sangue periférico de 34 indivíduos saudáveis e encontraram uma maior produção de TGF- β 1(10.037 \pm 745 pg/m) nos indivíduos com o genótipo homocigoto arginina/arginina no códon 25 , enquanto os indivíduos com genótipo prolina/arginina tiveram um valor médio de 6.729 \pm 883 pg/ml. Esses SNPs parecem ter influência em desordens relacionadas as células B (96). No LDGCB um estudo com oitenta e quatro pacientes encontrou a presença do alelo 10pro associada a estádios mais avançados da doença III/IV (OR 4,65; 95 % IC 1,33–16,19; P = 0,016).(90)

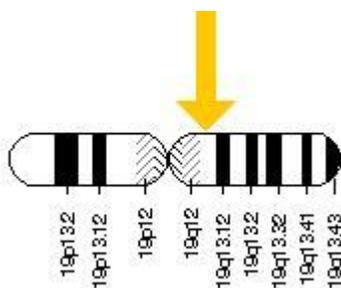


Figura 8. Localização do gene *TGFB1*. FONTE: disponível em: <http://ghr.nlm.nih.gov/> acesso em março de 2013.

1.3.4. Interferon- γ (IFN- γ) e o gene *IFNG*

IFN- γ ou interferon tipo II é produzido e secretado principalmente por células NK e células *natural killer* T (NKT) como parte da resposta imune inata e é também produzido por linfócitos T no desenvolvimento de resposta imune antígeno-específica. É expresso em baixas quantidades, porém, tem sua expressão aumentada mediante estímulos como traumas, infecções virais, câncer e manifestações autoimunes. O IFN- γ atua de diversas maneiras sobre as células B(97) e polimorfismos nos genes que codificam IFN- γ foram relacionados ao desenvolvimento de desordens linfoproliferativas pós-transplante. (98)

O gene *IFNG* (3458) está localizado no cromossomo 12q14. Ocupa uma região de 5961pb e é composto por quatro exons e três íntrons.(99) A presença de três íntrons difere IFN- γ dos IFN- α e IFN- β (que estão no 9p e não tem íntrons). São descritos alguns polimorfismos no gene *IFNG*, um SNP bastante estudado está presente no primeiro intron na posição +874A>T (rs2430561). Os alelos +874T e +874A estão correlacionados a alta e baixa expressão de IFN- γ , de modo que os genótipos A/A, T/A e T/T são associados à baixa, intermediária e alta produção de IFN- γ , respectivamente.(97, 99)

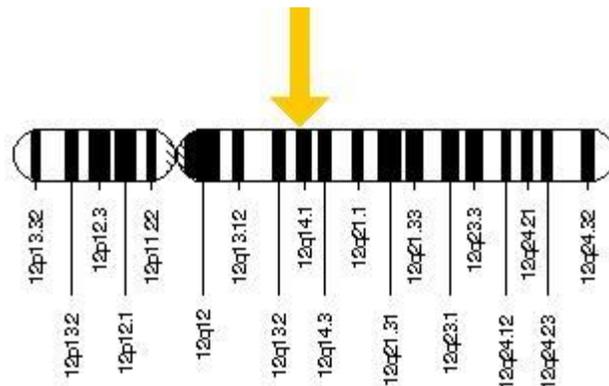


Figura 9. Localização do gene *IFNG*. FONTE: disponível em: <http://ghr.nlm.nih.gov/> acesso em março de 2013.

1.3.5 interleucina-6 (IL-6) e o gene *IL6*

A Interleucina 6 (IL-6) é membro da família de citocinas tipo I, produzida principalmente por células da resposta imune tais como linfócitos T, macrófagos e células endoteliais.(100-101) Não é expressa constitutivamente, mas pode ser expressa em resposta a estímulos inflamatórios diversos tais como IL-1e TNF- α .(102) Suas atividades biológicas incluem a participação nas respostas imunes com proliferação de células B produtoras de anticorpos e reações de fase aguda.(77)

O gene *IL6* (3569) está localizado no cromossomo 7p21. Possui cinco exons e quatro íntrons distribuídos em uma região de aproximadamente 5kb.(103) Na posição -174 do gene *IL6* foi descrito um SNP o *IL6*-174G>C (rs1800795) que resulta em três possíveis genótipos:G/G, G/C e C/C. Estas variações influenciam a taxa de transcrição e conseqüentemente a concentração plasmática de IL-6(104) No LDGCB alta concentração sérica de IL-6 tem sido descrita como um fator de prognóstico desfavorável.(105)

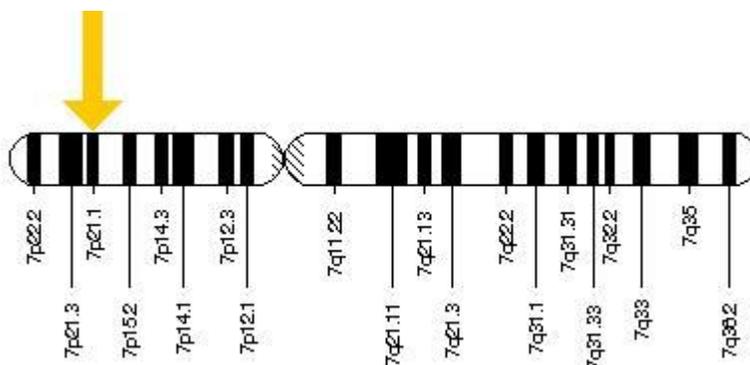


Figura 10. Localização do gene *IL6*. FONTE: disponível em: <http://ghr.nlm.nih.gov/> acesso em março de 2013.

2. Justificativa

Vários estudos tem investigado o papel da resposta imune nos linfomas B, porém dados sobre o impacto da resposta imune inata no desenvolvimento do LDGCB e também na resposta ao tratamento ainda não estão totalmente esclarecidos.

Desde que uma disfunção imune parece ser a base do entendimento da linfomagênese, uma alteração no balanço da regulação e expressão de citocinas Th1 e Th2 que são mensageiros fundamentais da imunidade adaptativa, bem como a qualidade da resposta imune inata baseada na citotoxicidade das células NK podem ter um importante papel na susceptibilidade o LDGCB e no curso clínico dos linfomas.

Nesse contexto, a caracterização dos genes *KIR*, HLA de classe I e do polimorfismo de citocinas em indivíduos com linfomas não-Hodgkin difuso de grandes células B permite avaliar quais destes genes podem estar envolvidos na susceptibilidade, no curso clínico, na resposta terapêutica e também na sobrevida dos pacientes. Além disso, a população brasileira é muito heterogênea e conhecer a diversidade dos genes *KIR* em uma população controle pode servir de referência para estudos com outras doenças.

3. Objetivos

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Descrever a diversidade genética *KIR* na população englobada no estudo, avaliando a possível associação entre os genótipos *KIR* e HLA de classe I e os polimorfismos nos genes de citocinas com o linfoma difuso de grandes células B.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

➤ Identificar os genes *KIR* (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DS1*, *KIR2DP1* e *KIR3DP1*) e os ligantes HLA de classe I (HLA-A, B, C) em pacientes com LDGCB e em população de doadores voluntários de sangue e medula óssea pertencentes a região de Campinas, São Paulo;

➤ Estimar as frequências de presença, gênica e fenotípica dos 14 genes e 2 pseudogenes *KIR* em pacientes com linfoma difuso de grandes células B e nos controles e verificar se a ausência e a presença de 14 genes e 2 pseudogenes interfere na susceptibilidade ao LDGCB.

➤ Estimar as frequências dos ligantes HLA de *KIR* e dos complexos *KIR*-HLA nos pacientes e nos controles.

➤ Investigar a associação dos genes *KIR* com o curso clínico dos Linfomas Difuso de grandes células B:

- Sobrevida global;
- Sobrevida livre de progressão.
- Resposta terapêutica;

➤ Identificar os genes de citocinas TNF^{308} , $IFNG^{+874}$, $IL6^{-174}$, $IL10^{1082, -819, -592}$ e $TGFB1^{cd10, cd25}$ em indivíduos com LDGCB da região de Campinas, São Paulo, e em uma população controle.

➤ Estimar as frequências genóticas e fenóticas em pacientes com linfoma difuso de grandes células B e verificar se os polimorfismos em genes de citocinas interferem na susceptibilidade ao LDGCB.

➤ Investigar a associação dos polimorfismos em genes de citocinas com a evolução clínica do LDGCB:

- Sobrevida global;
- Sobrevida livre de progressão;
- Resposta terapêutica;

➤ Estimar as frequências de presença gênica de 14 genes e 2 pseudogenes KIR nos pacientes e nos controles população de Campinas e compará-las com as frequências de outras regiões do país e do mundo.

4. Material e métodos

4.1 CASUÍSTICA

4.1.1 Elegibilidade

4.1.1.a Pacientes com linfoma não-Hodgkin difuso de grandes células B (LDGCB)

No período de abril de 2009 a junho de 2013, foram atendidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia da UNICAMP mais de 150 pacientes com linfoma não-hodgkin difuso de grandes células B (LDGCB) possíveis candidatos ao estudo, dos quais, apenas 112 apresentaram os critérios necessários para inclusão, caracterizando o grupo de pacientes estudado. Os critérios de inclusão foram: pacientes recém-diagnosticados com LDGCB, de ambos os gêneros e com idade igual ou maior que 18 anos.

Todos os pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido e os dados: idade, gênero e raça, bem como os dados clínicos dos pacientes (resultados dos exames laboratoriais necessários ao diagnóstico, à determinação do tipo histológico, estágio da doença, cálculo do IPI, sorologias para os vírus das hepatites (B, C), vírus HIV, HTLV, doença de Chagas e Sífilis foram obtidos dos prontuários de cada paciente.

O diagnóstico do linfoma não-Hodgkin B de grandes células foi realizado pelo exame histopatológico do linfonodo acometido ou da biópsia da massa tumoral, incluídos em parafina e corados por hematoxilina e eosina e com realização de estudo imunohistoquímico para classificação do subtipo do linfoma não-hodgkin conforme classificação da Organização Mundial da Saúde (do Inglês: World Health Organization, sigla: WHO).(2) O estadiamento inicial dos pacientes com linfoma foi realizado com base na história clínica, exame físico, bem como nos resultados obtidos dos exames de imagem: tomografia computadorizada de

tórax e abdômen ou RX tórax e US abdominal e biópsia de medula óssea. A coleta dos dados clínicos e o acompanhamento dos pacientes foi realizado pela Dra Márcia Torresan Delamain, médica hematologista do Centro de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Estadual de Campinas.

4.1.1.b Doadores voluntários de sangue e medula óssea

No período de abril de 2009 a junho de 2013, foram selecionados para o estudo 292 doadores voluntários de sangue e de medula óssea provenientes de Campinas e região, atendidos nos Centro de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Todos os indivíduos assinaram Termo de consentimento livre e esclarecido. Os 292 indivíduos foram avaliados quanto à presença e ausência dos genes *KIR* e presença e ausência dos ligantes HLA de classe I. Primeiramente, as frequências encontradas nessa população foram comparadas com as de outras populações do Brasil para caracterizar a distribuição desses genes na população de Campinas.

Posteriormente, do total de indivíduos, 70 foram excluídos por serem muito jovens, diferindo muito da idade dos pacientes com linfoma difuso de grandes células B, além disso, foi feito pareamento étnico, pareamento de acordo com sexo e procedência. Assim, para o estudo caso-controle foram utilizados dados de 222 controles. A seleção do grupo controle foi realizada pela Dra Sofia Rocha Lieber, Biomédica do Laboratório de Histocompatibilidade da Universidade Estadual de Campinas.

4.2 TÉCNICAS

4.2.1 Extração de DNA

As amostras de sangue de cada paciente foram coletadas em tubos com EDTA e os respectivos DNAs foram extraídos de leucócitos utilizando-se o DNA blood mini kit (QIAamp, Qiagen, Missisauga, Canadá), seguindo as recomendações do fabricante.

Após extração, a qualidade/quantidade do DNA foi avaliada pela leitura óptica da absorbância (DO: 260/280 nm) e da concentração em ng/μL através de um equipamento de espectrofotometria (NanoDrop ND – 1000 Fullspectrum UV/Vis Spectrophotometer, Wilmington, DE 19810 USA).

As amostras de sangue foram ajustadas para concentração do DNA superior a 20μg/μL com valor de absorbância (DO: 260/280 nm) > 1,7 e <1,9 nm.

As extrações foram realizadas no Laboratório de genes eritrocitários da Universidade Estadual de Campinas com autorização da Dra Lillian Castilho e também no Laboratório de Histocompatibilidade da Universidade Estadual de Campinas com autorização da coordenadora Silvia Barbosa Dutra Marques.

4.2.2 Técnica de PCR-SSO

O método utilizado para tipificação dos genes *KIR* (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR3DS1*, *KIR2DP1* e *KIR3DP1*) e dos locos HLA de classe I (*HLA-A*, *-B* e *-C*) foi a técnica de PCR-SSO (Reação em Cadeia da Polimerase Sonda Oligonucleotídica Sequência Específica - *Polymerase Chain Reaction Sequence-Specific Oligonucleotide Probe*), empregando-se os kits *KIR SSO genotyping test* e *HLA SSO genotyping test* fabricados pela empresa One Lambda Inc., Canoga, CA, USA.

A amplificação do produto foi feita pelo uso de um par de iniciadores (*primers*) específicos para os exons 2 e 3 para as tipificações *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C* e de três pares de iniciadores específicos para o exon 3 (Grupo 1), exon 5 (Grupo 2) e para os exons de 7 até o 9 (7-9) (Grupo 3) para a tipificação *KIR*.

Cada reação de amplificação utilizou uma solução de 6,9ul D-Mix (dNTPs, KCl, MgCl₂·6H₂O e Tris-HCl), Taq DNA polimerase, os *primers* exon-específicos e a amostra de DNA. As placas foram seladas com um silicone termo-resistente e colocados no termociclador. Os ciclos de PCR consistiram em: seis ciclos de 20 s em 96 ° C, cinco ciclos de 20 s a 60 ° C, cinco ciclos de 20 s a 72 ° C, 30 ciclos de 10 s em 96 ° C, 30 ciclos de 15 s a 60 ° C, 30 ciclos de 20 s em 72 ° C, com uma extensão final de 10 min a 72 ° C.

Em seguida, os amplicons passaram então pelas seguintes etapas: desnaturação, neutralização, hibridização e marcação. A técnica de PCR-SSO baseia-se na desnaturação química da dupla fita de DNA do produto marcado com biotina (reagente fluorescente), seguida por neutralização química das fitas abertas e posterior hibridização com sondas oligo-específicas. As sondas hibridizadas foram marcadas com um produto fluorescente, o SAPE (Estreptavidina conjugada com R-Ficoeritrina – do inglês: *R-Phycoerythrin-conjugated Streptavidin*).

A leitura da hibridização é feita por desenvolvimento de cor por um substrato, pelo uso de espectrofotometria ou citometria de fluxo. A leitura das micro-esferas marcadas foi realizada com um citômetro de fluxo LABScanTM, (representado na figura 6), neste equipamento “lasers” com diferentes comprimentos de onda reconhecem as sondas marcadas ou não com o SAPE. A leitura no citômetro de fluxo baseia-se na percentagem de valores atribuídos para a sonda, que são superiores ou inferiores ao valor de *cut-off* (corte) pré-definido para a sonda (figura 7).



Figura 11 - Citômetro de Fluxo. FONTE: autora.

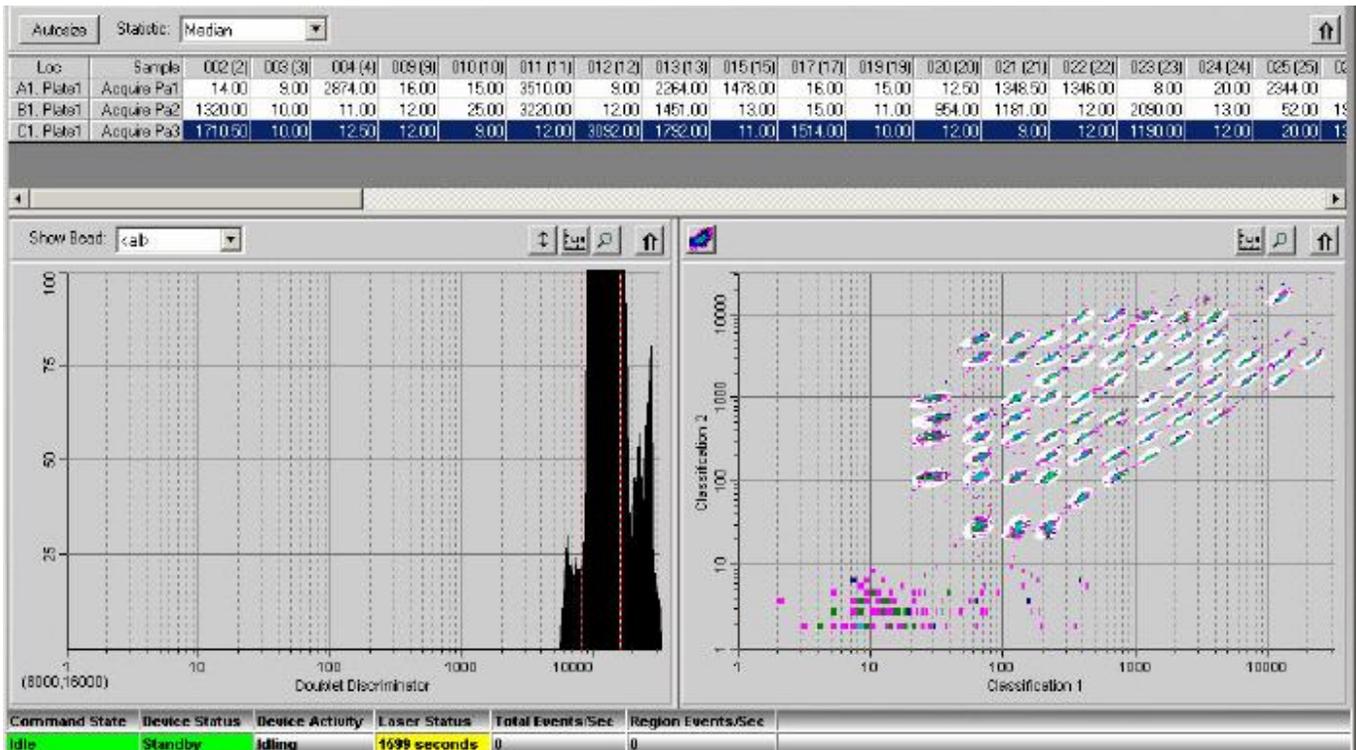


Figura 12 – Leitura no citômetro de fluxo. A tela mostra os valores em porcentagem e em gráficos. FONTE: autora.

Após leitura no citômetro de fluxo, a interpretação dos resultados foi feita pelo software HLA Fusion™ Research da One Lambda versão 3.0. O software analisa as combinações de sondas nas microesferas detectadas pelo aparelho, consulta um banco de dados interno e define quais são os genes ou alelos presentes. A figura 8 representa a interpretação dos resultados pelo Software HLA fusion™.

No período de 2010 a 2011 as tipificações pela técnica de SSO foram realizadas no Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá, com autorização da coordenadora Dra Ana Maria Sell e dos professores: Jeane Eliete Laguila Visentainer, Luíza Tamie Tsuneto, Márcia Machado de Oliveira, Rafael Campos Bezerra, Ricardo Alberto Moliterno e Sueli Donizete Borelli e com auxílio do técnico Marco Antonio Braga; no período de 2012 a 2013 as tipificações foram realizadas no Laboratório de Histocompatibilidade da Universidade Estadual de Campinas com autorização da coordenadora Silvia Barbosa Dutra Marques e auxílio das técnicas: Edilaine Gildo Guariento e Adriana de Souza e no final de 2013 as tipificações foram realizadas no Laboratório de Imunogenética de São Paulo com autorização da Dra Margareth Afonso Torres e da Dra Maria Elisa de Moraes.

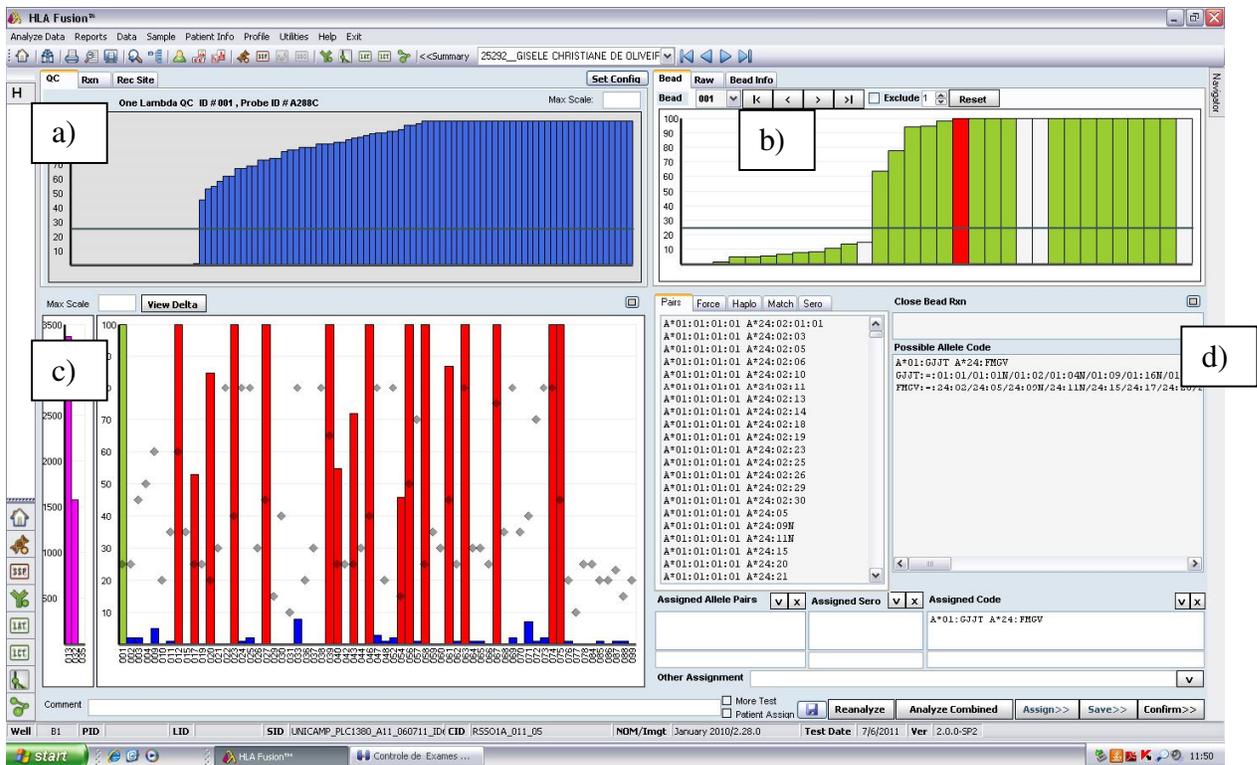


Figura 13 - Interpretação dos resultados pelo Software HLA fusion™. a) Em azul o software mostra um gráfico padrão de como as sondas deveriam ser apresentadas. b) neste gráfico são apresentadas a leitura das sondas para as amostras hibridizadas que deve ser semelhante ao gráfico padrão do software. c) em vermelho estão as sondas que atingiram o valor de corte pré estabelecido (positivas) e em azul estão as sondas que não atingiram o valor de corte (negativas). d) Se a reação ocorrer de acordo com o esperado, o software então consulta seu banco de dados e, de acordo com as especificidades de cada sonda hibridizada ele sugere quais os alelos estão presentes na amostra analisada. FONTE: autora.

4.2.3 Determinação dos ligantes Bw4, Bw4 80I, Bw4 80T, HLA-C do grupo 1 (C1) e do grupo 2 (C2)

Os grupos de alelos foram analisados na base de dados de HLA (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>) e de acordo com as posições de determinados aminoácidos foram classificados em C1, C2, Bw4, Bw4 com Isoleucina na posição 80 (80I) e Bw4 com Treonina na posição 80 (80T). Além disso, os ligantes foram

reconfirmados pela ferramenta online “*KIR-ligand calculator*” (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/ligand.html>).

4.2.4 Pesquisa de deleção de 22 pb no gene *KIR2DS4*

A forma completa do gene *KIR2DS4* e aquela com deleção de 22 pares de bases foram analisadas por PCR-SSO. Essa técnica permite diferenciar grupos de alelos que não carregam a deleção de 22 pares de bases (*001, *011, *014, *015) de grupos de alelos que apresentam a deleção (*003, *004, *006, *007, *008, *009, *010, *012 e *013).

4.2.5 Tipificação de citocinas

As tipificações dos polimorfismos *TNF*³⁰⁸, *IFNG*⁺⁸⁷⁴, *IL6*⁻¹⁷⁴, *IL10*^{1082, -819, -592} e *TGFB1*^{cd10, cd25} foram realizadas pela técnica PCR-SSP, usando o kit de genotipificação de citocinas (One Lambda[®], Canoga Park, CA, USA). A amplificação dos genes foi realizada em termociclador conforme recomendações do fabricante. Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese, em cuba micro SSP gel System (MGS-B, One Lambda[®], CA, USA), em gel de agarose a 2,0%, a 150 volts por 5 minutos. A visualização das bandas, quando expostas à luz ultravioleta, foi realizada pela coloração com brometo de etídio e a interpretação dos resultados foi baseada na presença ou ausência do fragmento específico de DNA amplificado. A integridade da reação foi avaliada por um par de iniciadores como controle interno. Para a interpretação foram utilizadas fichas-padrão fornecidas pelo fabricante. As reações foram documentadas em aparelho de fotodocumentação transiluminador BioDoc-It[™] Imaging System (UVP Upland, CA, USA). As tipificações foram realizadas no Laboratório de Imunogenética de São Paulo com autorização da Dra Margareth Afonso Torres e da Dra Maria Elisa de Moraes.

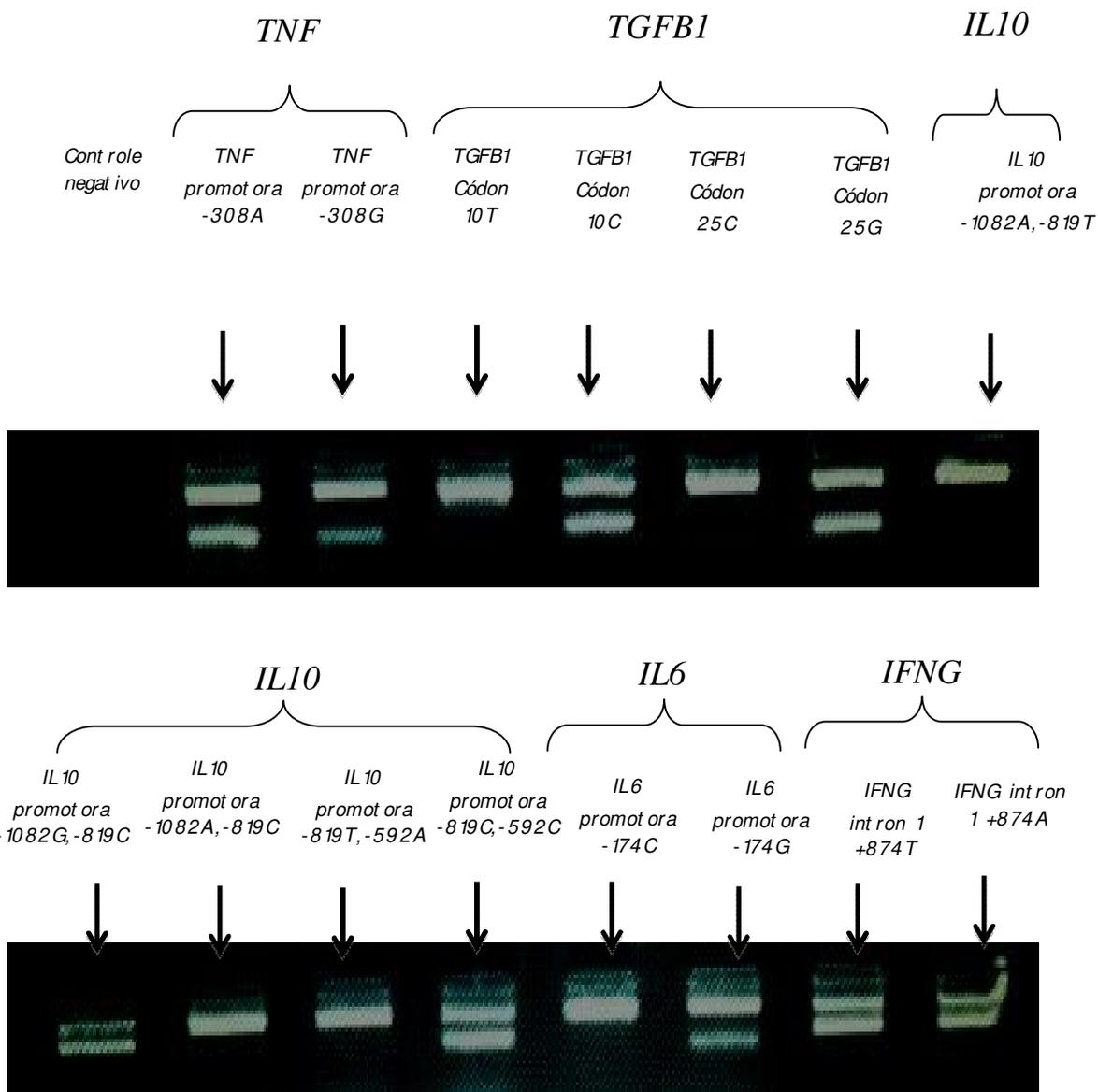


Figura 14 – Eletroforese para citocinas FONTE: autora.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Primeiramente, foram realizadas análises entre pacientes e controles (estudo caso–controle) considerando-se diversas variáveis: presença e ausência dos genes *KIR*, ligantes HLA, combinações de genes *KIR* com ligantes HLA,

número de genes *KIR* inibidores e ativadores, genótipos *KIR*, e pesquisa de deleção de 22 pares de bases no gene *KIR2DS4*.

Após, os pacientes foram subdivididos em grupos de acordo com: a idade (>60 anos *versus* ≤60 anos), o sexo (sexo feminino *versus* sexo masculino), clínico (pacientes com estádios avançados da doença *versus* pacientes com estádios não avançados da doença), presença de sintomas B *versus* sintomas A, LDH (Normal *versus* alterada), IPI (baixo e intermediário-baixo *versus* intermediário-alto e alto) e resposta ao tratamento (respondedores *versus* não respondedores) e foram avaliados quanto a presença e ausência dos genes *KIR*, ligantes HLA, combinações de genes *KIR* com ligantes HLA, número de genes *KIR* inibidores e ativadores, genótipos *KIR*, e pesquisa de deleção de 22 pares de bases no gene *KIR2DS4*. Ademais, esses mesmos grupos (pacientes *versus* controles e subgrupos de pacientes) foram avaliados quanto às frequências genotípicas e fenotípicas dos polimorfismos nos genes de citocinas (*TNF*³⁰⁸, *IFNG*⁺⁸⁷⁴, *IL6*⁻¹⁷⁴, *IL10*^{-1082, -819, -592} e *TGFB1*^{cd10, cd25}).

As distribuições dos genótipos de *KIR* e de citocinas foram feitas por contagem direta utilizando tabelas de contingência 2x2 utilizando o teste exato de Fisher. A magnitude da associação foi mensurada por *odds ratio* (OR) e o respectivo intervalo de confiança de 95%. As análises foram conduzidas pelo pacote estatístico “R” versão 4.0.2. para o programa Windows (106) pelo estatístico Roberto Zulli do Centro de Hematologia e Hemoterapia da Unicamp. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. As análises foram realizadas conjuntamente com o estatístico A influência dos genes *KIR*, ligantes HLA e genes de citocinas na evolução clínica do LDGCB foi avaliada baseada nas análises de sobrevida global e sobrevida livre de progressão com estimador de Kaplan-Meier. A estas análises foram aplicados modelos univariados de Cox para determinar a significância estatística (P valores dos métodos: “*likelihood*”, “*Wald*” e “*Log-rank*”) e os riscos relativos (RR), com intervalos de confiança (IC) de 95%, dos genes *KIR*, ligantes HLA e de citocinas, além de outras variáveis: idade, sexo, LDH, estádios

da doença, IPI, resposta ao tratamento. Os fatores associados ao risco de progressão e óbito com 20% de significância foram examinados pela análise multivariada de Cox.

A fim de facilitar a apresentação dos dados, devido ao grande volume de análises e grupos avaliados nesse estudo, todos os dados encontrados comparando pacientes e controles, significativos ou não, foram apresentados em forma de tabelas. As demais análises (entre os subgrupos de pacientes e os modelos de Cox) foram apenas descritas e, somente as análises que apresentaram dados significativos ou tendências relevantes foram apresentadas na forma de gráficos ou tabelas.

5. Resultados

5.1 CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES E CONTROLES

As características dos pacientes e controles são apresentadas na tabela 2. A idade média dos pacientes e dos controles foi de 60,4 anos e 50,6 anos, respectivamente, 50,9% dos pacientes e 41,9% dos controles eram do sexo feminino e a maioria dos pacientes e controles se denominaram brancos (95,5% dos pacientes e 100% dos controles).

Os pacientes foram acompanhados até outubro de 2013. A mediana de tempo para sobrevida global foi de 17 meses (1-54 meses) para sobrevida livre de progressão foi de 16,9 meses (1-54 meses). Os pacientes foram divididos em grupos de acordo com a resposta ao tratamento: aqueles com normalização dos achados físicos e radiológicos (PET-CT) quatro semanas após o último ciclo de quimioterapia foram considerados como pacientes em remissão completa (RC), aqueles com uma redução de 50% da massa tumoral inicial foram definidos como pacientes em remissão parcial (RP) e aqueles que não apresentaram os critérios acima foram considerados não respondedores (NR).

Ao final do seguimento, a casuística mostrou que, dos 112 pacientes diagnosticados com linfoma difuso de grandes células B setenta e sete responderam ao tratamento, vinte e dois morreram, cinco estavam em progressão de doença e quatro recidivaram, além disso, houve perda de seguimento de quatro pacientes. Todos os óbitos foram associados à progressão da doença.

Tabela 2. Características dos pacientes com linfoma não Hodgkin difuso de grandes células B (N=112) e dos controles (N=222).

Características	Pacientes	Controles	P
Idade (média±Desvio padrão)	60,4±15,4	50,6 ±8,0	0,01
Sexo n (%)			
Feminino	57(50,9)	109(49,1)	NS
Masculino	55(49,1)	113(50,9)	NS
Raça n (%)			
Caucasiana	107(95,5)	222(100,0)	NS
Parda	5(4,5)	0(0,0)	NS
Estádio clínico n (%)			
I-II	44 (39,2)		
III-IV	68 (60,7)		
Sintomas B n (%)	75 (67,0)		
LDH n (%)			
≥normal	51 (45,5)		
Desconhecido	8 (7,1)		
IPI n (%)			
Baixo e intermediário-baixo	70(62,5)		
Intermediário-alto e alto	33(29,5)		
Desconhecido	9(8,0)		
Tratamento n (%)			
RCHOP	101 (90,2)		
Outros	8 (7,1)		
Não tratado	3 (2,7)		
Resposta ao tratamento n (%)			
Remissão completa	77 (68,7)		
Progressão da doença	5 (4,5)		
Recidiva	4 (3,6)		
Óbito	22 (19,6)		
Perda de acompanhamento	4 (3,6)		

5.2. INFLUÊNCIA DOS GENES *KIR* E LIGANTES HLA NO LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B.

5.2.1 Frequência dos genes *KIR* nos pacientes e controles

Os genes *KIR* foram avaliados quanto a sua presença e ausência nos pacientes e nos controles e os dados estão apresentados na Tabela 3. Os genes de moldura do haplótipo também conhecidos como “*Framework genes*”: *KIR2DL4*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* e *KIR3DP1* estiveram presentes em 100% dos indivíduos. O gene *KIR2DL2* apresentou-se menos frequente nos pacientes que nos controles ($P=0,036$; $OR=0,60$; $IC95\%=0,38-0,95$). O gene *KIR2DS2* apresentou uma tendência, com frequência um pouco menor nos pacientes. Os demais genes apresentaram distribuição similar entre os grupos.

Tabela 3 - Distribuição dos genes *KIR* nos pacientes com LDGCB (N=112) e nos controles (N=222)

Genes <i>KIR</i>	Pacientes N(%)	Controles N(%)	P
<i>KIR2DL1</i>	108(96,4)	216(97,3)	NS
<i>KIR2DL2</i>	51(45,5)	129(58,1)	0,036 ^a
<i>KIR2DL3</i>	95(84,8)	191(86,0)	NS
<i>KIR2DL4</i>	112(100,0)	222(100,0)	NS
<i>KIR2DL5</i>	58(51,8)	120(54,1)	NS
<i>KIR2DP1</i>	109(97,3)	215 (96,8)	NS
<i>KIR2DS1</i>	42(37,5)	84(37,8)	NS
<i>KIR2DS2</i>	53(47,3)	128(57,7)	0,080 ^b
<i>KIR2DS3</i>	34(30,4)	80(36,0)	NS
<i>KIR2DS4</i>	100(89,3)	205(92,3)	NS
<i>KIR2DS5</i>	34(30,4)	66(29,7)	NS
<i>KIR3DL1</i>	103(91,7)	207(93,2)	NS
<i>KIR3DL2</i>	112(100,0)	222(100,0)	NS
<i>KIR3DL3</i>	112(100,0)	222(100,0)	NS
<i>KIR3DS1</i>	39(34,8)	76(34,2)	NS
<i>KIR3DP1</i>	112(100,0)	222(100,0)	NS

^a OR=0,60; IC95%=0,38-0,95; ^b tendência. NS=Não significativo

5.2.2 Frequência dos ligantes de KIR (HLA-A3/A11, HLA-Bw4, HLA-Bw4 80I, HLA-Bw4 80T, HLA-C1 e HLA-C2) nos pacientes e controles

Como relatado anteriormente, os receptores KIR tem como ligantes as moléculas HLA de classe I, nesse contexto os pacientes e controles foram avaliados quanto a presença e ausência dos genes que codificam os ligantes HLA.

Os grupos HLA ligantes de KIR: HLA-A3/A11, HLA-Bw4, HLA-C1 e HLA-C2. Além disso os grupos de alelos com especificidade sorológica Bw4 (*HLA-BW4*) foram subdivididos em *Bw4* com isoleucina na posição 80 (*Bw4 80I*) e, *HLA-Bw4* com treonina na posição 80 (*Bw4 80T*) devido à diferença de afinidade dessas moléculas com o *KIR3DL1*. Os resultados são apresentados na Tabela 4. Não foram encontrados resultados significativos relacionados aos genes HLA de classe I na comparação entre pacientes e controles.

Tabela 4- Distribuição dos ligantes nos pacientes com LDGCB (N=112) e nos controles (N=222).

Ligantes	Pacientes N(%)	Controles N(%)	P
HLA-A3/A11	24 (21,4)	64 (28,9)	NS
HLA-B Bw4*	57 (50,9)	138 (62,1)	NS
HLA-B Bw4-80I	48 (42,8)	100 (45,1)	NS
HLA-B Bw4-80T	30 (26,7)	78 (35,2)	NS
HLA-C1	90 (80,4)	172 (77,4)	NS
HLA-C2	82 (73,2)	153 (68,9)	NS

*Bw4 indica a presença de pelo menos um HLA-B Bw4-80I ou HLA-B Bw4-80T.

NS= Não significativo

5.2.3 Frequências das combinações *KIR-HLA* nos pacientes e controles

A distribuição de *KIR* e respectivos *HLA de classe I* foi avaliada simultaneamente, segundo a associação receptor *KIR* e seu respectivo *HLA* ligante (*KIR2DL1* com C2, *KIR2DL2* com C1, *KIR2DL3* com C1, *KIR3DL1* com Bw4, bem como *KIR3DL1* com os isotipos de Bw4, ou seja, Bw4 80I e Bw4 80T, *KIR2DS1* com C2, *KIR2DS2* com C1, *KIR2DS3* com C1, *KIR3DS1* com Bw4, bem

como KIR3DL1 com Bw4 80I e Bw4 80T) e são apresentados na tabela 5. A combinação do gene *KIR2DL2* com o ligante C1 foi menos frequente nos pacientes. Esse resultado está de acordo com o demonstrado anteriormente, no qual o gene *KIR2DL2* na análise individual também foi menos frequente nos pacientes.

Tabela 5 - Distribuição de *KIR/HLA* de classe I considerando a associação do receptor KIR com seu respectivo ligante HLA nos pacientes com LDGCB (N=112) e nos controles (N=222).

<i>KIR</i> +Ligantes	Pacientes N(%)	Controles N(%)	<i>P</i>
Inibidores			
<i>KIR2DL1</i> com C2	80 (71,4)	149 (67,1)	NS
<i>KIR2DL2</i> com C1^a	37 (33,0)	102 (45,9)	0,026 ^a
<i>KIR2DL3</i> com C1	76 (68,9)	148 (73,6)	NS
<i>KIR3DL1</i> com Bw4*	56 (50,0)	129 (58,1)	NS
<i>KIR3DL1</i> com Bw4-80I	38 (33,9)	88 (39,6)	NS
<i>KIR3DL1</i> com Bw4-80T	36 (32,1)	73 (32,8)	NS
Ativadores			
<i>KIR2DS1</i> com C2	31 (27,6)	53 (23,8)	NS
<i>KIR2DS2</i> com C1	44 (39,3)	104 (46,8)	NS
<i>KIR3DS1</i> com Bw4*	17 (15,2)	43 (19,3)	NS
<i>KIR3DS1</i> com Bw4-80I	13 (11,6)	28 (12,6)	NS
<i>KIR3DS1</i> com Bw4-80T	9 (8,0)	22 (9,9)	NS

*Bw4 indica a presença de pelo menos um HLA-B Bw4-80I ou HLA-B Bw4-80T.^aOR=0,58; 95%IC=0,35 – 0,96.

5.2.4 Frequência dos genótipos *KIR* nos pacientes e controles

A análise de segregação em famílias não foi realizada. Sendo assim, a população estudada foi dividida em dois grupos de genótipos *KIR*: A/A e B/x, de acordo com a presença de genes específicos do haplótipo A e do haplótipo B. Eles foram considerados pertencentes ao grupo B/x quando possuíam um ou mais dos seguintes genes: *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5* e *KIR3DS1*, enquanto a presença dos genes: *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DS4*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR2DP1*, e *KIR3DP1* caracterizou o genótipo A/A, que corresponde ao haplótipo A homocigoto.

O haplótipo A homocigoto foi encontrado em 33,0% dos pacientes *versus* 28,4% dos controles. Indivíduos com genótipos B/x foram 66,9% nos pacientes e 71,6% nos controles respectivamente. Não foram encontradas diferenças significativas entre os haplótipos A/A e B/x nos pacientes e controles (Tabela 6).

Tabela 6 – Distribuição dos genótipos *KIR* A/A e B/x nos pacientes com LDGCB (N=112) e nos doadores voluntários de sangue e medula óssea (N=222).

Haplótipos	Pacientes N(%)	Controles N(%)	<i>P</i>
Bx	75 (66,9)	159 (71,6)	NS
A/A	37 (33,0)	63 (28,4)	NS

5.2.5 Frequências das variantes de *KIR2DS4* e dos genótipos AA nos pacientes e controles

Considerando que o gene *KIR2DS4* frequentemente exibe uma deleção no exon 5 resultando em uma proteína truncada que não é expressada na superfície das células, os pacientes e controles foram avaliados quanto a presença e ausência dessa deleção no gene *KIR2DS4*.

Os indivíduos foram divididos em grupos: indivíduos que possuíam somente grupos de alelos com as sequências completas de *KIR2DS4*, ou seja, que não apresentavam a deleção, foram denominados *KIR2DS4completos* e apresentaram frequência de 17,9% nos pacientes e 16,7% nos controles, os indivíduos que possuíam somente grupos de alelos com a deleção de 22pb foram denominados de *KIR2DS4del* e apresentaram frequência de 59,8% nos pacientes e 56,3% nos controles e os indivíduos heterozigotos, ou seja, que apresentavam a sequência completa e as variantes deletadas foram denominados *KIR2DS4completo/del* e apresentaram frequência de 11,6% nos pacientes e 19,3% nos controles.

As frequências das variantes e do gene completo de *KIR2DS4* estão apresentados na tabela 7. Não foram encontrados dados significativos entre pacientes e controles.

O gene *KIR2DS4* é o único gene *KIR* ativador clássico presente no genótipo AA, indivíduos que apresentam esse genótipo e também a deleção de 22 pb no gene *KIR2DS4*, não possuem nenhum receptor *KIR* ativador clássico. Nesse contexto, nós avaliamos a frequência de deleção de 22 pb nos pacientes com genótipo AA (N=37) e nos controles com genótipos AA (N=63) e encontramos que 67,6% (25/37) de todos os pacientes com genótipos AA e 61,9% (39/63) controles não apresentavam gene *KIR2DS4* funcional. Esse perfil correspondeu a 22,3% de todos os pacientes estudados (25/112) e 17,6%(39/222) de todos os controles. Adicionalmente, a frequência de indivíduos carregando pelo menos

uma variante deletada de *KIR2DS4* foi alta nos dois grupos (71,4% nos pacientes, 75,6% nos controles). Não foram encontrados dados significativos entre pacientes e controles (Dados não mostrados).

Tabela 7 – Distribuição do gene *KIR2DS4* e suas variantes nos pacientes com linfoma não Hodgkin difuso de células B (N=112) e nos controles (N=222).

<i>KIR2DS4</i>	Pacientes N(%)	Controles N(%)	<i>P</i>
<i>KIR2DS4</i> completo	20(17,9)	37 (16,7)	NS
<i>KIR2DS4</i> del	67 (59,8)	125 (56,3)	NS
<i>KIR2DS4</i> completo/del	13 (11,6)	43 (19,3)	NS

5.2.6 Número de genes *KIR* inibidores e ativadores nos pacientes e controles

O número de genes inibidores e ativadores foi analisado nos pacientes e controles. O número de genes inibidores foi contado incluindo os dois *frameworks* genes: *KIR3DL2* e *KIR3DL3*.

O gene *KIR2DS4* e o gene *KIR2DL4* não foram considerados ativadores, nem inibidores, pois a função dos produtos desses genes (receptor *KIR2DS4*, *KIR2DS4*del e *KIR2DL4*) ainda é controversa. O *KIR2DS4* pode não ser expresso na superfície da célula quando presente a deleção de 22 pares de bases no gene *KIR2DS4* e o *KIR2DL4* apresenta motivos de inibição no domínio intracelular responsáveis por funções de inibição e uma arginina no domínio transmembrana responsável por funções de ativação. Os dados são apresentados

na tabela 8 e não foram encontrados dados significativos entre os grupos estudados.

Tabela 8 Número de genes inibidores e ativadores nos pacientes com LDGCB (n=112) e nos controles (n=222)

Número de genes	Pacientes N (%)	Controles N (%)	P
Inibidores			
4	4 (3,6)	3 (1,4)	NS
5	44 (39,3)	73 (32,8)	NS
6	47 (41,9)	92 (41,5)	NS
7	17 (15,2)	54 (24,3)	NS
Ativadores			
0	37 (33,0)	69 (31,1)	NS
1	16 (14,3)	36 (16,2)	NS
2	17 (15,2)	34 (15,3)	NS
3	22 (19,6)	25 (11,3)	NS
4	9 (8,0)	31 (13,9)	NS
5	11 (9,8)	27 (12,2)	NS

5.2.7 Frequências dos genes *KIR*, ligantes HLA, combinações de *KIR-HLA*, genótipos *KIR*, variantes de *KIR2DS4*, e número de genes *KIR* inibidores e ativadores nos subgrupos de pacientes.

Os pacientes foram divididos em grupos de acordo com a idade (>60 anos versus ≤60 anos), o sexo (sexo feminino versus sexo masculino), estágio clínico (pacientes com estágios avançados da doença versus pacientes com estágios não avançados da doença), presença de sintomas B versus sintomas A, LDH (Normal

versus alterada) e IPI (baixo e intermediário-baixo versus intermediário-alto e alto). A Análise dos ligantes HLA nos pacientes subdivididos de acordo com o estágio clínico Ann Arbor (Estádios I e II versus estádios III e IV) demonstrou que o ligante Bw4 e o ligante Bw4 com Isoleucina na posição 80 foram encontrados mais frequentes nos casos mais avançados de LDGCB (40,9 versus 64,7 respectivamente; (P=0,020; OR=0,4; IC95%=0,17-0,92.) e (25,0 versus 44,1 respectivamente; P=0,046; OR=0,42; IC95%=0,18-0,97). Os dados são apresentados na tabela 9. As demais análises não apresentaram resultados significativos.

Tabela 9- Distribuição dos ligantes nos pacientes com estádios avançados (n=68) e não avançados (n=44) do LDGCB

Ligantes	Pacientes estádios III-IV N(%)	Pacientes Estádios I-II N(%)	P
HLA-A3/A11	16 (23,5)	8(18,1)	NS
HLA-B Bw4^{*a}	44 (64,7)	18 (40,9)	0,019
HLA-B Bw4-80I^b	30(44,1)	11 (25,0)	0,046
HLA-B Bw4-80T	20(29,4)	9 (20,4)	NS
HLA-C1	51 (75,0)	38 (86,4)	NS
HLA-C2	51 (75,0)	30 (68,1)	NS

*Bw4 indica a presença de pelo menos um HLA-B Bw4-80I ou HLA-B Bw4-80T. NS= Não significativo ^aOR=2,65; IC95%=1,21-5,78. ^bOR=2,37; IC95%=1,03-5,45.

5.2.8 Análises de sobrevida global e sobrevida livre de progressão

A presença individual dos genes *KIR* ativadores ou inibidores, dos ligantes HLA, das combinações de genes *KIR* com ligantes HLA, número de genes *KIR* inibidores e ativadores, genótipos *KIR*, e pesquisa de deleção de 22 pares de

bases no gene *KIR2DS4* não tiveram impacto na sobrevida global e na sobrevida livre de progressão, tanto na análise univariada quanto multivariada de Cox. Entretanto, foram encontradas algumas tendências.

No Gráfico 1, pode-se observar uma tendência de menor sobrevida global nos pacientes com haplótipo A homozigoto (n=37), comparados a indivíduos com genótipos B/x (n=71) ($P= 0,081$).

A respeito dos genes *KIR*, individualmente, foi encontrada similar sobrevida livre de progressão nos pacientes com *KIR2DL3* ausente (n=17) comparado aos pacientes com *KIR2DL3* presente (n=91) ($P=0,094$) (Gráfico 2).

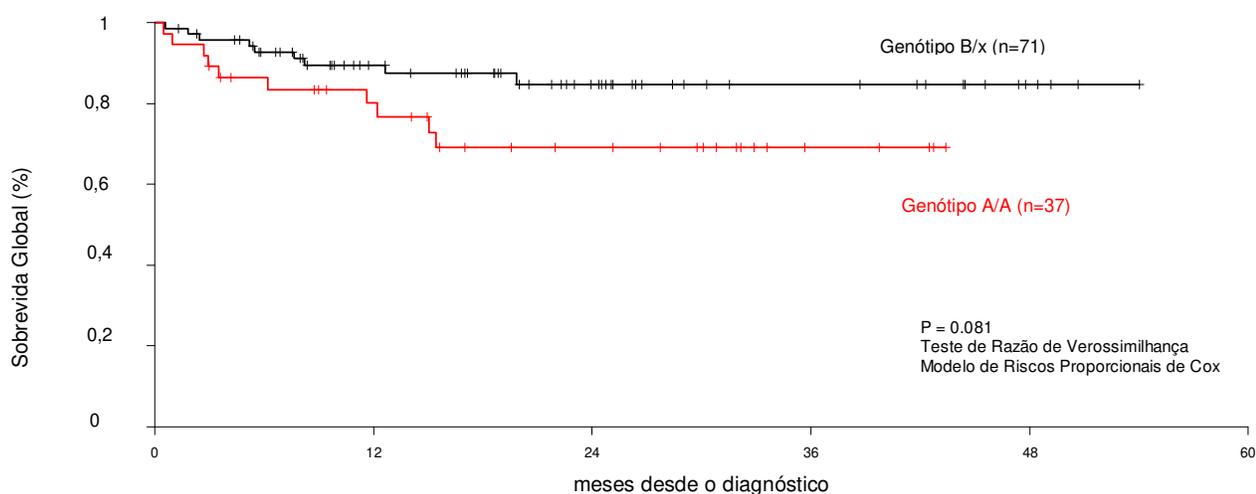


Gráfico 1. Sobrevida global nos pacientes com LDGCB de acordo com a presença dos genótipos A/A e B/x.

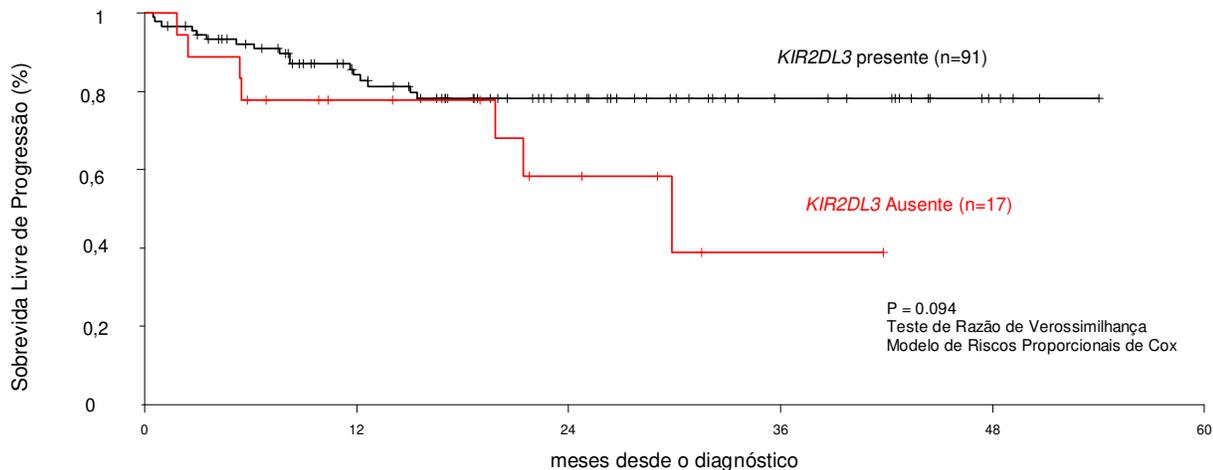


Gráfico 2. Sobrevida livre de progressão nos pacientes com LDGCB de acordo com a presença e ausência do gene *KIR2DL3*.

5.2.9. Análise dos genes *KIR*, ligantes HLA, combinações de *KIR* com *HLA*, genótipos de *KIR*, variantes de *KIR2DS4*, e número de genes *KIR* ativadores e inibidores com a resposta ao tratamento com RCHOP

Em relação aos genes *KIR* na evolução clínica do LDGCB, os pacientes foram divididos quanto a resposta ao tratamento com RCHOP em indivíduos com resposta completa (n=72) e indivíduos não respondedores (indivíduos em progressão da doença + indivíduos que faleceram + indivíduos que recidivaram n=25) foram avaliados quanto aos genes *KIR* e ligantes. O gene *KIR2DL3* foi encontrado mais frequente nos pacientes com resposta completa que nos indivíduos não respondedores, porém sem significância estatística. Os dados são apresentados na (Tabela 10).

Tabela 10. Distribuição dos genes *KIR* nos pacientes com LDGCB respondedores (N=72) respondedores (N=25) ao tratamento com RCHOP .

Genes <i>KIR</i>	Respondedores N (%)	Não Respondedores N (%)	<i>P</i>
<i>KIR2DL1</i>	69 (95,8)	25 (100,0)	NS
<i>KIR2DL2</i>	30 (41,7)	11 (44,0)	NS
<i>KIR2DL3^a</i>	65 (90,3)	19 (76,0)	0,09
<i>KIR2DL4</i>	72 (100,0)	25 (100,0)	NS
<i>KIR2DL5</i>	39 (54,1)	10 (40,0)	NS
<i>KIR2DP1</i>	70 (97,2)	25 (100,0)	NS
<i>KIR2DS1</i>	28 (38,9)	8 (32,0)	NS
<i>KIR2DS2</i>	35 (48,6)	11 (44,0)	NS
<i>KIR2DS3</i>	21 (29,2)	7 (28,0)	NS
<i>KIR2DS4</i>	63 (87,5)	23 (92,0)	NS
<i>KIR2DS5</i>	25 (34,7)	5 (20,0)	NS
<i>KIR3DL1</i>	65 (90,3)	24 (96,0)	NS
<i>KIR3DL2</i>	72(100,0)	25 (100,0)	NS
<i>KIR3DL3</i>	72(100,0)	25 (100,0)	NS
<i>KIR3DS1</i>	26 (36,1)	8 (32,0)	NS
<i>KIR3DP1</i>	72(100,0)	25 (100,0)	NS

As demais análises dos ligantes HLA nos pacientes respondedores *versus* não respondedores, bem como dos genes *KIR* em combinação com os ligantes HLA, do número de genes *KIR* ativadores e inibidores e dos genótipos A/A e B/x não demonstraram associação com a resposta ao tratamento.

5.3 INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS EM GENES DE CITOCINAS NO LDGCB.

5.3.1 Frequência dos genótipos de citocinas nos pacientes e nos controles

As frequências dos genótipos de citocinas estudadas (*TNF*³⁰⁸, *IFNG*⁺⁸⁷⁴, *IL6*⁻¹⁷⁴, *IL10*^{-1082, -819, -592} e *TGFB1*^{cd10, cd25}) estão apresentados na tabela 11. Os genótipos *IL10*-819/C:C e *IL10*-592/C:C foram mais frequentes nos controles que nos pacientes (45,5% versus 32,1 *P*=0,025).

Em nosso estudo também encontramos uma tendência com os genótipos *IL*-10-819/C:T e *IL*-10-592/C:A sendo mais frequentes nos pacientes que nos controles (51,8% versus 41,0; tendência *P*=0,063).

Em relação ao *IFNG*+874, o genótipo *IFNG*+874/A:A foi mais frequente nos pacientes que nos controles (50,9 versus 27,9, *P*= 0,001, respectivamente), sugerindo uma associação com a susceptibilidade ao desenvolvimento da doença, contrariamente, o genótipo *IFNG*+874/T:A foi mais frequente nos controles (52,7 versus 33,9, *P*= 0,001, respectivamente) caracterizando uma associação com maior proteção ao desenvolvimento de LDGCB. Pelos genótipos encontrados, é possível deduzir o fenótipo produtor de citocinas nos indivíduos^(78,85) sendo assim, a maioria dos pacientes possui o fenótipo baixo produtor de *IFNG*(A:A) (50,9 versus 27,9, *P*= 0,001, respectivamente) e a maioria dos controles possui o fenótipo produtor intermediário de *IFNG*(T:A) (52,7 versus 33,9, *P*= 0,001, respectivamente) (Tabela 12).

Em relação aos outros fenótipos analisados, as frequências nos pacientes e nos controles foram semelhantes. De um modo geral, pode-se constatar que a maioria dos pacientes e controles possuem os seguintes fenótipos: alto produtor de *IL*-6 (89,3% e 87,8%, respectivamente), alto produtor de *TGF*-β1 (72,3% e 72,5%, respectivamente) e baixo produtor de *TNF*-α (75,9% e 72,5%, respectivamente).

Tabela 11 - Distribuição das frequências genótípicas dos polimorfismos nos genes de citocinas nos pacientes com LDGCB (N=112) e nos doadores voluntários de sangue e medula óssea (N=222).

Polimorfismos	Genótipos	Pacientes N(%)	Controles N(%)	P
<i>TNF</i> ³⁰⁸	G:G	85(75,9)	161(72,5)	NS
	G:A	26(23,2)	54(24,3)	NS
	A:A	1(0,8)	7(3,2)	NS
<i>TGFB1</i> ^{cd10}	T:T	28(25,0)	66(29,7)	NS
	T:C	61(54,5)	106(47,8)	NS
	C:C	23(20,5)	50(22,5)	NS
<i>TGFB1</i> ^{cd25}	G:G	96(85,7)	197(88,7)	NS
	G:C	15(13,4)	22(9,9)	NS
	C:C	1(0,8)	3(1,3)	NS
<i>IL10</i> ¹⁰⁸²	A:A	49(43,8)	87(39,1)	NS
	G:A	55(49,1)	105(47,3)	NS
	G:G	8(7,1)	30(13,5)	NS
<i>IL10</i> ⁸¹⁹	C:C ^a	36(32,1)	101(45,5)	0,025
	C:T ^b	58(51,8)	91(41,0)	0,063
	T:T	18(16,1)	30(13,5)	NS
<i>IL10</i> ⁵⁹²	C:C ^c	36(32,1)	101(45,5)	0,025
	C:A ^d	58(51,8)	91(41,0)	0,063
	A:A	18(16,1)	30(13,5)	NS
<i>IL6</i> ⁻¹⁷⁴	G:G	59(52,7)	96(43,3)	NS
	G:C	41(36,6)	99(44,6)	NS
	C:C	12(10,7)	27(12,2)	NS
<i>IFNG</i> ⁺⁸⁷⁴	A:A ^e	57(50,9)	62(27,9)	0,001
	T:A ^f	38(33,9)	117(52,7)	0,001
	T:T	17(15,2)	43(19,4)	NS

^aOR= 0,57; IC95%=0,35-0,91.

^bOR= 1,55; IC95%=0,98-2,44.

^cOR= 0,57; IC95%=0,35-0,91.

^dOR= 1,55; IC95%=0,98-2,44.

^eOR= 2,67; IC95%=1,67-4,29.

^fOR= 0,46; IC95%=0,29-0,74.

Tabela 12 - Distribuição das frequências genótípicas dos polimorfismos nos genes de citocinas nos pacientes com LDGCB (N=112) e nos controles (N=222) de acordo com o fenótipo deduzido.

Polimorfismos	Genótipos	Fenótipo			P
		relativo (produção de citocinas)	Pacientes N(%)	Controles N(%)	
<i>TNF</i> ³⁰⁸	G:G	Baixa	85(75,9)	161(72,5)	NS
	G:A ou A:A	Alta	27(24,1)	61(27,5)	NS
<i>TGFB1</i> ^{-cd10, -cd25}	CC:CC ou CC:GC ou TT:CC ou TC:CC	Baixa	8(7,1)	14(6,3)	NS
	TC:GC ou CC:GG ou TT: GC	Intermediária	23(20,5)	47(21,2)	NS
	TT:GG ou TC:GG	Alta	81(72,3)	161(72,5)	NS
<i>IL10</i> ^{1082,-819,-592}	ACC:ACC ou ACC:ATA ou ATA:ATA	Baixa	49(43,8)	87(39,2)	NS
	GCC:ACC ou GCC:ATA	Intermediária	55(49,1)	105(47,3)	NS
	GCC:GCC	Alta	8(7,1)	30(13,5)	NS
<i>IL6</i> ¹⁷⁴	C:C	Baixa	12(10,7)	27(12,2)	NS
	G:C ou G:G	Alta	100(89,3)	195(87,8)	NS
<i>IFNG</i> ⁺⁸⁷⁴	A:A ^a	Baixa	57(50,9)	62(27,9)	0,001
	T:A ^b	Intermediária	38(33,9)	117(52,7)	0,001
	T:T	Alta	17(15,2)	43(19,4)	NS

^aOR= 2,67; IC95%=1,67-4,29.

^bOR= 0,46; IC95%=0,29-0,74.

5.3.2 Frequências dos genótipos de citocinas nos subgrupos de pacientes.

Não foram encontrados dados significativos nas análises dos genes de citocinas nos pacientes divididos nos grupos: idade (>60 anos n=60 *versus* ≤60 anos n=52), o sexo (sexo feminino n=57 *versus* sexo masculino n=55), estágio clínico (pacientes com estágios avançados da doença n=68 *versus* pacientes com estágios não avançados da doença n=44), presença de sintomas B n=75 *versus* sintomas A n=37, LDH (Normal n=53 *versus* alterada n=51) e IPI (baixo e intermediário-baixo n=70 *versus* intermediário-alto e alto n=33).

5.3.3 Análises de sobrevida global e sobrevida livre de progressão

A análise de sobrevida dos polimorfismos TNF^{-308} , $IFNG^{+874}$, $IL6^{-174}$, $IL10^{-1082, -819, -592}$ e $TGFB1^{cd10, cd25}$ demonstrou que no grupo de pacientes com o genótipo $IL10-1082G:G$ (n=8) apresentou maior sobrevida livre de progressão em relação a $IL10-1082G:A$ (n=52) e $IL10-1082A:A$ (n=48). Os dados são apresentados no gráfico 3. Os demais polimorfismos não tiveram impacto na evolução clínica do LDGCB baseada nas sobrevidas global e livre de progressão, bem como na resposta terapêutica nas análises univariadas e multivariadas de Cox.

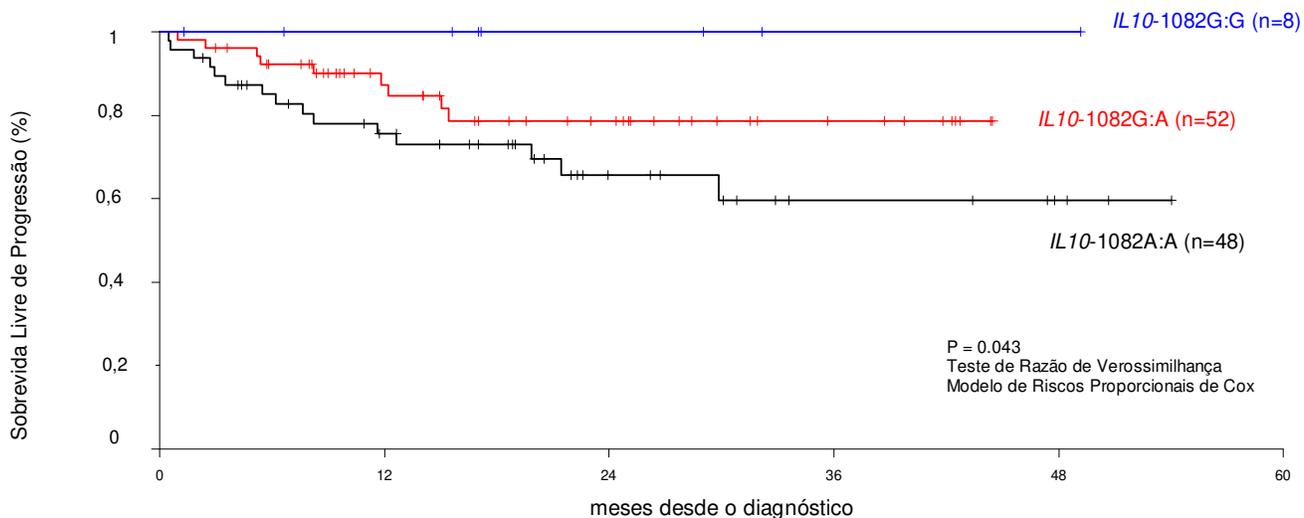


Gráfico 3. Sobrevida Livre de Progressão nos pacientes com LDGCB de acordo com os genótipos de $IL10^{1082}$.

Devido à escassez de dados relacionados aos genes *KIR* na população de Campinas e região, sentimos a necessidade de avaliar a distribuição desses genes nessa população. Sendo assim, como um adendo as análises do presente trabalho, foram determinadas as distribuições dos genes *KIR* na população de Campinas/SP (n=292) e comparadas com outras populações do Brasil e do Mundo.

5.4 DISTRIBUIÇÃO DOS GENES *KIR* NA POPULAÇÃO DE CAMPINAS/SP

5.4.1 Distribuição dos genes *KIR* na população de Campinas/SP

As frequências dos genes *KIR* na população de Campinas/SP (n=292) são apresentadas na Tabela 13. Os *frameworks genes*: *KIR2DL4*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* e *KIR3DP1* foram encontrados em todos os indivíduos. Os genes *KIR* inibidores: *KIR2DL1*, *KIR2DL3* e *KIR3DL1*, o gene ativador *KIR2DS4*, e o

pseudogene *KIR2DP1* apresentaram frequências próximas ou acima de 90%. Os genes ativadores *KIR2DS1*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5* e *KIR3DS1* apresentaram frequências abaixo de 40%. *KIR2DL2*, *KIR2DL5* e *KIR2DS2* apresentaram frequências intermediárias (entre 53% e 58%) e o gene ativador *KIR2DS5* apresentou menor frequência nessa população (30,8%).

As frequências encontradas foram comparadas as de outras populações da América do Norte, América Central e América do Sul, Europa, África, Ásia e Oceania e são apresentadas na Tabela 13. (107-117) Os genes *KIR* inibidores (*KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*), o *KIR2DS4* e o *KIR2DP1* apresentaram altas frequências em todas as populações.

Foram encontradas muitas diferenças na distribuição dos genes *KIR* na população brasileira em comparação com as outras populações descritas em estudos prévios. Especialmente em comparação com a população de Uganda, foram encontradas diferenças nas frequências dos genes *KIR2DL1*, *KIR2DL5* e *KIR2DS5* (menos frequentes na população brasileira) e dos genes *KIR2DS1*, *KIR2DS3* e *KIR3DS1* (mais frequentes na população brasileira).

Em relação aos genes inibidores, em comparação com a população estudada, *KIR2DL2* foi significativamente menos frequente em Ingleses ($P= 0,0001$) e Mexicanos ($P= 0,0135$). *KIR2DL1* foi encontrado em 95,5% da população brasileira (Campinas), em 84,1% dos indivíduos da Austrália ($P= 0,0038$), em 99,0% nos indivíduos do sudeste da África ($P= 0,002$) e em 99,2% dos indivíduos da China ($P= 0,009$). A frequência de *KIR2DL3* foi menor na população brasileira em relação às frequências da China ($P= 0,0001$), México ($P= 0,0008$) e Croácia ($P=0,02$).

Além disso, a frequência de *KIR2DL5* na população estudada foi de 53,8%, sendo significativamente menor quando comparada aos indivíduos do sudeste da África (65,0%, $P= 0,002$) e significativamente maior em comparação com indivíduos da China (37,6%, $P= 0,0001$).

Em relação aos genes que codificam receptores de ativação, foi observada grande variação em todas as populações listadas. O gene *KIR2DS1* foi menos frequente nos africanos do Sudeste da África ($P= 0,0001$), *KIR2DS2* e *KIR2DS3* foram menos frequentes nas populações chinesa ($P= 0,0001$, $P= 0,0001$, respectivamente) e Mexicana ($P=0,04$, $P=0,006$, respectivamente) e *KIR2DS3* e *KIR2DS5* também foram mais frequente em indivíduos do sudeste da África ($P= 0,0001$; $P= 0,0001$ respectivamente). Além disso, *KIR2DS5* foi menos frequente em indivíduos de Croácia ($P= 0,04$).

Considerando a grande diversidade genética na população brasileira, proveniente de uniões entre indivíduos de diferentes etnias, nós comparamos as frequências de genes *KIR* encontradas em indivíduos da cidade de Campinas, estado de São Paulo, com os de outros estados do Brasil, tais como, Paraná (Sul do Brasil), Rio Grande do Sul (Sul do Brasil), Minas Gerais (Sudeste do Brasil), Rondônia, Pará e Amazonas (Norte do Brasil) (Tabela 14).(118-124)

Tabela 13. Frequências dos genes *KIR* na população de Campinas (n = 292) e comparação dos dados observados com outras populações.

População	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	2DP1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DL1	3DL2	3DL3	3DP1	3DS1
Nosso estudo (fg)	0,8	0,36	0,65	1,00	0,32	0,82	0,22	0,35	0,18	0,76	0,17	0,77	1,00	1,00	1,00	0,19
(F%)	95,5	58,6	87,3	100	53,8	96,6	38,4	56,8	32,9	93,8	30,8	94,5	100	100	100	34,9
Argentina(n=402) ^a	96,0	56,0	87,0	100	56,0	96,0	46,0	55,0	29,0	95,0	36,0	95,0	100	100	NT	42,0
Italia (n=217) ^b	95,0	53,0	88,0	100	NT	NT	36,0	53,0	33,0	NT	28,0	96,0	100	100	100	35,0
França (n=108) ^c	97,0	50,0	91,0	100	47,0	97,0	36,0	51,0	31,0	96,0	27,0	96,0	100	100	NT	44,0
Inglaterra (n=136) ^d	91,0	49,0*	92,0	100	NT	NT	45,0	51,0	24,0	96,0	32,0	97,0	100	NT	NT	42,0
Estados Unidos (n=195) ^e	96,9	49,2	88,7	100	52,8	97,9	37,4	49,7	28,2	94,9	35,9	94,9	100	100	100	39,5
Uganda (n=492) ^f	99,0*	61,0	85,0	NT	65,0*	98,0	24,0*	54,0	24,0*	96,0	50,0*	98,0	NT	NT	NT	12,0*
Libano (n=120) ^g	99,2	59,5	88,3	100	58,3	NT	40,8	59,2	37,5	95,0	30,8	95,8	100	100	NT	35,8
Austrália (n=50) ^h	84,0*	50,0	90,0	100	NT	NT	52,0	50,0	28,0	90,0	NT	90,0	100	NT	NT	38,0
China (n=503) ⁱ	99,2*	20,7*	98,4*	100	37,6*	99,2	32,6	20,7*	18,5*	96,2	22,9	96,2	100	100	100	33,6
Mexico (n=86) ^j	100	43,0**	100*	100	49,0	97,0	42,0	44,0***	17,0**	97,6	40,0	99,0	100	100	100	42,0
Croacia (n = 121) ^k	95,0	55,0	95,0***	100	49,0	96,0	32,0	55,0	34,0	97,0	21,0***	96,0	100	100	100	31,0

^aFlores et al (107); ^bBontadini et al (108); ^cDenis et al 2005 (109); ^dNorman et al (110); ^eDu et al (111); ^fNakimuli et al (112); ^gMahfouz et al (113); ^hWitt et al (114); ⁱZhen et al (115); ^jGutiérrez-Rodríguez et al (116); ^kBurek et al (117). n= número de indivíduos; fg= frequência gênica obtida pela fórmula $fg=1-\sqrt{1-F}$; F= frequência observada. NT=Não tipificado. * $P\leq 0,005$; ** $P\leq 0,01$; *** $P<0,05$.

114

Tabela 14. Frequências dos genes *KIR* na região de Campinas e em 8 populações brasileiras

Populações brasileiras	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	2DP1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DL1	3DL2	3DL3	3DP1	3DS1
Nosso estudo (n=292)	95,5	58,6	87,3	100	53,8	96,6	38,4	56,8	32,9	93,8	30,8	94,5	100	100	100	34,9
Paraná, Norte e Noroeste(n=289) ^a	97,2	47,0*	89,3	100	52,6	96,9	40,8	47,1**	26,6	93,8	34,6	94,1	100	100	100	39,1
Paraná, Curitiba (n=164) ^b	97,4	59,4	84,6	100	51,9	94,7	42,1	59,2	32,5	93,6	31,9	92,7	100	100	NT	37,3
Minas Gerais (n=90) ^c	96,7	52,2	94,4	100	58,9	96,7	37,8	53,3	38,9	95,6	32,2	95,6	100	100	100	41,1
Rio Grande do Sul (n=200) ^d	98,0	56,0	84,0	100	54,0	100**	38,0	55,0	37,0	95,5	35,0	98,5	100	100	NT	39,6
Amazonia, Ameríndios (n=40) ^e	93,0	65,0	80,0	100	85,0*	NT	88,0*	58,0	10,0*	100	90,0*	65,0*	98,0	100	NT	70,0*
Rondônia, PK(n=55) ^f	85,5*	67,3	85,5	NT	NT	NT	80,0*	67,3	NT	NT	NT	81,8*	NT	NT	NT	80,0*
Rondonia, PS (46) ^f	97,8	26,1*	97,8**	NT	NT	NT	47,8	26,1*	NT	NT	NT	91,3	100	100	NT	30,4
Pará, Belém (n=347) ^g	96,3	75,0*	90,2	97,4	70,0*	97,0	43,0	42,4*	33,1	87,3*	54,2*	93,0	99,0	99,0	NT	56,0*

^aRudnick et al (118); ^bAugusto et al (119); ^cMiddleton et al (120); ^dJobim et al (121); ^eEwerton et al (122); ^fSingle et al (123); ^gPedroza et al (124).

* $P\leq 0,006$; ** $P<0,05$; PK= Província Karitiana; PS= Província Surui; NT= não tipificado.

As frequências de genes *KIR* encontradas na população do Estado de São Paulo (Campinas) foram semelhantes às encontradas em regiões vizinhas, tais como, Paraná (Curitiba) e Minas Gerais (Belo Horizonte). No entanto, foram encontradas algumas diferenças significativas entre a população estudada e as populações do Rio Grande do Sul, Rondônia, Paraná (cidades no norte e nordeste do Paraná), Pará e Amazônia.

As populações da região Norte do Brasil apresentaram distribuições diferentes em mais genes do que as populações da Região Sul do Brasil em comparação com a população estudada. Os índios da Amazônia apresentaram padrões distintos de distribuição com *KIR2DL5*, *KIR3DL1*, *KIR2DS1*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5* e *KIR3DS1* com diferenças notáveis comparadas a todas as outras populações. De fato, os ameríndios da Amazônia parecem formar um grupo diferente (122).

Em relação ao estado de Rondônia, *KIR2DL1* e *KIR3DL1* foram menos frequentes em indivíduos da província Karitiana e *KIR2DS1* e *KIR3DS1* foram mais frequentes. Na Província Surui *KIR2DL2* e *KIR2DS2* foram menos frequentes e *KIR2DL3* foi mais frequente. A população do Pará também apresentou diferenças nos genes *KIR2DL2*, *KIR2DL5*, *KIR2DS2*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5* e *KIR3DS1*.

Em relação as amostras do sul do Brasil (Norte e Noroeste do Paraná e Rio Grande do Sul), *KIR2DL2* e *KIR2DS2* foram menos frequentes em indivíduos do Norte e Noroeste do Paraná ($P= 0,006$ e $P= 0,02$), respectivamente) e *KIR2DP1* foi mais frequente em indivíduos do Rio Grande do Sul ($P= 0,03$).

5.4.2 Genótipos *KIR* na população de Campinas/SP

Os genótipos *KIR* foram definidos e identificados de acordo com o número de identificação dado pelo banco de dados do *Allele frequencies* www.allelefrequencies.net - (125). Até o momento, mais de 400 genótipos *KIR*

foram descritos em 137 populações na literatura consultada. Na população de Campinas, foram encontrados 45 perfis (figura 15), dos quais 13 genótipos responderam por 88,9% de todos os genótipos observados. Os restantes 32 genótipos tiveram uma frequência igual ou inferior a 1,0%. O genótipo AA foi o genótipo mais frequente (27,4%).

Augusto et al. (2012)⁽¹¹⁸⁾ compararam os genótipos de Curitiba e Belo Horizonte, em um estudo prévio, demonstrando similaridades entre essas populações. Considerando que também foram encontradas semelhanças entre essas populações e a população de Campinas, nós comparamos os genótipos dessas três populações e os dados são apresentados na figura 16. Estas três populações apresentaram 10 perfis em comum (*allele net database* IDs : 1, 4, 5, 2, 3, 6, 7, 9, 11 e 70), que foram os perfis mais frequentes nas três populações. Campinas e Curitiba tiveram 7 perfis comuns não encontradas em Belo Horizonte (*allele net database* IDs: 10, 15, 69, 71, 73, 81 e 106); Campinas e Belo Horizonte também tiveram 7 genótipos comuns não encontrados na população Curitiba (Frequência alélica IDs : 8, 13, 30, 72, 79, 90 e 228); Curitiba e Belo Horizonte tiveram 1 perfil em comum que não foi encontrado na população de Campinas (*allele net database* IDs : 27) e em nosso estudo 21 genótipos descritos não foram encontrados em Curitiba e Belo Horizonte (*allele net database* IDs : 12, 18, 19, 36, 46, 48, 57, 61, 68, 76, 80, 94, 97, 118, 159, 190, 204, 240, 293, 332 e 346).

2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	2DP1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DL1	3DL2	3DL3	3DP1	3DS1	ID (Allele Frequency Net database)	N	Frequência	Grupo de Haplótipos
																1	80	27.4	A/A
																4	36	12.3	B/x
																5	26	8.9	B/x
																2	24	8.2	B/x
																3	14	4.8	B/x
																6	13	4.5	B/x
																19	10	3.4	B/x
																71	10	3.4	B/x
																7	8	2.7	B/x
																73	8	2.7	B/x
																70	7	2.4	B/x
																9	4	1.4	B/x
																90	4	1.4	B/x
																13	3	1.0	B/x
																36	3	1.0	B/x
																68	3	1.0	B/x
																69	3	1.0	B/x
																72	3	1.0	B/x
																10	2	0.7	B/x
																11	2	0.7	B/x
																18	2	0.7	B/x
																57	2	0.7	B/x
																76	2	0.7	B/x
																97	1	0.3	B/x
																8	1	0.3	B/x
																12	1	0.3	B/x
																15	1	0.3	B/x
																30	1	0.3	B/x
																46	1	0.3	B/x
																48	1	0.3	B/x
																61	1	0.3	B/x
																79	1	0.3	B/x
																80	1	0.3	B/x
																81	1	0.3	B/x
																94	1	0.3	B/x
																106	1	0.3	B/x
																118	1	0.3	B/x
																159	1	0.3	B/x
																190	1	0.3	B/x
																204	1	0.3	B/x
																228	1	0.3	B/x
																240	1	0.3	B/x
																293	1	0.3	B/x
																332	1	0.3	B/x
																346	1	0.3	B/x

Figura 15. Perfis de genótipos *KIR* e frequências observadas na população brasileira. Retângulos cinzas indicam presença de genes e os retângulos brancos indicam ausência de gene; ID = os números de identificação de acordo com o banco de dados do www.allelefrequency.net, N = número de indivíduos com o perfil; F = Frequência, GH = grupo de haplótipos.

5.4.3 Frequências das variantes de *KIR2DS4* na população de Campinas/SP

Os genótipos AA (N=80) foram divididos em três grupos de acordo com o tipo de *KIR2DS4*. Os indivíduos que possuíam dois grupos de alelos com as sequencias completas de *KIR2DS4* foram denominados *KIR2DS4completos* e apresentaram frequência de 11,3%, os indivíduos que possuíam dois grupos de alelos com a deleção de 22pb foram denominados de *KIR2DS4del* e apresentaram frequência de 58,7%, e os indivíduos que eram heterozigotos, apresentando um grupo de alelos com a sequencia completa e outro com a variante deletada foram denominados *KIR2DS4completo/del* e foram encontrados em 30,0% dos indivíduos com genótipo AA.

Adicionalmente, a frequência de indivíduos carregando pelo menos uma variante deletada foi alta na população estudada (77,1%) e indivíduos com genótipo AA e sem *KIR2DS4* funcional (grupo del) foram 16,0% de toda a população.

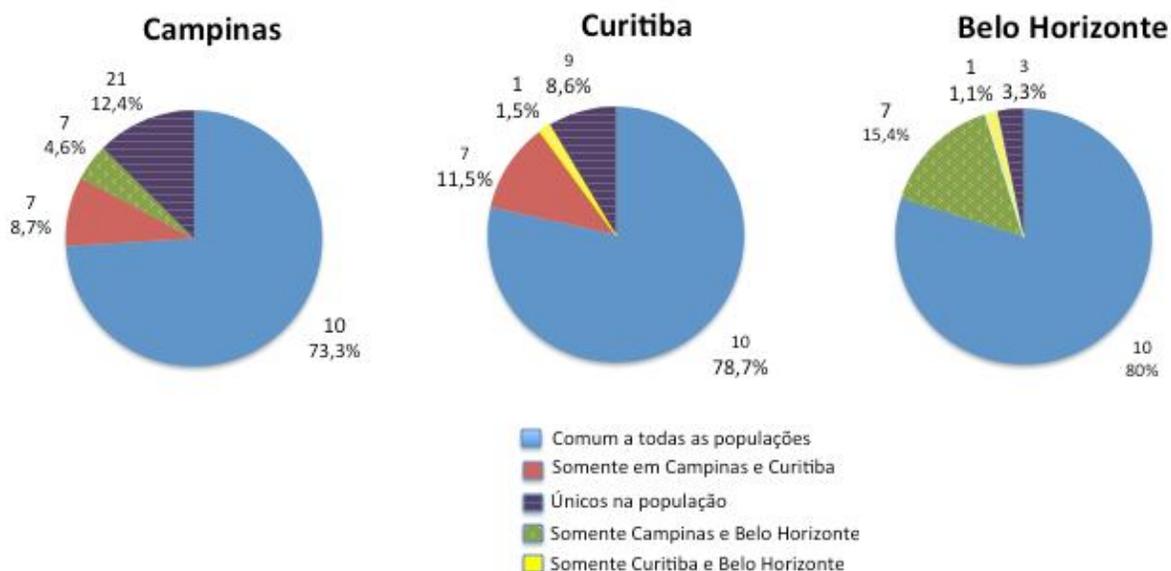


Figura 16. Perfis de genótipos *KIR* e frequências observadas na população de Campinas (n=292), Curitiba (n=164) Belo Horizonte (n=90)

5.4.4 Frequências dos ligantes HLA na população de Campinas/SP

Os indivíduos foram comparados de acordo com o repertório *KIR* e o repertório dos ligantes HLA. Os pares de receptor/ligante analisados foram: *KIR3DL1/3DS1* com Bw4, *KIR2DL2/3* e *KIR2DS2* com HLA-C1, *KIR2DL1/2DS1* com HLA - C2 e *KIR3DL2* com HLA-A3/A11.

Os resultados observados são apresentados na Tabela 15. A respeito dos ligantes, o HLA-C1 foi mais comum do que o ligante HLA-C2 (78,4% versus 66,7%). Bw4 foi encontrado em 61,9% dos indivíduos e HLA-A3/11 foi detectado em 29,7% das amostras.

As frequências observadas para os diferentes pares *KIR*+HLA na população do Sudeste do Brasil, da maior para a menor, foram as seguintes: *KIR2DL2/3* com C1 (78,4%), *KIR2DL1* com C2 (64,0%), *KIR3DL1* com Bw4 (58,2%), *KIR3DL2* com A3/11 (30,4%). Em relação aos genes de ativação em ordem decrescente foram: *KIR2DS2* com C1 (46,5%), *KIR2DS1* com C2 (23,3%) e *KIR3DS1* com Bw4 (19,9%).

Tabela 15 – Ligantes HLA e combinação dos genes *KIR* com seus respectivos ligantes.

Combinações de <i>KIR</i>	Indivíduos (N)	Frequência (%)
HLA- Ligantes		
A3/A11	87	29,7
Bw4	181	61,9
Bw480I	128	43,8
Bw480T	93	31,8
C1	229	78,4
C2	195	66,7
<i>KIR</i> e HLA ligantes		
Inibidores		
<i>KIR2DL1</i> + C2	187	64,0
<i>KIR2DL2</i> + C1	138	47,2
<i>KIR2DL3</i> + C1	199	68,1
<i>KIR2DL2/3</i> + C1	229	78,4
<i>KIR3DL1</i> + Bw4	170	58,2
<i>KIR3DL1</i> + Bw480I	119	40,7
<i>KIR3DL1</i> + Bw480T	88	30,1
<i>KIR3DL2</i> + A3/A11	89	30,4
Ativadores		
<i>KIR2DS1</i> + C2	68	23,3
<i>KIR2DS2</i> + C1	136	46,5
<i>KIR3DS1</i> + Bw4	58	19,9

5.4.5 Número de pares de *KIR* inibidores com seus respectivos ligantes.

Um a quatro pares de *KIR* inibidores/HLA ligantes foram determinados (Tabela 16). A presença de dois pares foi mais frequente (42,7%), seguido por três pares (32,6%), um par (16,5%) e quatro pares (7,9%). A maioria dos indivíduos (99,7%) teve pelo menos um ligante *KIR* inibidor. No entanto, um indivíduo (0,3%) apresentou os genes *KIR* inibidores: *KIR2DL2/3*, *KIR3DL1* e *KIR3DL2*, mas não apresentou os respectivos ligantes (HLA-C1, HLA-Bw4 e HLA-A3/A11).

Tabela 16. Combinação dos pares *KIR* + HLA e suas frequências na população de Campinas.

Número de pares	<i>KIR</i> +Ligantes HLA	Indivíduos (N)	Frequência (%)
0	Nenhum par	1	0.3
1	2DL2/3 + C1	32	16.5
	2DL1 + C2	14	
	3DL1 + Bw4	2	
	3DL2 + A3/A11	0	
2	2DL2/3 + C1 e 3DL1 + Bw4	43	42,7
	2DL2/3+ C1 e 2DL1 + C2	38	
	2DL1 + C2 e 3DL1+ Bw4	22	
	2DL2/3 + C1 e 3DL2 + A3/11	15	
	2DL1 + C2 e 3DL2 + A3/11	7	
	3DL1 + Bw4 e 3DL2 + A3/11	0	
3	2DL1 + C2 e 2DL2/3 +C1 e 3DL1 + Bw4	52	32.6
	2DL1 + C2 e 3DL1+ Bw4 e 3DL2 +A3/11	17	
	2DL2/3 + C1 e 3DL1 + Bw4 e 3DL2 + A3/11	11	
	2DL1+ C2 e 2DL2/3 + C1 e 3DL2+ A3/11	0	
4	2DL1 + C2 e 2DL2/3 + C1 e 3DL1 +Bw4 e 3DL2 +A3/11	23	7.9

5. Discussão

O presente estudo teve como objetivo buscar novos marcadores em genes da resposta imune capazes de prever susceptibilidade, melhor ou pior prognóstico e resposta ao tratamento do LDGCB. O desenvolvimento de LDGCB parece estar relacionado a respostas imunes ineficazes, devido a frequente associação desse linfoma com estados de imunossupressão.(2,19) Nesse contexto, as células envolvidas nas respostas imunológicas, tais como as células NK, que desempenham papel importante nesse processo.

Em condições normais, as células NK são tolerantes às células do próprio organismo pela interação de receptores inibidores (KIR e NKG2A) presentes na superfície dessas células com ligantes HLA. Diversas evidências sugerem que em muitas transformações malignas e infecções virais há diminuição da expressão de moléculas HLA nas células alteradas, na tentativa de escapar do sistema imunológico. Como descrito anteriormente, a ativação das células NK, por um lado, requer a ausência do ligante (hipótese *missing-self*) e por outro, pode ocorrer da interação de receptores KIR ativadores com os ligantes HLA. Esse balanço entre ativação e inibição da célula NK está diretamente relacionado às interações KIR-HLA, e varia de acordo com a afinidade da interação, bem como, da quantidade de interações.

As moléculas KIR e HLA são muito polimórficas, cujos genes estão localizados em diferentes cromossomos e segregam independentemente, gerando inúmeras possibilidades de combinações KIR-HLA.

Assim, muitos estudos têm investigado a diversidade dos genes *KIR* e *HLA* na susceptibilidade ou proteção de diversas malignidades, tais como câncer de mama,(126) melanoma,(62) carcinoma hepatocelular,(63) câncer cervical(64), leucemias linfóides(127) e mielóides,(128) porém, em linfomas, os dados são escassos.(67)

De acordo com a literatura consultada esse é o primeiro trabalho avaliando os genes *KIR* e *HLA* com a incidência de LDGCB. Em relação a esses

genes na susceptibilidade ao desenvolvimento de LDGCB, foi encontrada associação do gene *KIR2DL2* com proteção ao desenvolvimento de LDGCB, pois a frequência desse gene foi significativamente menor nos pacientes. Esse resultado manteve-se significativo também na análise com a presença do ligante HLA-C1, porém não foram encontradas associações desse gene nas análises de sobrevida e na resposta terapêutica, sugerindo que a presença do gene *KIR2DL2* individualmente ou com o respectivo ligante C1 têm influência na proteção ao desenvolvimento da doença, mas uma vez a doença instalada, não tem impacto na progressão.

Condizente com o resultado encontrado em nosso estudo, outro estudo avaliando genes da resposta imune em pacientes com vários tipos de LNH desenvolvidos pós-transplante, o genótipo *KIR2DL2/KIR2DS2* foi associado a maior proteção ao desenvolvimento de LNH em uma análise exploratória, porém, após análise de validação essa associação perdeu significância.(67)

O gene *KIR2DL2* frequentemente é relatado conjuntamente ao *KIR2DS2* em estudos de associações, devido a esses dois genes estarem em forte desequilíbrio de ligação(129) No presente trabalho, apesar desses genes estarem em desequilíbrio, o gene *KIR2DS2* apresentou-se ligeiramente mais frequente que *KIR2DL2* nos pacientes, e a comparação de *KIR2DS2* entre pacientes e controles apresentou apenas uma tendência com esse gene sendo mais frequente nos controles($P= 0,08$).

No estudo de Stern et al (67) a presença do genótipo *KIR2DL2/KIR2DS2* foi relacionada à menor sobrevida nos pacientes. (67) infelizmente, não conseguimos confirmar essa associação.

O gene *KIR2DL2* é um gene de inibição que tem sido descrito em associação com outros cânceres. (127,128) Em um estudo avaliando os genes *KIR* em pacientes com leucemia mieloide crônica (LMC) foi encontrada associação de *KIR2DL2* e ou *KIR2DS2* com o ligante C1 como fator de proteção ao

desenvolvimento de LMC.(128) Esse resultado, apesar de ser encontrado com LMC é condizente com o modelo apresentado no nosso estudo, porém, no presente estudo o gene *KIR2DS2* não apresentou resultados significativos, apenas tendências.

A redução na presença de *KIR2DL2* encontrada nos pacientes com LDGCB pode indicar maior propensão dos pacientes a terem haplótipos A que haplótipos B,(130) porém não foram encontradas associações significativas com o genótipo AA (haplótipo A homocigoto). Esse genótipo foi apenas sutilmente mais frequente nos pacientes quando comparados aos controles (33,0% versus 28,4% respectivamente). Por outro lado, o genótipo AA apresentou uma tendência na análise de sobrevida, sendo relacionado à menor sobrevida global nos pacientes, entretanto não tivemos poder estatístico para confirmar essa associação.

Como descrito anteriormente, estudos avaliando *KIR* e linfomas são escassos. Besson et al. (65) em um estudo familiar, avaliaram os genes *KIR* em pacientes com linfoma de Hodgkin e encontraram associação de *KIR3DS1* e *KIR2DS1* e proteção da doença. Outro estudo avaliou pacientes com linfoma folicular e não encontrou associação dos genes *KIR* com susceptibilidade ou proteção ao desenvolvimento de linfoma folicular.(66) Entretanto o número de pacientes (n=20) e controles (n=62) avaliados nesse estudo foi muito pequeno.

Em relação aos ligantes HLA, foi encontrada associação do ligante HLA-Bw4 e HLA-Bw480I com estádios mais avançados da doença. O ligante HLA-Bw4 é o ligante do receptor *KIR3DL1* e as moléculas HLA-Bw4 de acordo com determinados aminoácidos presentes na posição 80, apresentam diferentes afinidades pelo *KIR3DL1* (HLA-Bw4 com Treonina na posição 80 possui menor afinidade e HLA-Bw4 com Isoleucina na posição 80 possui maior afinidade).(53,54) Nesse contexto, talvez a frequência aumentada do ligante HLA-Bw4 encontrada nos pacientes em estádios avançados esteja relacionada à maior inibição da célula NK, bem como pior resposta imune.

Em relação à resposta ao tratamento, diversos estudos tem demonstrado um importante papel da ADCC mediada por NK na atividade antitumoral do Rituximabe.(131-135) Borgerding et al (136) avaliaram a influência da interação KIR/*HLA* na eficácia da ADCC induzida pelo Rituximabe em modelo *in vitro* e demonstraram que a interação *HLA* com ligantes KIR inibidores (KIR2DL1 com C2 e KIR2DL2/KIR2DL3 com C1) influenciam negativamente a ADCC, de forma que a ausência do ligante ou diminuição na expressão do ligante permite uma ativação da células NK com melhor ADCC.

No presente trabalho, foi encontrada tendência do gene *KIR2DL3* com melhor resposta ao tratamento. Dos receptores inibidores com 2 domínios extracelulares, o receptor KIR2DL3 é o que possui a interação mais fraca com o seu ligante. Em ordem decrescente: KIR2DL1 com ligante C2 é o mais forte, seguido de KIR2DL2 com C1 e por último o KIR2DL3 com C1).(55, 137) Nesse contexto, talvez, a interação do gene *KIR2DL3* com o ligante seja mais fácil de ser interrompida mediante um sinal ou vários sinais ativadores. Essa hipótese tem sido descrita em outros estudos que também encontraram esse gene associado a melhores resultados com outras doenças. (138)

Em relação aos dados de sobrevida, diversos estudos encontraram associação dos genes *KIR* com melhor ou pior prognósticos em diversas doenças.(126,127) No modelo com LDGCB, entretanto, não conseguimos encontrar dados significativos. Observamos apenas uma tendência com maior sobrevida livre de progressão nos pacientes com *KIR2DL3* presente. Considerando que *KIR2DL3* foi mais frequente nos pacientes com melhor resposta ao tratamento é plausível que os indivíduos que apresentem esse gene tenham também melhor sobrevida.

Funcionalmente e fenotipicamente, as células NK podem ser divididas em dois tipos. O subtipo CD56^{dim} representa as células responsáveis pela citotoxicidade natural e ADCC, são encontradas mais comumente no sangue periférico e baço e são as células envolvidas no mecanismo de ação do

Rituximabe, e o subtipo (CD56^{bright}) que é encontrado principalmente nos linfonodos e em tecidos linfoides associados a mucosas, as células deste tipo funcionalmente produzem citocinas em abundância, incluindo TNF e IFN- γ , e via produção de citocinas, influenciam a resposta Th1, ativam células apresentadoras de antígenos, e reprimem a proliferação de células transformadas.(132)

A produção e expressão de diversas citocinas têm sido relacionadas a polimorfismos específicos em regiões promotoras e reguladoras de genes de citocinas.(86, 93, 105, 139-140) Além disso, estes polimorfismos têm sido associados ao desenvolvimento ou progressão do LDGCB. (85,88-90)

No presente estudo, as análises dos polimorfismos de genes reguladores de TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10 e TGF- β 1 e de sua possível influência na susceptibilidade e curso clínico do LDGCB demonstraram que o polimorfismo *IFNG*+874, o qual tem sido associado aos níveis de produção de IFN- γ ,(97) parece ter impacto no desenvolvimento de LDGCB, pois foram encontradas associações de *IFNG*+874/A:A (baixo produtor) com susceptibilidade ao desenvolvimento da doença, e do genótipo *IFNG*+874/T:A (produtor intermediário) com maior resistência ao desenvolvimento de LDGCB.

Este resultado é semelhante a outro estudo, no qual o genótipo *IFNG*+874/A:A foi relacionado a maior risco de desenvolver desordens linfoproliferativas pós-transplante.(141) Contrariamente Stern et al (67) não encontrou associação de IFN com risco de LNH pós-transplante, nem com melhor ou pior sobrevida.

Em relação a IL-10, os polimorfismos *IL10*^{-1082, -819, -592}, foram relacionados com a produção desta citocina, e os estudos avaliando esses polimorfismos têm relatado resultados inconsistentes.(141-143) As associações mais comumente descritas correlacionaram o alelo -1082G (genótipos GG:GA) e -3575T:A com o risco de desenvolver LDGCB.(74, 143-145) Entretanto, inúmeros outros estudos falharam em confirmar essa associação.(146,147) No presente

estudo, não foi encontrada correlação dos genótipos *IL10-1082/GG:GA* com o risco de desenvolver LDGCB. Entretanto, os genótipos *IL10-819/C:C* (rs1800871) e *IL10-592/C:C* (rs1800872) foram correlacionados a proteção ao desenvolvimento de LDGCB. Além disso, foi encontrada associação do genótipo *IL10-1082G:G* com melhor sobrevida livre de progressão. Semelhante a esse resultado Lech-Maranda et al. (148) encontraram associação dos genótipos *IL10-1082/GG:GA* com melhor sobrevida global e melhor taxa de remissão completa e mostraram que os genótipos *IL10-819/C:C* e *IL10-592/C:C* foram correlacionados com os níveis séricos elevados de IL-10 em pacientes com LDGCB.

Alguns autores têm relatado correlações do genótipo *TNF⁻³⁰⁸*, referente à alta produção de TNF- α , com maior risco de desenvolver LNH, particularmente o LDGCB.(145,149,150) No entanto os resultados obtidos neste e em outros estudos mostraram que o polimorfismo *TNF⁻³⁰⁸* não havia influenciado no desenvolvimento de LDGCB.

Em relação a IL-6 o polimorfismo no gene *IL6⁻¹⁷⁴* foi associado a transcrição e expressão de IL-6 e vários estudos sugerem o envolvimento dessa citocina nos linfomas.(151-153) Pacientes com níveis elevados de IL-6 têm apresentado menores sobrevidas globais comparados a pacientes com níveis normais(151-153,154) e o genótipo rs1800796 foi associado a menor risco de morte.(155) Entretanto, no presente estudo não foi possível mostrar uma correlação genética do polimorfismo desta citocina com desenvolvimento e progressão do LDGCB e esse resultado está de acordo com Lan et al. (74), que também não encontrou associações com esse polimorfismo.

TGF- β 1 é uma citocina multifuncional anti-inflamatória que tem participação em diferentes situações fisiológicas incluindo: controle de ciclo celular, controle da hematopoiese, diferenciação celular, angiogênese, indução de apoptose e formação de matriz celular.(91-93) Nos LNH, a expressão desta citocina vem sendo associada à linfomas mais agressivos e o genótipo alto produtor desta citocina foi associado a prognósticos desfavoráveis.(156-158)

Entretanto, no presente estudo, não foi observado impacto dos genótipos de *TGFB1* no LDGCB.

Em relação à distribuição dos genes *KIR* na população de Campinas/SP, não surpreendentemente, as frequências de genes encontrados na população do Sudeste do Brasil foram semelhantes as relatadas em outras populações caucasianas, tais como Argentina, Itália, França e Estados Unidos, e também semelhantes a população libanesa. Por outro lado, diferenças consideráveis foram encontradas em determinados genes *KIR* com resultados notáveis comparando principalmente a população de Campinas com populações distantes da Ásia e sudeste da África e indígenas.

O genótipo AA que corresponde ao haplótipo A homocigoto foi o mais frequente, encontrado em 27,4% da população e este resultado é semelhante aos resultados observados em outras populações, com exceção dos ameríndios da Amazônia que têm frequência muito baixa desse perfil (2,5%, $P < 0,0001$) e asiáticos que têm uma frequência muito alta deste perfil (Chinês 56,0%, $P < 0,0001$).

Em relação às regiões brasileiras Campinas apresentou padrão de distribuição dos genótipos *KIR* semelhante ao de outras cidades urbanas e vizinhas (Curitiba e Belo Horizonte) com muitos genótipos comuns às três populações, porém 21 genótipos foram descritos somente na população de Campinas. Destes 21 genótipos encontrados na população de Campinas, 12 foram previamente descritos em outras populações brasileiras (www.allelefrequencies.net), entretanto 9 genótipos nunca haviam sido descritos em populações brasileiras e alguns deles são raros em europeus ou euro-descendentes (www.allelefrequencies.net) com distribuição restrita a regiões distantes do mundo.

Estas proporções de genótipos comuns e únicos para cada grupo analisado pode ser explicado pela intensa miscigenação da população brasileira, que é resultado de diversas uniões interétnicas de nativos locais com imigrantes

européus e asiáticos que vieram ao país nos últimos 5 séculos (118,119,121).

Em relação aos pares de genes inibidores um indivíduo apresentou os genes *KIR* inibidores: *KIR2DL2/3*, *KIR3DL1* e *KIR3DL2* mas não apresentou os respectivos ligantes (HLA-C1, HLA-Bw4 e HLA-A3/A11).

Na população do Norte e do Nordeste PR, também foi encontrado um indivíduo com os mesmos genes *KIR* e sem os respectivos ligantes.(118) Aparentemente, não ter nenhum par de ligante inibidor não é um problema, pois, há outros receptores inibidores presentes na célula NK.(46,120)

7. Conclusão

A investigação dos genes *KIR*, dos ligantes HLA de classe I e dos complexos *KIR-HLA* não demonstrou nenhuma associação de susceptibilidade ao desenvolvimento de LDGCB, mas o gene *KIR2DL2* com ou sem a presença do ligante C1 foi correlacionado a proteção ao desenvolvimento de LDGCB.

A avaliação da evolução clínica dos pacientes demonstrou associação dos ligantes HLA-Bw4 e HLA-Bw4 80I com estádios mais avançados da doença, entretanto, não foram encontradas associações com sobrevida global ou sobrevida livre de progressão.

Na avaliação dos pacientes de acordo com a resposta terapêutica houve uma tendência da presença de *KIR2DL3* estar relacionada a melhor resposta terapêutica.

Em relação à avaliação genética dos polimorfismos em genes reguladores de citocinas foram encontradas associações de *IFNG+874/A:A* (baixo produtor) com susceptibilidade ao desenvolvimento da doença, e do genótipo *IFNG+874/T:A* (produtor intermediário) e dos genótipos *IL10-819/C:C* (rs1800871) e *IL10-592/C:C* (rs1800872) com proteção ao desenvolvimento de LDGCB.

A avaliação dos polimorfismos em genes de citocinas na evolução clínica do LDGCB demonstrou o genótipo *IL10-1082G:G* com melhor sobrevida livre de progressão.

Em relação à avaliação da resposta terapêutica, não foi encontrada nenhuma associação dos polimorfismos de citocinas com melhor ou pior resposta ao tratamento.

As distribuições dos genes *KIR* na região Sudeste do Brasil foram semelhantes as de outras populações caucasóides, com algumas diferenças interessantes.

Desta forma, baseado nos resultados, os genes *KIR* e os polimorfismo de citocinas parecem ter influência no LDGCB.

No futuro, novas análises dos genes *KIR* e dos polimorfismos em genes de citocinas envolvendo um número maior de indivíduos poderão confirmar esses resultados e talvez possam contribuir para explicar melhor a magnitude da resposta imune em pacientes com LDGCB.

8. Referências

1. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of

the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the clinical advisory committee meeting –Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol*. 1999;17(3):835-49.

2. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2008. 439p.

3. Clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non Hodgkin's lymphoma. The non-Hodgkin's lymphoma classification project. *Blood*. 1997;89:3909–18.

4. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Neyman N, Altekruse SF, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010, National Cancer Institute. Bethesda, MD;2013. [capturado 18 Dezembro de 2014] Disponível em: <http://seer.cancer.gov/csr/19752010/>.

5. Fisher SG, Fisher RI. The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene*. 2004;23(38):6524–34.

6. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics 2007. *CA Cancer J Clin*. 2007;57(1):43-66.

7. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Linfoma não- Hodgkin. [online]. Rio de Janeiro, Brasil; 2009. [capturado 18 Dezembro de 2014] Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp

8. Martelli M, Ferreri AJ, Agostinelli C, Di Rocco A, Pfreundschuh M, Pileri SA. Diffuse large B-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013;87(2):146-71.

9. Leval L, Hasserjian RB. Diffuse Large B- Cell Lymphomas and Burkitt Lymphoma. *Hematol Oncol Clin N Am*. 2009; 23:791–827.

10. Skarin AT, Dorfman, DM. Non-Hodgkin's Lymphomas:Current Classification and Management. *CA Cancer J Clin*. 1997;47:351-72.

11. Said J. Diffuse Aggressive B-cell Lymphomas. *Adv Anat Pathol*. 2009; 16(4):216-35.

12. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the committee on Hodgkin lymphoma staging classification. *Cancer Res.* 1971;31:1860–1.
13. Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, Glatstein E, Canellos GP, Young RC, et al. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: cotswolds meeting. *J Clin Oncol.* 1989;7(11):1630–6.
14. No author listed. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The international non-Hodgkin's lymphoma prognostic factors project. *N Engl J Med.* 1993;329(14):987–94.
15. Blinder V, and Fisher SG, The Role of Environmental Factors in the Etiology of Lymphoma. *Cancer Invest.* 2008;26:306–16,
16. Leval L, Hasserjian RB. Diffuse Large B- Cell Lymphomas and Burkitt Lymphoma. *Hematol Oncol Clin N Am.* 2009; 23:791–827.
17. Carbone A, Cesarman E, Spina M, Gloghini A, Schulz TF. HIV-associated lymphomas and gamma-herpesviruses. *Blood.* 2009;113:1213-24.
18. Chiu BC, Weisenburger DD. An update of the epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Lymphoma.* 2003;4:161-8.
19. Ekstrom-Smedby K. Epidemiology and etiology of non-Hodgkin lymphoma – a review. *Acta Oncol.*2006;45, 258–71.
20. Grulich AE, van Leeuwen MT, Falster MO, Vajdic CM. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet.* 2007;370:59–67.
21. Juszczynski P, Nowak J, Warzocha K. Host immune response in B-cell lymphomas: friend or foe? *Arch Immunol Ther Exp.*2008;56(4):245-55.
22. Souza CS. Aggressive non-Hodgkin's lymphoma therapeutic considerations of pre Rituximabe era. *Braz J Infect Dis.* 2005; 9(5):430-41.

23. Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, et al. CHOP chemotherapy plus rituximabe compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002;346(4):235–42.
24. Cheung MC, Haynes AE, Meyer RM, Stevens A, Imrie KR. Members of the Hematology, Disease Site Group of the Cancer Care Ontario Program in Evidence-Based Care. Rituximabe in lymphoma: a systematic review and consensus practice guideline from Cancer Care Ontario. *Cancer Treat Rev.* 2007;33(2):161-76.
25. Winter MC, Hancock BW. Ten years of rituximabe in NHL. *Expert Opin Drug Saf.* 2009;8(2):223-35.
26. Feugier P, Van Hoof A, Sebban C, Solal-Celigny P, Bouabdallah R, Fermé C et al. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol.* 2005;23(18):4117–26.
27. Hagemester F. Rituximabe for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs.* 2010;70(3):261-72.
28. Bello C, Sotomayor EM. Monoclonal antibodies for B-cell lymphomas: rituximabe and beyond. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2007;233-42.
29. Sonet A, Bosly A. Rituximabe and chemotherapy in diffuse large B-cell lymphoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2009;9(6):719-26.
30. Keating GM. Rituximabe: A Review of its Use in Chronic Lymphocytic Leukaemia, Low-Grade or Follicular Lymphoma and Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Drugs.* 2010;70(11):1445-76.
31. Vega MI, Huerta-Yopez S, Martinez-Paniagua M, Martinez-Miguel B, Hernandez-Pando R, González-Bonilla CR et al. Rituximabe-mediated

cell signaling and chemo/immunosensitization of drug-resistant B-NHL is independent of its Fc functions. *Clin Cancer Res.* 2009;15(21):6582-94.

32. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Imunidade natural. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular E Molecular*. Editora Revinter Capítulo 5; 6ª Edição. Rio de Janeiro; 2007. P.19-46.

33. Amiot L, Onno M, Lamy T, Dauriac C, Le Prise PY, Fauchet R. et al. Loss of HLA molecules in B lymphomas is associated with an aggressive clinical course. *Br J Haematol.* 1998;100:655–63.

34. Shen L, Chiang AK, Liu WP, Li GD, Liang RH, Srivastava G. Expression of HLA class I, beta(2)-microglobulin, TAP1 and IL-10 in Epstein-Barr virus-associated nasal NK/T-cell lymphoma: Implications for tumor immune escape mechanism. *Int J Cancer.* 2001;92(5):692-6.

35. Kärre K. NK cells, MHC, Class I molecules and the missing-self. *Scand J Immunol.* 2002; 55:221-8.

36. Vivier E. What is natural in natural killer cells? *Immunol Lett.* 2006;107:1–7.

37. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science.* 2011; 331(6013): 44-9.

38. Parham P. Killer cell immunoglobulin-like receptor diversity: balancing signals in the natural killer cell response. *Immunol Lett.* 2004;92:11–3.

39. Moretta A, Tambussi G, Bottino C, Tripodi G, Merli A, Ciccone E, et al. Novel Surface antigen expressed by a subset of human CD3-CD16+ Natural Killer cells *J Exp med.* 1990; 171:695-714.

40. Carrington M, Norman P. The Kir Gene Cluster. 2003 [Acesso em 30 Out. 2013] Disponível Em: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10134/#A25>

41. Raulet DH, Vance RE, McMahon CW. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Ann rev immunol.* 2001;19:291-30.
42. Bashirova AA, Martin MP, Mcvicar DW, Carrington M. The Killer Immunoglobulin-Like Receptor Gene Cluster: Tuning The Genome For Defense. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2006;7:277–300.
43. Middleton D, Williams F, Halfpenny IA. Kir Genes. *Transp Immunol.* 2005;1(4):135-42.
44. Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Corliss B et al. Human Diversity in Killer Cell Inhibitory Receptor Genes *Immun.* 1997;7:753–63.
45. Hsu KC, Liu XR, Selvakumar A, Mickelson E, O'Reilly RJ, Dupont B. Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *J Immunol.* 2002;169:5118–29.
46. Maxwell LD, Wallace A, Middleton D, Curran MDA. Common KIR2DS4 deletion variant in the human that predicts a soluble KIR molecule analogous to the KIR1D molecule observed in the rhesus monkey. *Tissue Antigens.* 2002;60:254–8.
47. Khakoo SI, Carrington M. KIR and disease: A model system or system of models?. *Immunol Rev.* 2006;214:186–201.
48. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. O complexo principal de Histocompatibilidade. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular E Molecular.* 6ª Edição. Rio de Janeiro. Editora Revinter; 2007. P.97-113.
49. Dohring C, Scheidegger D, Samaridis J, Cella M, Colonna M. A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A1,2. *J Immunol.* 1996;156(9):3098–101.

50. Muller CA, Blum E, Gekeler V, Steiert I, Weiss E, Schmidt H. Genetic and serological heterogeneity of the supertypic HLA-B locus specificities Bw4 and Bw6. *Immunogenetics*. 1989;30:200–7.
51. Gumperz JE, Litwin V, Phillips JH, Lanier LL, Parham P. The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor. *J Exp Med*. 1995;181:1133–44.
52. Stern M, Rugger Li, Capanni M, Mancusi A, Velardi A. Human leukocyte antigens A23, A24, and A32 but not A25 are ligands for KIR3DL1. *Blood*. 2008;112(3):708-10.
53. Rojo S, Wagtmann N, Long EO. Binding of a soluble p70 killer cell inhibitory receptor to HLA-B*5101: requirement for all three p70 immunoglobulin domains. *Eur J Immunol*. 1997;27:568–71.
54. Cella M, Longo A, Ferrara GB, Strominger JL, Colonna M. NK3-specific natural killer cells are selectively inhibited by Bw4-positive HLA alleles with isoleucine 80. *J Exp Med*. 1994;180:1235–42.
55. Kulkarni S, Martin MP, Carrington M. The yin and yang of HLA and KIR in human disease. *Semin Immunol*. 2008;20:343–52.
56. Winter CC, Gumperz JE, Parham P, Long EO, Wagtmann N. Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. *J Immunol*. 1998;161:571–7.
57. Colonna M, Borsellino G, Falco M, Ferrara GB, Strominger JL. HLA-C is the inhibitory ligand that determines dominant resistance to lysis by NK1- and NK2-specific natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:12000–4.
58. Wagtmann N, Rajagopalan S, Winter CC, Peruzzi M, Long EO. Killer cell inhibitory receptors specific for HLA-C and HLA-B identified by direct binding and by functional transfer. *Immunity*. 1995;3:801–9.

59. Rajagopalan S, Long EO. A Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all Natural killer cells. *Journal Exp Med*. 1999;189(7):1093-100.
60. Katz G, Markel G, Mizrahi S, Arnon Ti, Mandelboim O. Recognition Of HLA-C*4 but not HLA-C*6 by the NK cell receptor killer cell ig-like receptor two domain short tail number 4. *J Immunol*. 2001;166 (12):7260–7.
61. Zhang Y, Wang B, Ye S, Liu S, Liu M, Shen C et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor gene polymorphisms in patients with leukemia: possible association with susceptibility to the disease. *Leuk Res*. 2010;34(1):55-8.
62. Naumova E, Mihaylova A, Stoitchkov K, Ivanova M, Quin L, Toneva M. Genetic polymorphism of NK receptors and their ligands in melanoma patients: prevalence of inhibitory over activating signals. *Cancer Immunol Immunother*. 2005;54:172-78.
63. Lopez-Vazquez A, Rodrigo L, Martinez-Borra J, Perez R, Rodriguez M, Fdez-Morera JL et al. Protective effect of the HLA-Bw4I80 epitope and the killer cell immunoglobulin-like receptor 3DS1 gene against the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection. *J Infect Dis*. 2005;192:162–5.
64. Carrington M, Wang S, Martin MP, Gao X, Schiffman M, Cheng J et al. Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. *J Exp Med* 2005; 201:1069–75.
65. Besson C, Roetynck S, Williams F, Orsi L, Amiel C, Lependeven C, et al. Association of killer cell immunoglobulin-like receptor genes with Hodgkin's lymphoma in a familial study. *PLoS One*. 2007;2:e406.

66. Khalaf R, Hoteit R, Yazbek S, El Hajj N, Otrrock Z, Khansa S. Natural Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR) genotypes in Follicular Lymphoma patients: results of a pilot study. *Gene*. 2013;525(1):136-40.
67. Stern M, Opelz G, Dohler B, Hess C. Natural killer–cell receptor polymorphisms and posttransplantation non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2010;115(19):3960-5.
68. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Ativação dos linfócitos T. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular E Molecular*. 7ª Edição. Rio de Janeiro; Editora Revinter; 2012. P. 203-224.
69. Cherwinsk HM, Schumacher JH, Brown KD, Mosmann TR. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J Exp Med*. 1987;166(5):1229-44.
70. Brown KD, Zurawski SM, Mosmann TR, Zurawski G. A family of small inducible proteins secreted by leukocytes are members of a new superfamily that includes leukocyte and fibroblast-derived inflammatory agents, growth factors, and indicators of various activation processes. *J Immunol*. 1989;142(2):679-87.
71. Hofmann SR, Ettinger R, Zhou YJ, Gadina M, Lipsky P, Siegel R et al. Cytokines and their role in lymphoid development, differentiation and homeostasis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2002;2:495-506.
72. Lucey DR, Clerici M, Shearer GM. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clin Microbiol Rev*. 1996;9:532-62.
73. Lehrnbecher T, Bernig T, Hanisch M, Koehl U, Behl M, Reinhardt D et al. Common genetic variants in the interleukin-6 and chitotriosidase

genes are associated with the risk for serious infection in children undergoing therapy for acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2005;19:1745-50.

74. Lan Q, Zheng T, Rothman N, Zhang Y, Wang SS, Shen M. Cytokine polymorphisms in the Th1/Th2 pathway and susceptibility to non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2006;107(10):4101-8.

75. Miyajima, A. Kitamura T, Harada N, Yokota T, Arai K. Cytokine receptors and signal transduction. *Annu Rev Immunol*. 1992;10:295-331.

76. Kishimoto T, Taga T, Akira S. Cytokine signal transduction. *Cell*. 1994;76(2):253-62.

77. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Citocinas. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular E Molecular*. 7ª Edição. Rio de Janeiro; Editora Revinter; 2012. P. 501-4.

78. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 2001. [Acesso em Out 2012] Disponível em: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10757/>

79. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:683-765.

80. Kovacs E. Interleukin-6 leads to interleukin-10 production in several human multiple myeloma cell lines. Does interleukin-10 enhance the proliferation of these cells?. *Leuk Res*. 2010;34:912-6.

81. Tesse R, Del Vecchio GC, De Mattia D, Sangerardi M, Valente F, Giordano P. Association of interleukin-(IL)10 haplotypes and serum IL-10 levels in the progression of childhood immune thrombocytopenic purpura. *Gene*. 2012; 505:53-6.

82. Mocellin S, Marincola F, Rossi CR, Nitti D, Lise M. The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: putting together the pieces of a puzzle. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15:61–76.
83. Eskdale J, Kube D, Tesch H, Gallagher G. Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. *Immunogenetics.* 1997;46(2):120-8.
84. Turner DM, Williams DM, Sankaran DM, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet.* 1997;24(1):1-8.
85. Purdue MP, Lan Q, Bagni R, Hocking WG, Baris D, Reding DJ et al. Prediagnostic serum levels of cytokines and other immune markers and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Res.* 2011;71:4898–907.
86. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood.* 2012;119(3):651-55.
87. Wilson AG, Symons JA, Mcdowell TL, Mcdevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci Usa.* 1997;94:3195-9.
88. Wang SS, Purdue MP, Cerhan JR, Zheng T, Menashe I, Armstrong B, et al. Common gene variants in the tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor super families and NF-kB transcription factors and non-hodgkin lymphoma risk. *PLoS One* 2009; 4:e5360..
89. Younes A, Aggarwall BB. Clinical implications of the tumor necrosis factor family in benign and malignant hematologic disorders. *Cancer.* 2003;98:458–67.
90. Tarabar O, Cikota-Aleksic B, Tukic L, Milanovic N, Aleksic A, Magic Z. Association of interleukin-10, tumor necrosis factor-a and transforming

growth factor-b gene polymorphisms with the outcome of diffuse large B-cell lymphomas. *Int J Clin Oncol* .2013;19(1):186-92.

91. Massague J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol*. 1990;6:597-641.

92. Roberts AB, Sporn MB. Differential expression of the TGF-beta isoforms in embryogenesis suggests specific roles in developing and adult tissues. *Mol Reprod Dev*. 1992;32(2):91-8.

93. Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P, Turner DM, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotypic variation in the transforming growth factor- β 1 gene. *Transplantation*. 1998;66(8): 1014-20.

94. Cambien F, Ricard S, Troesch A, Mallet C, Générénaz L, Evans A. Polymorphisms of the transforming growth factor-beta 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Témoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. *Hypertension*. 1996;28(5):881-7.

95. Perrey C, Pravica V, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotyping for polymorphisms in interferon-gamma, interleukin-10, transforming growth factor-beta 1 and tumour necrosis factor-alpha genes: a technical report. *Transpl Immunol*. 1998;6(3):193-7.

96. Chaouchi N, Arvanitakis L, Auffredou MT, Blanchard DA, Vazquez A, Sharma S. Characterization of transforming growth factor beta 1 induced apoptosis in normal human B cells and lymphoma B cell lines. *Oncogene* 1995;11:1615-22.

97. Billiau A, Matthys P. Interferon-gamma: a historical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009;20(2) 97-113.

98. Lee TC, Savoldo B, Barshes NR, Rooney CM, Heslop HE, Gee AP et al. Use of cytokine polymorphisms and Epstein-Barr virus viral load to

predict development of posttransplant lymphoproliferative disorder in paediatric liver transplant recipients. *Clin Transplant*. 2006;20(3):389-93.

99. Gray PW, Goeddel DV. Structure of the human immune interferon gene. *Nature*.1982;298:859-63.
100. Matsuda T, Hirano T. Interleukin 6 (IL-6). *Biotherapy*.1990;2(4):363-73.
101. Van Snick, J. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol*. 1990;8:253-78.
102. Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem*. 2000; 275(24):18138-44.
103. Tanabe O, Akira S, Kamiya T, Wong GG, Hirano T, Kishimoto T. Genomic structure of the murine IL-6 gene. High degree conservation of potential regulatory sequences between mouse and human. *J Immunol*. 1988;141(11):3875-81.
104. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest*. 1998;102(7): 1369-76.
105. Giachelia M, Voso MT, Tisi MC, Martini M, Bozzoli V, Massini G, et al. Interleukin-6 plasma levels are modulated by a polymorphism in the NF- κ B1 gene and are associated with outcome following rituximabe-combined chemotherapy in diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2012;53(3):411-6.
106. R: A language and environment for statistical computing [computer program]. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. R Core Team; 2013.

107. Flores AC, Marcos YC, Paladino N, Capucchio M, Theiler G, Arruvito L, et al. KIR genes polymorphism in Argentinean Caucasoid and Amerindian populations *Tissue Antigens*. 2007;69:568–76.
108. Bontadini A, Testi M, Cuccia C, Martinetti M, Carcassi C, Chiesa, A. et al. Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptors genes in the Italian Caucasian population. *Journal of Translational Medicine*. 2006;4:44.
109. Denis L, Sivula J, Gourraud PA et al. Genetic diversity of KIR natural killer cell markers in populations from France, Guadeloupe, Finland, Senegal and Reunion. *Tissue Antigens*. 2005;66:267-76.
110. Norman PJ, Stephens HAF, Verity DH, Chandanayingyong D, Vaughan RW. Distribution of natural killer cell immunoglobulin-like receptor sequences in three ethnic groups. *Immunogenetics*. 2001;52:195–205.
111. Du Z, Gjertson DW, Reed EF, et al. Receptor-ligand analyses define minimal killer cell Ig-like receptor (KIR) in humans. *Immunogenetics* 2007;59:1–15.
112. Nakimuli A, Chazara O, Farrell L, Hiby SE, Tukwasibwe S, Knee O et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genes and their HLA-C ligands in a Ugandan population. *Immunogenetics*. 2013;65(11):765-75.
113. Mahfouz R, Rayes R, Mahfoud Z, Bazarbachi A, Zaatari G. Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptors genotypes in the Lebanese population. *Tissue Antigens* 2006; 68(1):66-71.
114. Witt CS, Dewing C, Sayer DC, Uhrberg M, Parham P, Christiansen FT. Population frequencies and putative haplotypes of the killer cell immunoglobulin-like receptor sequences and evidence for recombination. *Transplantation*. 1999;68:1784-9.

115. Zhen J, Wang D, He L, Zou H, Xu Y, Gao S et al. Genetic profile of KIR and HLA in southern Chinese Han population. *Hum Immunol.* 2014;75(1):59-64.
116. Gutierrez-Rodríguez ME, Sandoval-Ramírez L, Díaz-Flores M, Marsh SG, Valladares-Salgado A, Madrigal JA et al. KIR gene in ethnic and Mestizo populations from Mexico. *Hum Immunol.* 2006;67:85–93.
117. Burek MK, Grubic Z, Stingl K, Zunec R. Distribution of KIR genes in the Croatian population. *Hum Immunol.* 2013;74(8):952-6.
118. Rudnick CCC, Franceschi DSA, Marangon AV, Guelsin GAS, Sell AM, Visentainer, JEL. Killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity in a Southern Brazilian population from the state of Paraná. *Hum Immunol.* 2008;69: 872-6.
119. Augusto DG, Zehnder-Alves L, Pincerati M, Martin MP, Carrington M, Petzl-Erler ML. Diversity of the KIR gene cluster in an urban Brazilian population. *Immunogenetics.* 2012;64:143–52.
120. Middleton D, Meenagh A, Moscoso J, Arnaiz-Villena A. Killer immunoglobulin receptor gene and allele frequencies in Caucasoid, Oriental and Black populations from different continents. *Tissue Antigens,* 2008;71,105-13.
121. Jobim M, Salim PH, Portela P, Wilson TJ, Fraportti J, Baronio D, et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity in a Caucasian population of Southern Brazil. *Int J Immunogenet.* 2010;37:83-9.
122. Ewerton PD, Leite M, Magalhaes M, Sena, L, Melo dos Santos, EJ. Amazonian Amerindians exhibit high variability of KIR profiles. *Immunogenetics.* 2007;59:625-30.
123. Single RM, Martin MP, Gao X, Meyer D, Yeager M, Kidd JR. et al. Global diversity and evidence for coevolution of KIR and HLA. *Nature Genetics.* 2007;39:1114-9.

124. Pedroza LSRA, Sauma MFLC, Vasconcelos JM, Takeshita LYC, Ribeiro-Rodrigues EM, Sastre D, et al. Systemic lupus erythematosus: Association with KIR and SLC11A1 polymorphisms, ethnic predisposition and influence in clinical manifestations at onset revealed by ancestry genetic markers in an urban Brazilian population. *Lupus*. 2011;20:265–73.
125. Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D, Jones AR. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acids Res*. 2011;39:D913–9.
126. Ozturk OG, Gun FD, Polat G. Killer cell immunoglobulin-like receptor genes in patients with breast cancer. *Med Oncol*. 2012 Jun;29(2):511-5.
127. Karabon L, Jedynak A, Giebel S, Wołowiec D, Kielbinski M, Woszczyk D. KIR/HLA gene combinations influence susceptibility to B-cell chronic lymphocytic leukemia and the clinical course of disease *Tissue Antigens*. 2011;78:129–38.
128. Middleton D, Diler AS, Meenagh A, Sleator C, Gourraud PA. Killer immunoglobulin-like receptors (KIR2DL2 and/or KIR2DS2) in presence of their ligand (HLA-C1 group) protect against chronic myeloid leukaemia *Tissue Antigens*. 2009;73:553–60.
129. Gourraud PA, Meenagh A, Cambon-Thomsen A, Middleton, D. Linkage disequilibrium organization of the human KIR superlocus: implications for KIR data analyses. *Immunogenetics*. 2010;62:729–40.
130. Parham P, Norman PJ, Abi-Rached L, Guethlein LA. Variable NK cell receptors exemplified by human KIR3DL1/S1. *J Immunol*. 2011;187:11–9.
131. Reddy N, Hernandez-Ilizaliturri FJ, Deeb G, Roth M, Vaughn M, Knight J et al. Immunomodulatory drugs stimulate natural killer-cell function, alter cytokine production by dendritic cells, and inhibit angiogenesis enhancing the anti-tumour activity of rituximab in vivo. *Br J Haematol*. 2008;140:36-45.

132. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood*. 2008;112:461-9.
133. Gluck WL, Hurst D, Yuen A, Levine M, Dayton MA, Gockerman JP et al. Phase I studies of interleukin (IL)-2 and rituximab in B-cell non-Hodgkin's lymphoma: IL-2 mediated natural killer cell expansion correlations with clinical response. *Clin Cancer Res*. 2004;10:2253-64.
134. Wu L, Adams M, Carter T, Chen R, Muller G, Stirling D et al. Lenalidomide enhances natural killer cell and monocyte-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab-treated CD20+ tumor cells. *Clin Cancer Res*. 2008;14:4650-6.
135. Kohrt HE, Thielens A, Marabelle A, Sagiv-Barfi I, Sola C, Chanuc F et al. Anti-KIR antibody enhancement of anti-lymphoma activity of natural killer cells as monotherapy and in combination with anti-CD20 antibodies. *Blood*. 2014;123(5):678-86.
136. Borgerding A, Hasenkamp J, Engelke M, Burkhardt N, Trumpera L, Wienands J et al. B-lymphoma cells escape rituximab-triggered elimination by NK cells through increased HLA class I expression. *Exp Hematol*. 2010;38:213–21.
137. Moesta AK, Norman PJ, Yawata M, Yawata N, Gleimer M, Parham P. Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. 2008. *J Immunol* 180:3969–79.
138. Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science*. 2004;305:872–4.

139. Pravica V, Asderakis A, Perrey C, Hajeer A, Sinnot P, Hutchinson IV. In Vitro Production of IIFN-Gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-Gamma Gene. *Eur J Immunogenet.* 1999;26:1-3.
140. Bogunia-Kubik K, Mlynarczewska A, Jaskula E, Lange A. The presence of IFNG 3/3 genotype in the recipient associates with increased risk for Epstein-Barr virus reactivation after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2006;132(3):326-32.
141. Lossos IS, Morgensztern D. Prognostic biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2006;24:995–1007.
142. Bortolin MT, Tedeschi R, Bidoli E, Zanussi S, Pratesi C, Vaccher E et al. Multiplex analysis of blood cytokines as a prognostic tool in HIV related non-Hodgkin lymphoma patients: a potential role of interleukin-7. *Cytokine.* 2012;60:90–5.
143. Cao HY, Zou P, Zhou H. Genetic association of interleukin-10 promoter polymorphisms and susceptibility to diffuse large B-cell lymphoma: A meta-analysis. *Gene.* 2013;519: 288–94.
144. Purdue MP, Lan Q, Kricker A, Grulich AE, Valjdic CM, Turner J et al. Polymorphisms in immune function genes and risk of non-Hodgkin lymphoma: findings from the New South Wales non-Hodgkin Lymphoma Study. *Carcinogenesis.* 2007;28:704–12.
145. Rothman N, Skibola CF, Wang SS, Morgan G, Lan Q, Smith MT et al. Genetic variation in TNF and IL10 and risk of non-Hodgkin lymphoma: a report from the InterLymph Consortium. *Lancet Oncol.* 2006;7:27–38.
146. Nieters A, Beckmann L, Deeg E, Becker N. Gene polymorphisms in Toll-like receptors, interleukin-10, and interleukin-10 receptor alpha and lymphoma risk. *Genes Immun.* 2006;7:615–24.

147. Berglund M, Thunberg U, Roos G, Rosenquist R, Enblad G. The interleukin-10 gene promoter polymorphism (–1082) does not correlate with clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2005;105:4894–5.
148. Lech-Maranda E, Baseggio L, Benvenu J, Charlot C, Berger F, Rigal D et al. Interleukin-10 gene promoter polymorphisms influence the clinical outcome of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2004;103:3529–34.
149. Ibrahim A, Rahmana HA, Khorshieda M, Samia R, Nasra N, Khorshid O. Tumor necrosis factor alpha–308 and Lymphotoxin alpha+252 genetic polymorphisms and the susceptibility to non-Hodgkin lymphoma in Egypt. *Leuk Res*. 2012;36:694– 98.
150. Skibola CF, Bracci PM, Nieters A, Brooks-Wilson A, Sanjose S, Hughes AM et al. Tumor Necrosis Factor (TNF) and Lymphotoxin- α (LTA) Polymorphisms and Risk of Non-Hodgkin Lymphoma in the InterLymph Consortium. *Am J Epidemiol*. 2010;171:267–76.
151. Scala G, Quinto I, Ruocco MR, Arcucci A, Mallardo M, Caretto P, et al. Expression of an exogenous interleukin-6 gene in human Epstein Barr virus B-cells confers growth advantage and tumorigenicity. *J Exp Med*. 1990; 172:61–8.
152. Smallwood L, Allcock R, van Bockxmeer F, Warrington N, Palmer LJ, Iacopetta B, et al. Polymorphisms of the interleukin-6 gene promoter and abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2008;35(1):31–6.
153. Freeman GJ, Freedman AS, Rabinowe SN, Segil JM, Horowitz J, Rosen K, et al. Interleukin 6 gene expression in normal and neoplastic B-cells. *J Clin Invest*. 1989;83:1512–8.
154. Chopra GS, Chitalkar PG, Jaiprakash MP. Cytokines: as useful prognostic marker in lymphoma cases. *Med J Armed Forces India*. 2004; 60:45-49.

155. Aschebrook-Kilfoy B, Zheng T, Ma S, Han X, Lan Q, Holford T. Polymorphisms in immune function genes and non-Hodgkin Lymphoma survival. *J Cancer Surviv* . 2012;6(1):102–14.
156. Douglas RS, Capocasale RJ, Lamb RJ, Nowell PC, Moore JS. Chronic lymphocytic leukaemia B cells are resistant to the apoptotic effects of transforming growth factor b. *Blood*. 1997;89:941-7.
157. Mazur G, Bogunia-Kubik K, Wrobel T, Kuliczkowski K, Lange A. TGF-b1 gene polymorphisms influence the course of the disease in non-Hodgkin's lymphoma patients. *Cytokine*. 2006;33:145-9.
158. Woszczyk D, Gola J, Jurzak M, Mazurek U, Mykala-Ciesla J, Wilczok T. Expression of TGFb1 genes and their receptor types I, II, and III in low and high-grade malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Med Sci Monit*. 2004;10:CR33-7.