



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO**

**Associação de polimorfismos em genes envolvidos na
regulação da atividade das células NK (*Natural Killer*) no
desenvolvimento do câncer de mama**

LIA KUBELKA DE CARLOS BACK

Florianópolis
2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO**

**Associação de polimorfismos em genes envolvidos na
regulação da atividade das células NK (*Natural Killer*) no
desenvolvimento do câncer de mama**

LIA KUBELKA DE CARLOS BACK

Orientadora: Dra. Ilíada Rainha de Souza

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina, para Obtenção de Título de Doutor em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Florianópolis
2014

*“The nitrogen in our DNA... {was} made in the interiors of
Collapsing stars. We are made of starstuff”*

Carl Sagan, Cosmos

*“Conseguir que as gerações futuras sejam mais felizes
do que a nossa, será o prêmio mais grandioso a que se possa
aspirar. Não haverá valor comparável ao cumprimento
dessa grande missão, que consiste em preparar para a
humanidade futura um mundo melhor.”*

Carlos Bernardo Gonzáles Pecotche

DEDICATÓRIA

À Victoria e ao Arthur,

Que sigam sempre em busca de seus sonhos e realizações e que
Façam parte da construção de uma humanidade melhor.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão por todos que fizeram parte da minha trajetória durante esse processo.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha Orientadora **Prof^a Doutora Ilíada Rainha de Souza**, por todos esses anos (são treze!). Para mim é um grande exemplo de Ser Humano, Mãe, Professora, Amiga, e a pessoa que eu conheço que mais entende de Genética, de verdade, em um tempo que todos acham que entendem...

Aos meus **colegas do Laboratório de Polimorfismos Genéticos** que ao longo de tantos anos, foram muitos, alguns com papel muito importante na minha trajetória.

À Colega e pós-doutoranda **Dr^a Sara Emilie Löfgren**, por sua ajuda e sugestões.

À Professora **Dr^a Yara Costa Netto Muniz** pela revisão e amizade de longa data.

À equipe do **Laboratório Biogenetika**, por todo apoio e suporte.

Aos **professores, funcionários e colegas** do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

A toda **equipe de médicos, enfermeiras e funcionários** do Hospital Universitário (HU) da UFSC e da Maternidade Carmela Dutra que disponibilizaram seu tempo e conhecimento para auxiliar na realização desse projeto de pesquisa, em especial Dr Bráulio Leal Fernandes.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (**FAPESC**), pelo suporte financeiro para o desenvolvimento do Projeto.

Principalmente a **todos os indivíduos** que concordaram em doar o seu material genético em prol da pesquisa e da ciência, em busca de um futuro melhor, sem esperarem nada em troca por isso, simplesmente confiando no nosso trabalho. Espero poder retribuir de alguma forma.

Em especial.....

A todos os membros da minha família que sempre me apoiaram e vibram a cada etapa vencida e tiveram paciência pelas ausências.

Aos meus pais **Beatriz Kubelka Fernandes** e **Paulo Cocchi Fernandes**, por serem meu porto seguro e por terem sempre me estimulado e apoiado a buscar realizar meus sonhos e aspirações, sem restrições.

À minha tia e madrinha de coração, **Claire Fernandes Kubelka**, por ter me despertado o gostinho pela pesquisa e pelas células NK....

À minha irmã **Clara Kubelka Fernandes**, por todo apoio, estímulo, pela grande ajuda nas inúmeras horas de aperto, e no compartilhamento dos bons momentos também. Dinda!

À minha irmã **Elisa Kubelka Freitas**, que não me deixa desistir nunca! Pelo apoio incondicional e por ser um furacão na minha vida, que muda tudo para melhor. Titã!

Aos meus sobrinhos lindos e que também farão parte dessa humanidade futura e que tanto me alegram formando o quarteto fantástico.....**Lucas Cocchi Kubelka de Freitas**, e **Joana Cocchi Kubelka de Freitas**

Ao meu núcleo próprio.....

Ao meu esposo e companheiro de muitas jornadas **Leonardo de Carlos Back**, por tornar o meu caminho nessa existência muito melhor, por me incentivar, ser paciente, pelo suporte e pelo exemplo de Ser maravilhoso.

Às minhas duas razões de viver, **Victoria Kubelka de Carlos Back** e **Arthur Kubelka de Carlos Back**. Nada faria sentido sem vocês....

“Posso dizer só uma coisinha só.....amo vocês!”

1 SUMÁRIO

1- Introdução	1
1.1 Câncer de mama	2
1.2 Resposta Imune tumoral	6
1.2.1 Interleucina -18	11
1.2.2 Células <i>Natural Killers</i> (NK)	16
1.2.3 Receptor NKG2D (<i>natural-killer group 2, member D</i>)	18
1.2.4 Receptores KIR (<i>killer cell immunoglobulin-like receptors</i>)	22
2 Objetivos	27
3 Pacientes e Métodos	28
3.1 Aspectos éticos	28
3.2 Caracterização Clínico-patológica das Pacientes com Câncer de Mama	29
3.3 Genotipagem dos polimorfismos IL18 -137 e IL18 -607	30
3.4 Análise do polimorfismo do gene <i>NKG2D</i>	33
3.5 Detecção do polimorfismo dos genes KIR através de PCR em tempo real	34
3.6 Análise e tratamento dos dados	38
4 Resultados	39
4.1 Características da População estudada	39
4.2 Análise dos polimorfismos funcionais da região promotora do gene <i>IL18</i>	40
4.2.1 Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos <i>IL18 -137</i> e <i>IL18 - 607</i>	40
4.2.2 Análise dos modelos de herança dos polimorfismos IL18 -137 e IL18 - 607	41
4.2.3 Frequências dos Haplótipos dos SNPs da região promotora do gene <i>IL-18</i>	44
4.3 Análise do polimorfismo funcional do gene receptor de células natural killer <i>NKG2D</i> [rs2255336]	44
4.4 Análise dos polimorfismos dos genes <i>KIR</i>	45
5 Discussão	49
5.1 Gene <i>IL18</i>	51
5.2 Genes dos Receptores de Células NK	55
5.2.1 Gene <i>NKG2D</i>	56
5.2.2 Genes <i>KIR</i>	58
6 Conclusões	63
7 Referências	65

8	ANEXO A.....	79
9	ANEXO B.....	85
10	ANEXO C	94

LISTA DE ABREVIATURAS

NK – *Natural Killer*

KIR – *Killer cell immunoglobulin-like receptors*

NKG2D – *Natural Killer-group 2, member D*

BRCA1 - *Breast cancer gene type 1*

BRCA2 - *Breast cancer gene type 1*

PTEN - *Phosphatase and tensin homolog*

TP53 – *Tumor supressor gene*

CHECK2 – *Checkpoint Kinase 2*

ATM - *Ataxia telangiectasia mutated*

RAD50 - *DNA repair protein*

NBS1 - *Nibrin*

BRPI - *BRCA1 interacting protein C-terminal helicase*

PALB2 - *Partner and localizer of BRCA2*

MyD88 - *Myeloid differentiation primary response gene (88)*

CREB - *cAMP response element-binding protein*

H4TF - *RNA polymerase II transcription factors*

MICA - *MHC class I polypeptide-related sequence A*

MICB - *MHC class I polypeptide-related sequence B*

DAP12 - *Myeloid DAP12-associating lectin 1*

MAPK - *Mitogen-activated protein kinase*

NF- κ B - *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

IFN – γ – *Interferon gamma*

TNF – α – *Tumoral necrose factor alpha*

STAT3 - *Signal transducer and activator of transcription 3*

IRAK4 - *interleukin-1 receptor-associated kinase 4*

VGEF - *Vascular endothelial growth fator*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Informações clínico-patológicas das pacientes com câncer de mama do presente estudo.	29
Tabela 2: Sequência dos <i>Primers</i> dos polimorfismos do gene IL-18. Adaptado de TAKADA et al., 2002.	31
Tabela 3: Protocolos da reação em cadeia da polimerase (PCR) para os dois SNPs (-607 e -137) do gene IL-18. Adaptado de TAKADA et al., 2002.....	31
Tabela 4: Programa do termociclador utilizado para a amplificação de cada SNP (-607 e -137) do gene IL-18. Adaptado de TAKADA et al., 2002.....	31
Tabela 5: Reagentes e volumes utilizados no protocolo de genotipagem dos SNPs.....	34
Tabela 6: Protocolos da reação da PCR em tempo real para detecção da presença dos genes KIR.	34
Tabela 7: Conjunto de iniciadores publicados por VILCHES et al., 2007 e adaptados para PCR por tempo real quantitativa (ALVES; RAJALINGAM; CANAVEZ, 2009).....	36
Tabela 8: Características epidemiológicas do grupo de pacientes e do grupo controle.	39
Tabela 9: Frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos das posições -607 e -137 da região promotora do gene <i>IL18</i> e valores de <i>odds ratio</i> (OR) em casos (pacientes com câncer de mama) e controles.	41
Tabela 10: Polimorfismos do gene IL-18 e os modelos de herança analisados em pacientes com câncer de mama e indivíduos controles.	43
Tabela 11: Frequências dos Haplótipos dos polimorfismos da região promotora do gene IL-18 em pacientes com câncer de mama (casos) e indivíduos saudáveis (controles).	44
Tabela 12: Frequências alélicas e genóticas do polimorfismo NKG2D (rs 2255336) em pacientes com câncer de mama (casos) e indivíduos saudáveis (controles).	45
Tabela 13: Frequências dos genes KIR em pacientes com câncer de mama (casos) e indivíduos saudáveis (controles).	47

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2014).	3
Figura 2: Modelo do processo de tumorigênese e seus mecanismos envolvidos (Adaptado de GILLIES; VERDUZCO; GATENBY, 2012).	4
Figura 3: Mecanismo imunológico de imunoeedição tumoral (Adaptado de SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011).	8
Figura 4: Proposição de mecanismos de inflamação envolvidos no processo de tumorigênese e no câncer (adaptado de GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010).	10
Figura 5: IL-18 e as vias de participação na imunidade inata e adaptativa (Adaptado de GARLANDA; DINARELLO; MANTOVANI, 2013).	13
Figura 6: Mecanismo de transdução de sinais da IL-18 (Adaptado de DINARELLO et al., 2013).	14
Figura 7: Representação do receptor humano ativatório NKG2D juntamente com a molécula adaptadora DAP10 e seus ligantes (Adaptado de EAGLE; TROWSDALE, 2007).	20
Figura 8: Representação do contexto genômico da localização do gene <i>NKG2D</i> no cromossomo 12p13.2-p12.3 (HAYASHI et al., 2006).	21
Figura 9: Estrutura das proteínas KIR. Características estruturais das proteínas KIR com 2 (KIR2D) ou 3 (KIR3D) domínios extracelulares semelhantes às imunoglobulinas (Disponível em: http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html Acesso em: dezembro de 2014.)	23
Figura 10: Estrutura de 9 éxons de um gene <i>KIR</i> (BASHIROVA et al., 2006).	24
Figura 11: Organização do cluster gênico dos <i>KIR</i> (adaptado de Carrington e Norman, 2003).	25
Figura 12: Foto de eletroforese em gel de agarose 3% no qual foram analisadas amostras do polimorfismo do gene <i>IL-18</i> (-607) (Farias, 2009).	32
Figura 13: Foto de eletroforese em gel 1,5% de agarose no qual foram analisadas amostras de PCR do polimorfismo do gene <i>IL-18</i> (-137) (Farias, 2009).	33
Figura 14: Exemplo de uma das reações realizadas para genotipagem dos genes <i>KIR</i> por análise de curva de dissociação.	37

RESUMO

Introdução: O câncer de mama possui etiologia variada, sendo influenciada tanto por fatores genéticos quanto por fatores ambientais. Dentro do contexto genético, o papel de genes que codificam moléculas do sistema imunológico tem sido alvo de interesse pela importância que esse sistema possui para o desenvolvimento do processo tumoral. A Interleucina-18 é uma importante citocina pró-inflamatória e que possui indicações como possível alvo-terapêutico. Possui polimorfismos de um único nucleotídeo localizados na região promotora do gene e que possuem atividade funcional. As células *Natural Killer* (NK) fazem parte da resposta imune inata, sendo a primeira linha de defesa do organismo contra vírus, bactérias e tumores. Estas células induzem a morte da célula-alvo quando não há o reconhecimento das moléculas de antígenos leucocitários humanos (HLA) de classe I, através de seus receptores, chamados *Killer cell Immunoglobulin-like*. Receptor (KIR) ou os receptores NKG2D. Vários estudos demonstram o envolvimento dos genes que codificam receptores de células NK na patogênese do câncer. **Objetivo:** Avaliação do papel de polimorfismos em genes envolvidos na regulação da atividade das células NK e o desenvolvimento do câncer de mama em pacientes do Estado de Santa Catarina. **Resultados:** A presença dos genótipos variantes dos polimorfismos *IL18* -607 (C/A) [rs1946518] e *IL18* -137 (G/C) [rs187238] no presente estudo apresentou um risco significativo para o desenvolvimento do câncer de mama, sendo que o modelo de herança mais significativo foi o codominante para o *IL18* -607 (C/A) [rs1946518] (CC vs AA, $P = 0,004$, OR = 2,782 95%CI [1,385-5,589]). E o recessivo para *IL18* -137 (G/C) [rs187238]. Em relação à análise do polimorfismo do gene *NKG2D* [rs2255336], não foi encontrada uma diferença significativa na presença do alelo variante entre pacientes e indivíduos do grupo controle. Para os genes *KIR* foi encontrado um aumento de risco de 5,50 ($P = 0,046$; [1,02-33,36]) para o desenvolvimento da doença na presença do gene *KIR2DL3* e de 5,62 ($P < 0,0001$; [2,81-11,33]) na presença do gene *KIR2DL2*. A presença desses dois genes em conjunto apresentou um risco de 6,86 ($P < 0,0001$; [2,83-13,18]). A presença do gene *KIR2DL5* mostrou-se como um fator de proteção em relação ao desenvolvimento do câncer de mama ($P = 0,001$; [0,06-0,53]). **Conclusão:** Estes resultados indicam um potencial papel dos polimorfismos dos genes envolvidos na regulação da atividade das células NK na patogênese do câncer de mama, indicando que esses genes do sistema imunológico são possíveis marcadores preditivos de risco para câncer de mama na população estudada.

Palavras Chaves: Câncer de mama; Imunogenética; SNPs; Inflamação; *IL18*; Células *Natural Killers*.

ABSTRACT

Introduction: Breast cancer has varied etiology, being influenced by both genetic factors and by environmental factors. Within the context of the genetic etiology, the genes that encode immune system molecules have been the target of interest because of the importance of this system in the development of tumor process. Interleukin-18 is an important pro-inflammatory cytokine and has possible indication as a therapeutic target. *IL18* gene has some single nucleotide polymorphisms located in the promoter region of the gene that have functional activity on gene transcription. Natural Killer (NK) cells are part of the innate immune response, the first line of defense against viruses, bacteria and tumors. These cells induces death of the target cell when there is no recognition molecules in human leukocyte antigens (HLA) class I, through their receptors, called Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) or NKG2D receptors. Several studies have shown the involvement of the genes encoding receptors of NK cells in the pathogenesis of cancer. **Objective:** Evaluation of the role of polymorphisms in genes involved in regulating the activity of NK cells and the development of breast cancer patients in the State of Santa Catarina. **Results:** The presence of genotype variants of *IL18* polymorphisms -607 (C / A) [rs1946518] and *IL18* -137 (G / C) [rs187238] in the present study showed a significant contribution to the development of breast cancer risk, and the most significant was the codominant inheritance model for the *IL18* -607 (C / A) [rs1946518] (CC vs. AA, $P = 0.004$, OR = 2.782, 95% CI [1.385 to 5.589]). And the recessive model was for *IL18* -137 (G / C) [rs187238]. Regarding the analysis of the *NKG2D* polymorphism (rs2255336) gene, a significant difference was not found in the presence of the variant allele between patients and control subjects. For *KIRs* genes we detected an increased risk of 5.50 ($P = 0.046$, 95% CI [1.02 to 33.36]) for the development of the disease in the presence of *KIR2DL3* gene and 5.62 ($P < 0.0001$; 95% CI [2.81-11.33]) for the presence of *KIR2DL2* gene. The presence of both genes together increase the risk about 6.86 ($P < 0.0001$; 95% CI [2,83-13,18]). The presence of the *KIR2DL5* gene introduced a protective factor in the development of breast cancer ($P = 0.001$, 95% CI [0.06 to 0.53]). **Conclusion:** These results indicate a potential role of polymorphisms in genes involved in regulating the activity of NK cells in the pathogenesis of breast cancer, indicating that these genes of the immune system, *IL18*, *KIR2DL2* and *KIR2DL3* are possible predictive risk markers for breast cancer in this population.

Key words: Breast Cancer; Immunogenetics; SNPs; *IL18*; Natural Killers Cells.

1- INTRODUÇÃO

De acordo com estimativas mundiais do projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (Iarc, do inglês *International Agency for Research on Cancer*) e da Organização Mundial da Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*), houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo, em 2012. A incidência do câncer continuará aumentando nos países em desenvolvimento e crescerá ainda mais em países desenvolvidos se medidas preventivas não forem amplamente aplicadas. Em 2030, a incidência global será de 21,4 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer, principalmente em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e nas mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento (INCA 2014).

No Brasil, a estimativa para o ano de 2014, que será válida também para o ano de 2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. O câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil) (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2014).

Independentemente de sua diversidade, os diferentes tumores compartilham diversas propriedades que são fundamentais para o seu desenvolvimento. As principais características que levam uma célula ao processo tumoral são: o aumento e a autonomia

da proliferação celular, mecanismo de apoptose deficiente, processo de diferenciação alterado, metabolismo celular alterado, instabilidade genômica, imortalização celular, invasão e metástase (BISSELL; HINES, 2011; FOSTER et al., 2012; HANAHAN; WEINBERG; FRANCISCO, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011). As células cancerígenas geralmente acumulam múltiplas alterações em número e estrutura de genes e cromossomos. O número preciso de alterações não é conhecido e pode variar entre os diferentes tipos de tumores e o estágio de progressão.

1.1 CÂNCER DE MAMA

No mundo, o câncer de mama é a principal causa de morte por neoplasias entre mulheres. A incidência aumenta com a faixa etária, sendo que a maior parte dos casos ocorre entre 65 e 70 anos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*), o número de casos novos cresce globalmente (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

Estudos epidemiológicos demonstram que o câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete as mulheres em todo o mundo (figura 1), tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos. Cerca de 1,67 milhões de casos novos dessa neoplasia foram esperados para o ano de 2012, em todo o mundo, o que representa 25% de todos os tipos de câncer diagnosticados nas mulheres. Para o Brasil, em 2014, são esperados 57.120 casos novos de câncer de mama, com um risco estimado de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2014).

	Localização primária	casos	%
Mulheres 	Mama Feminina	57.120	20,8%
	Cólon e Reto	17.530	6,4%
	Colo do Útero	15.590	5,7%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
	Glândula Tireoide	8.050	2,9%
	Estômago	7.520	2,7%
	Corpo do Útero	5.900	2,2%
	Ovário	5.680	2,1%
	Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
	Leucemias	4.320	1,6%

Figura 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2014).

Nos últimos 40 anos, a sobrevida vem aumentando nos países desenvolvidos e, atualmente, é de 85% em cinco anos, enquanto, nos países em desenvolvimento, permanece com valores entre 50% e 60% (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2014).

O câncer de mama não é considerado uma única doença, mas sim um conjunto de doenças da mama que possuem diferentes características histopatológicas, genéticas e clínicas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014). Mais de 80% dos cânceres de mama têm origem no epitélio ductal, enquanto a minoria se origina do epitélio lobular. O carcinoma mamário desenvolve-se quando células de algumas estruturas mamárias, principalmente dos lóbulos e dos ductos, devido a fatos ainda não muito bem elucidados, passam a se dividir de forma anormal e incontrolável, e formando assim uma massa de tecido independente, o tumor (RUSSO et al., 2000). Os carcinomas mamários humanos possuem um perfil patológico e molecular heterogêneo de lesões que diferem de acordo

com a sua apresentação clínica, características radiográficas, patológicas e potencial biológico (CHIN et al., 2006; SAINSBURY; ANDERSON; LMORGAN, 2000).

O processo de carcinogênese (Figura 2) pode ser dividido em três fases principais: a fase de iniciação, quando o DNA da célula sofre alterações genéticas causadas por carcinógenos, permitindo a ativação de oncogenes e/ou a inativação de genes supressores tumorais. A segunda fase é a promoção, caracterizada pela expansão clonal das células inicialmente alteradas ocasionando uma proliferação e uma redução da morte celular. Finalmente a terceira fase, a progressão tumoral é caracterizada pela invasão, metástase, assim como o aumento do tamanho tumoral. Durante esse estágio, mutações adicionais também são adquiridas, permitindo que o tumor adquira vantagens de crescimento (MARJANOVIC; WEINBERG; CHAFFER, 2013).

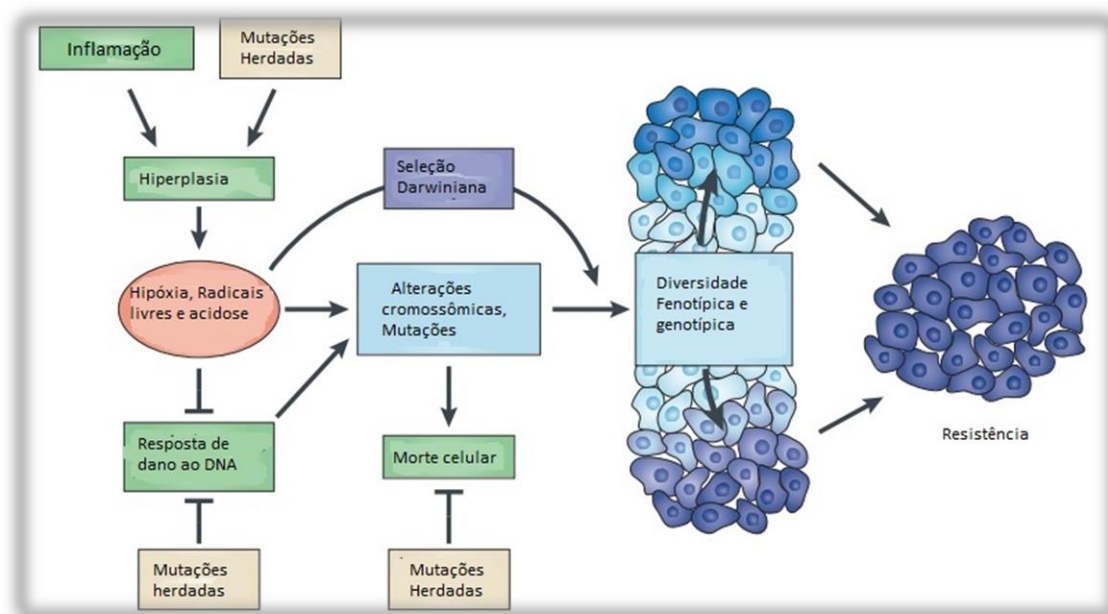


Figura 2: Modelo do processo de tumorigênese e seus mecanismos envolvidos (Adaptado de GILLIES; VERDUZCO; GATENBY, 2012).

O câncer de mama possui etiologia variada, sendo influenciada tanto por fatores genéticos quanto por fatores ambientais. Alguns fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama são bem conhecidos, como: envelhecimento,

fatores relacionados à vida reprodutiva da mulher, história familiar de câncer de mama, consumo de álcool, excesso de peso, tabagismo, sedentarismo, exposição à radiação ionizante e alta densidade do tecido mamário (razão entre o tecido glandular e o tecido adiposo da mama) (ADVANI; MORENO-ASPITIA, 2014; DOSSUS et al., 2014; EMAUS et al., 2014; FERRARI et al., 2014; LOKATE et al., 2013; QUANTE et al., 2012; RITTE et al., 2013).

Das mulheres que desenvolvem o câncer de mama, por volta de 25%, não possuem um histórico familiar para a doença, enquanto que 75% das mulheres têm histórico familiar, o que indica um forte componente genético da doença. Mulheres, com um parente de primeiro grau que teve câncer de mama, possuem risco duas vezes maior de desenvolver esta doença. No caso de dois parentes de primeiro grau diagnosticados com câncer de mama, este risco aumenta em até cinco vezes (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014). Há também um risco de cerca de 50% para o desenvolvimento de um segundo câncer de mama primário (GARCIA et al., 2014; MUTCH; DENNY; QUINN, 2014). Alterações em alguns genes, por exemplo, *BRCA1* e *BRCA2*, aumentam o risco de desenvolver câncer de mama, embora essas mutações ocorram nas síndromes de câncer de mama hereditários que contribuem para uma pequena parcela de casos de câncer de mama (FLETCHER; HOULSTON, 2010; NAROD, 2002). Essas mutações herdadas em genes supressores de tumor que regulam vias críticas para a integridade do genoma, como *BRCA1* e *BRCA2*, quando presentes conferem um risco altíssimo para desenvolvimento de tumor mamário e esses genes são classificados como de alta penetrância. *PTEN* e *TP53* além de conferirem alto risco para desenvolvimento do câncer de mama em sua forma familiar também estão associados a outras síndromes oncológicas hereditárias raras. Outros genes considerados de penetrância média como *CHEK2*, *ATM*, *NBS1*, *RAD50*, *BRPI* e *PALB2* conferem um

risco dobrado às pacientes portadoras dessas mutações. No entanto, somente em torno de 50% dos carcinomas hereditários de mama estão relacionados à presença de mutações descritas, sendo que os demais casos não estão relacionados a genes conhecidos (WALSH; KING, 2007).

Estudos de varredura genômica (GWAS, do inglês *Genome-Wide Association Studies*) identificaram diversos *loci* associados ao risco de desenvolvimento do câncer de mama esporádico (EASTON et al., 2007; HUNTER et al., 2007; LONG et al., 2010; ORR et al., 2011; SIDDIQ et al., 2012; STACEY et al., 2008; TURNBULL et al., 2010; ZHANG et al., 2011; ZHENG et al., 2009b). A maioria desses polimorfismos é denominada de baixa penetrância, com associação considerada fraca em relação às mutações de alta penetrância. No entanto, apesar de cada variante de baixa penetrância conferir um aumento de risco pequeno, a combinação de diversas dessas variações pode ocasionar um aumento de risco considerável para o desenvolvimento de carcinoma mamário considerado esporádico (ANTONIOU et al., 2004). Apesar de um grande avanço no entendimento dos mecanismos genéticos envolvidos no câncer de mama, muitos genes relacionados ao risco de desenvolvimento da doença ainda não foram identificados e podem representar um caminho importante para o entendimento das inúmeras vias relacionadas ao desenvolvimento da doença.

1.2 RESPOSTA IMUNE TUMORAL

O sistema imune é responsável por proteger o organismo de invasões de vírus e bactérias, e outros agentes estranhos ao organismo hospedeiro. As funções do sistema imune são caracterizadas como inatas ou adaptativas com base no tempo e na especificidade da resposta. De maneira simplificada, o sistema imune inato é primariamente responsável por eliminar o que não é próprio através do rápido

reconhecimento e resposta (BINDEA et al., 2010). Nos casos onde não ocorre a resolução através do sistema imune inato, o sistema imune adaptativo muitas vezes é ativado o que pode levar a efetivação da resposta e deixando um mecanismo de memória para futuras infecções pelo mesmo agente. Além dessa função, é bem estabelecido que o sistema imune dos vertebrados pode reconhecer e eliminar células tumorais e possui um importante papel na prevenção da progressão tumoral. Ambas as células efetoras da imunidade inata e adaptativa participam da resposta imune aos tumores (BLANKENSTEIN et al., 2012).

Nos últimos anos, o entendimento das vias de sinalização molecular envolvidas na inflamação e sua relação com o câncer vêm sendo ampliado de maneira significativa. Em destaque, é observada a importância do papel das células do sistema imune inato e adaptativo na prevenção ou facilitação da iniciação, progressão e disseminação tumoral (DE VISSER; COUSSENS, 2005). O sistema imune possui três mecanismos essenciais na prevenção de tumores. Primeiro, protegendo o hospedeiro de tumores originados por vírus oncogênicos, através da eliminação dessas infecções virais. Segundo, através da eliminação de microrganismos que possam desencadear um processo de inflamação crônica favorecendo um processo tumoral. Finalmente, pode identificar e eliminar células tumorais de maneira específica, de acordo com a expressão de antígenos tumorais e baixa expressão de moléculas MHC I. Esse processo é conhecido como imunovigilância e ocorre quando as células alteradas escapam dos mecanismos de supressão tumoral e o sistema imune as elimina antes que estabeleçam a malignidade (DE VISSER; EICHTEN; COUSSENS, 2006).

O processo dinâmico de imunoedição (figura 3) é composto por três fases distintas: a eliminação, o equilíbrio o escape. A eliminação é uma visão atualizada da imunovigilância, na qual moléculas e células do sistema inato e adaptativo trabalham

em conjunto para a detecção da presença de tumores em estágios iniciais e eliminam antes de se tornarem clinicamente relevantes (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004).

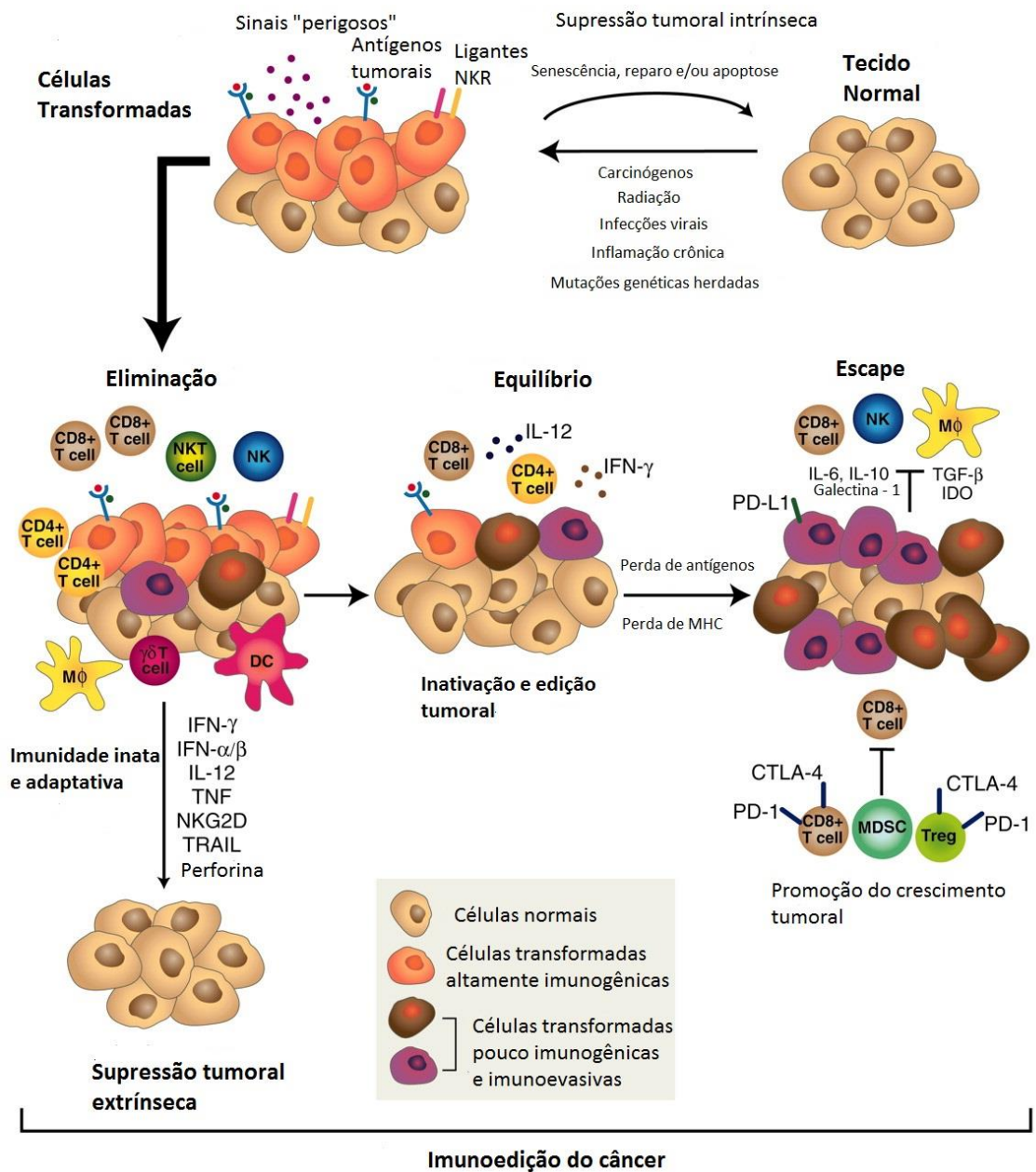


Figura 3: Mecanismo imunológico de imunoeedição tumoral (Adaptado de SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011).

A ativação, mutação ou super-expressão de proto-oncogenes resulta na desregulação do ciclo celular, permitindo a transformação celular e o crescimento tumoral descontrolado (APARICIO; CALDAS, 2013). No entanto, os oncogenes não atuam apenas em nível de células tumorais, mas também afetam células estromais e sua

interação entre o tumor e o seu microambiente. Células epiteliais produzem citocinas inflamatórias, quimiocinas e metaloproteínases, assim como fatores angiogênicos e de crescimento que atraem e ativam células hematopoiéticas, mantendo a resposta pró-inflamatória através da ação autócrina e parácrina e da regulação da proliferação e diferenciação celular (BORRELLO; DEGL'INNOCENTI; PIEROTTI, 2008).

Os tumores se desenvolvem em um microambiente complexo, composto por diversos tipos celulares entre eles fibroblastos, células endoteliais e células do sistema imunológico, além de outros componentes como vasos sanguíneos, citocinas, quimiocinas e produtos do metabolismo celular. Através desses componentes, o microambiente tumoral influencia no crescimento e na capacidade de metástase do tumor. Em particular, a evolução do câncer reflete interações celulares e moleculares complexas entre o tumor e o sistema imunológico do hospedeiro (FINN, 2008). De acordo com BINDEA et al., 2010, a ação protetora do hospedeiro e a inflamação se sobrepõem, e assim uma resposta imune contra o tumor irá conter diferentes tipos de células e moléculas efetoras com atividade coexistente de promoção e erradicação tumoral.

Em alguns tipos de câncer as condições inflamatórias se apresentam antes do processo de malignidade ocorrer, enquanto que em outros tipos tumorais a alteração oncogênica induz um microambiente inflamatório que promove o desenvolvimento tumoral. Alguns modelos de estudo de câncer em camundongos demonstram que as ações inflamatórias do sistema imune podem promover o crescimento e o desenvolvimento tumoral. No sítio primário tumoral, citocinas pró-inflamatórias potencializam o processo de tumorigênese através do estímulo de mediadores de angiogênese (BALKWILL; COUSSENS, 2004; COUSSENS; WERB, 2002; DE VISSER; KORETS; COUSSENS, 2005). De maneira contrária, os sistemas de

imunidade inata e adaptativa também protegem o hospedeiro contra o desenvolvimento tumoral através dos mecanismos de imunovigilância e imunoeedição, impedindo muitas vezes o processo de estabelecimento tumoral (BUI; SCHREIBER, 2007).

O entendimento de que o sistema imunológico e suas diferentes vias participam de todos os estágios de desenvolvimento tumoral e metástase, levou a um número crescente de estudos e pesquisa de marcadores moleculares em genes que codificam moléculas do sistema imune (HASHEMI et al., 2013; JIANG et al., 2012; LI et al., 2014, 2012; SHUANG et al., 2011). Essa abordagem, além de possibilitar possíveis testes preditivos de estimativas de risco, auxilia no entendimento das vias e moléculas atuantes durante a tumorigênese e em alguns casos já culminaram em alvos terapêuticos (HUA et al., 2011).

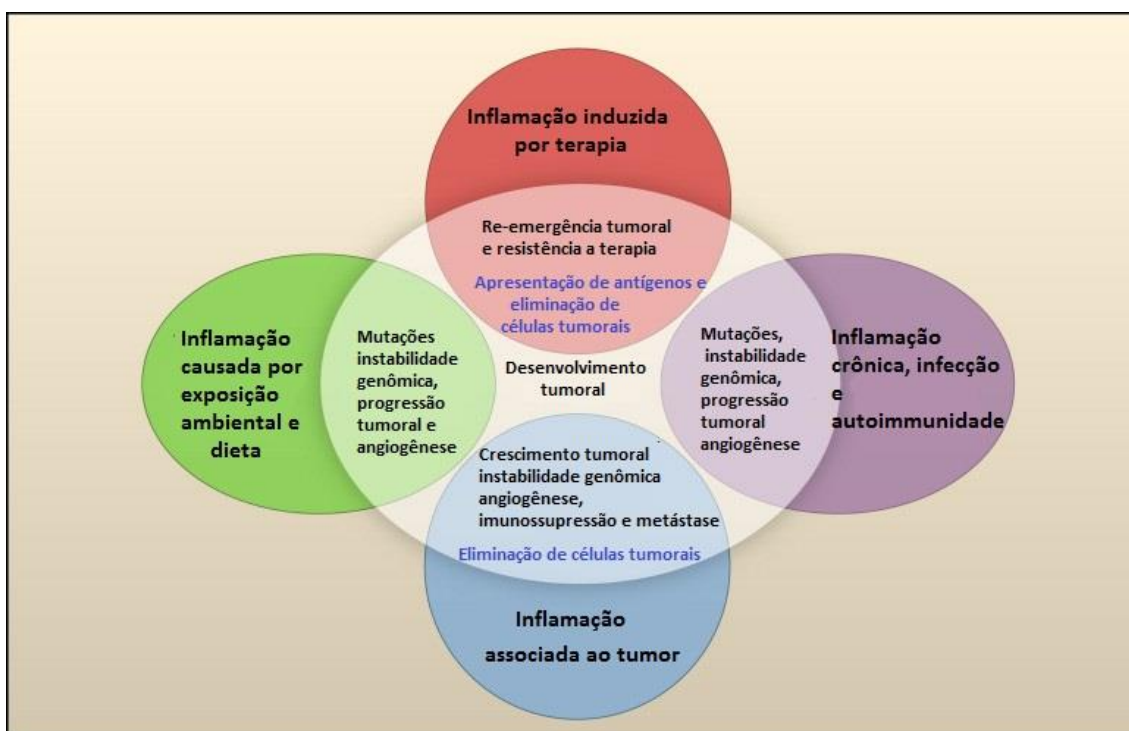


Figura 4: Proposição de mecanismos de inflamação envolvidos no processo de tumorigênese e no câncer (adaptado de GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010).

Dentro desses aspectos o sistema imunológico possui um papel dual em relação ao desenvolvimento tumoral, sendo necessário um equilíbrio complexo entre as diversas

vias desse sistema (figura 4). Muito provavelmente, as variações genéticas dos indivíduos, presentes nos diversos genes que codificam moléculas presentes nessas vias, possam alterar esse estado de equilíbrio levando ao processo patológico. Nesse contexto, diversas citocinas e células do sistema imune com mecanismo de ação pró-inflamatório estão presentes de maneira frequente em tumores (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010). Entre essas moléculas, a IL-18 possui um destaque por possuir muitas vezes um papel dual em relação ao processo tumoral. A sua importância e o seu mecanismo de ação em relação à resposta imune tumoral ainda permanecem controversos.

1.2.1 Interleucina -18

As citocinas são proteínas secretadas por células do sistema imune e exercem dois tipos de ações no sistema imunológico, através da ligação com células produtoras de citocinas (efeito autócrino) ou um efeito direto em células alvo (efeito parácrino) e transdução de sinais através de receptores de superfície e celular específicos. Essas moléculas podem fazer parte de uma resposta antitumoral inicial. Da mesma maneira, citocinas pró-inflamatórias podem reverter seu efeito quando a imunoeedição permite o escape de células tumorais (DUNN; KOEBEL; SCHREIBER, 2006). As moléculas associadas com citocinas pró-inflamatórias (STAT-3, NF- κ B) parecem estar envolvidas em mecanismos de progressão tumoral que influenciam na sobrevivência das células tumorais à apoptose (BROMBERG; WANG, 2009; INOUE et al., 2007; KARIN, 2006; KIM; HAWKE; BALDWIN, 2006; PERKINS, 2007; YAQUB; AANDAHL, 2009). Essas observações sugerem mecanismos moleculares possivelmente envolvidos em vias de estresse e desenvolvimento tumoral.

A Interleucina 18 (IL-18) é uma glicoproteína relacionada a IL-1 de acordo com sua conformação estrutural, e, à semelhança da IL-1, é sintetizada como precursor não

funcional de peso molecular 24 kDa que é então processado pela caspase-1, produzindo a citocina madura de peso molecular de 17,2 kDa. É secretada por uma variedade de células, principalmente por macrófagos e células dendríticas (células apresentadoras de antígeno), queratinócitos, condrócitos, entre outras. Sua produção está associada a uma série de diferentes mecanismos regulatórios em níveis transcricionais, traducionais e pós-traducionais (LIEW, 2003).

A IL-18 foi originalmente descoberta pela sua capacidade de induzir a liberação do IFN- γ , potencializando a resposta Th1 através do estímulo de células NK e células T citotóxicas. Também foi descrita como um componente muito importante na inflamação, na autoimunidade e no processo antitumoral. Mais recentemente foi descrita como um importante elemento do sistema de inflamassomo, um complexo de proteases intracelulares que ativam a caspase-1 e permite a ativação de um complexo pró-inflamatório. Possui um mecanismo conhecido como paradigma da resposta Th1. Esse mecanismo possibilita que a IL-18 induza a produção de IFN γ em sinergismo com a IL-12 ou com IL-15, mas sozinha não é capaz de estimular a produção dessa molécula. Tanto a IL-12 quanto a IL-15 estimulam a expressão de IL-18R β , que é essencial para a transdução de sinais da IL-18. Na ausência dessas duas moléculas, a IL-18 passa a estimular a resposta imune Th2 (NAKANISHI et al., 2001). Assim, essa citocina é capaz de induzir uma resposta de acordo com as moléculas que são ativadas em um primeiro momento (figura 5), caracterizando uma atividade imunorregulatória. Promove também a atividade das células NK e estimula a proliferação das células T ativadas (REDDY, 2004). Recentemente, foi reportado que a IL-18 também pode agir de maneira direta nos linfócitos T e nas células NK, células responsáveis pela eliminação de células tumorais através do processo de imunovigilância (BIET; LOCHT; KREMER, 2002; DINARELLO et al., 2013).

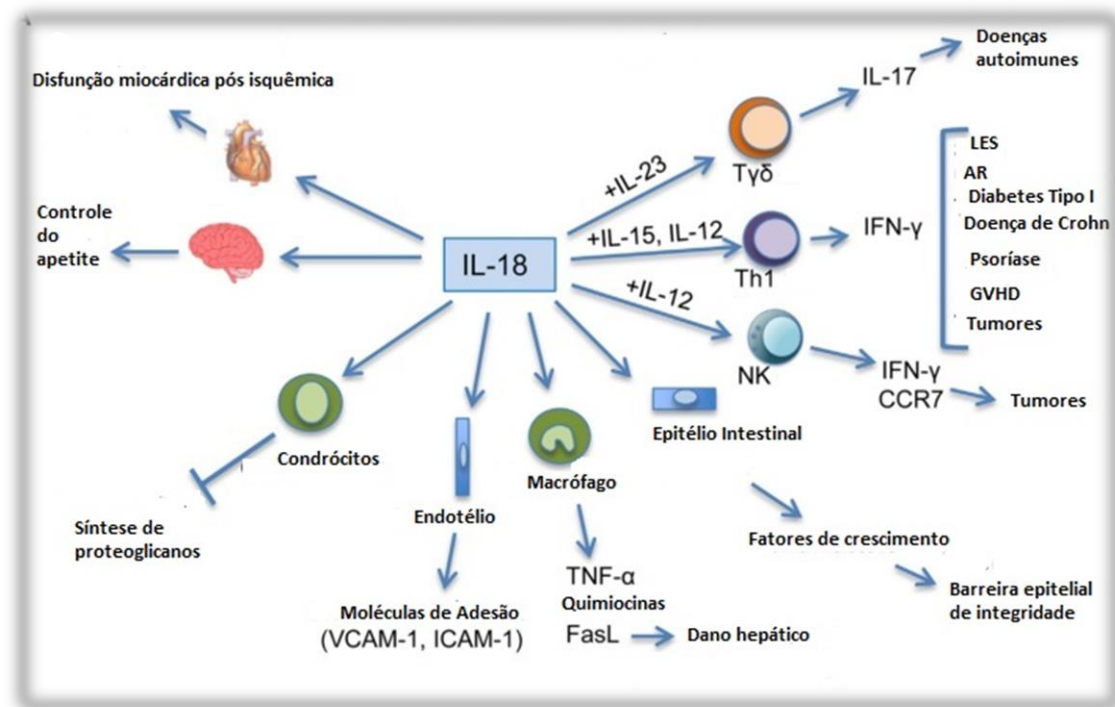


Figura 5: IL-18 e as vias de participação na imunidade inata e adaptativa (Adaptado de GARLANDA; DINARELLO; MANTOVANI, 2013).

O mecanismo de sinalização ocorre através do receptor de IL-18 (IL-18R), um heterodímero, que consiste em uma unidade ligante IL-18R α e uma subunidade sinalizadora IL-18R β . Após a ligação com o receptor, a transdução ocorre como nas outras citocinas IL-1 e receptores TRLs que ativam a quinase IRAK4 e a molécula adaptadora MyD88 (Figura 6) (GUTCHER et al., 2006). Na ausência de IL-12 e IL-15, a IL-18 exibe características semelhantes às de outras citocinas pró-inflamatórias da família das IL-1, como o aumento das moléculas de adesão celular, síntese de óxido nítrico e produção de quimiocinas. Em condições patogênicas como no câncer, por exemplo, o equilíbrio da resposta é alterado e ocorre uma prevalência da resposta Th2 que pode auxiliar as células cancerígenas no escape da vigilância imunológica inibindo a função das células citotóxicas e a indução de apoptose. Nesse microambiente, a IL-18 também pode induzir a produção de quimiocinas com efeito pró-angiogênico,

promovendo um efeito dual da IL-18 em relação à resposta tumoral (COMA et al., 2006).

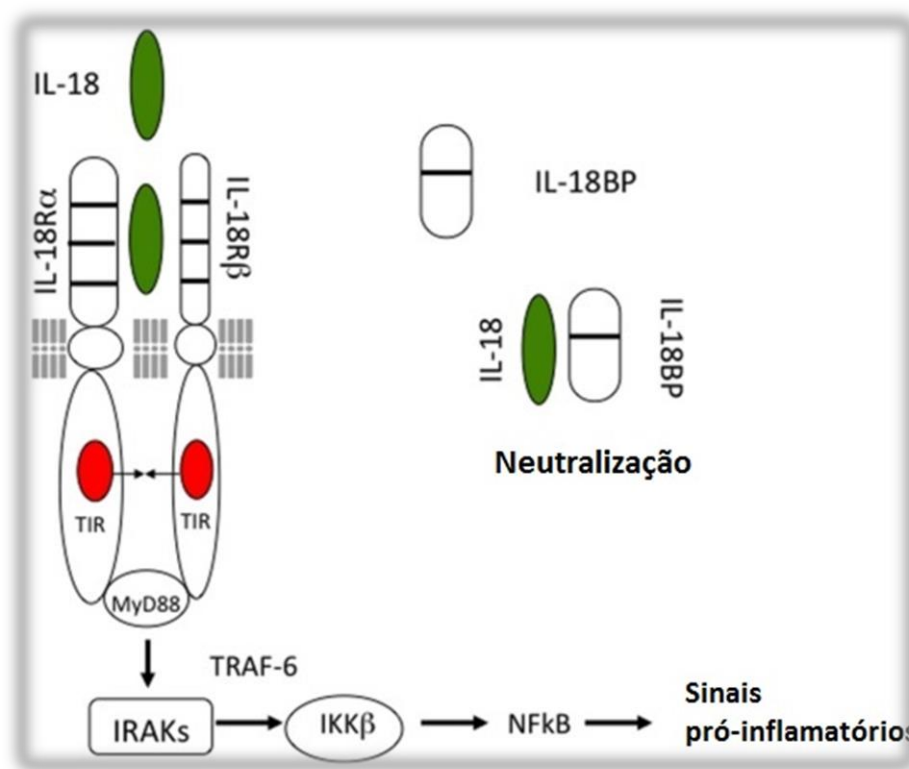


Figura 6: Mecanismo de transdução de sinais da IL-18 (Adaptado de DINARELLO et al., 2013).

Estudos demonstram que transferência do gene da IL-18 promove uma diminuição da tumorigenicidade e da proliferação em diversos tumores (AGORIO et al., 2007; SHOWS et al., 2011; YOSHIMURA et al., 2001), além da indução da apoptose (LIU et al., 2012) e inibição da angiogênese (ZHENG et al., 2009a). Adicionalmente, a administração intratumoral e peritoneal de IL-18 recombinante demonstrou um efeito anticancerígeno significativo em experimentos realizados em pacientes com tumores malignos (REDLINGER et al., 2003; SHIRATORI et al., 2007; XIA et al., 2003). Também foi demonstrada que em sinergia com outras citocinas, como a IL-2, IL-12, IL-15 ou IL-23, a IL-18 está associada a uma redução de desenvolvimento de tumores e inibição da angiogênese *in vitro* e *in vivo* (NI et al., 2012). Em síntese, os principais mecanismos pelos quais a IL-18 exerce a sua atividade antitumoral são a ativação de

células imunes, a produção de IFN γ e outras citocinas com efeito antitumoral, estímulo da expressão da molécula Fas-L, mediadora das vias de apoptose e inibição de fatores que estimulam a angiogênese (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; PAGES et al., 1999).

No entanto, de maneira contrária, outros achados indicam efeitos contrários, onde a IL-18 participa do desenvolvimento e da progressão tumoral. Esses estudos indicam a evidência de uma atividade pró-angiogênica da IL-18. Esse efeito ocorre através do estímulo de fatores como MAPK, *cell-derived* fator 1 alpha, p38 e NF- κ B (AMIN et al., 2007) Foi também reportado, ao contrário de estudos anteriores, o aumento da expressão de IL-18 estimulado pelo fator pró-angiogênico VEGF. PARK et al. 2001, demonstraram que a IL-18 é capaz de promover a angiogênese tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Essas observações contrastam com outros estudos que apontavam uma atividade antiangiogênica da IL-18. Aparentemente, esses resultados podem também ser consequência de outros fatores atuantes como a IL-12, por exemplo. Além desse efeito, também foi detectado um efeito estimulante de metástase pulmonar e células de hepatoma. Também foram detectados níveis significativamente aumentados em pacientes com tumores com câncer de pulmão (AKGUN et al., 2005), câncer de próstata (FUJITA et al., 2008), esôfago (TSUBOI et al., 2004), ovário (SAMSAMI; KHATERE, 2009), colorretal (ZAKI et al., 2010), bexiga (BUKAN et al., 2003) cabeça e pescoço (JEBREEL et al., 2007), linfomas (YAMANAKA et al., 2006), melanoma (CHO et al., 2000) e câncer de mama (EISSA et al., 2005). Os altos níveis de IL-18 também foram relacionados com a severidade da doença e um pior prognóstico em leucemias (UZAN et al., 2014) e câncer gástrico (KANG et al., 2009). Dentro desse contexto contraditório e dual, mais que expressa a complexidade das vias responsáveis pela resposta imune tumoral, surge a necessidade da ampliação dos estudos em relação ao papel da IL-18 no

câncer. Os estudos dos polimorfismos presentes no gene que codifica essa citocina podem elucidar ainda mais o mecanismo de ação dessa molécula em relação ao desenvolvimento tumoral.

O gene da IL-18 foi clonado por KOHKA et al., 1998, encontra-se localizado no cromossomo 11q22.2-q22.3 e é composto por 6 éxons (KALINA et al., 2000). Dois SNPs, nas posições -607 e -137 na região promotora, demonstram associação com a susceptibilidade ao diabetes (KRETOWSKI et al., 2002), enterocolite necrosante (TRESZL; TULASSAY; VASARHELYI, 2006), sarcoidose (TAKADA et al., 2002), artrite reumatoide (SIVALINGAM et al., 2003) e diversos tipos de câncer (BUSHLEY et al., 2004; FARJADFAR et al., 2009; GUO; XIA, 2013; HU et al., 2004; LIANG et al., 2013). Esses polimorfismos foram analisados em relação ao seu mecanismo funcional de alteração da expressão gênica. Na posição -607, a modificação do nucleotídeo C para A, parece interromper o potencial de ligação da proteína CREB e na posição -137 a modificação de nucleotídeos afeta o sítio de ligação com a proteína H4TF. Em um ensaio de atividade de transcrição do promotor gênico, após estímulo, uma menor atividade de transcrição foi observada para os alelos A e C nas posições -607 e -137, respectivamente. Em contraste, foi observada uma maior atividade de transcrição para os alelos C e G nas mesmas posições (GIEDRAITIS et al., 2001).

1.2.2 Células *Natural Killers* (NK)

Durante o processo de hematopoiese, as células NK se diferenciam a partir de um precursor comum às células B e T. Correspondem a 10-15% da população de linfócitos presentes na circulação sanguínea, representando a terceira maior população de células linfóides em mamíferos. São componentes cruciais para o início da resposta imune inata e possuem habilidade de eliminar células do organismo infectadas por

patógenos, assim como células tumorais. São consideradas células efectoras, e sua rápida ativação representa uma linha de frente de defesa antes do início da resposta imune adaptativa. Seus marcadores de superfície iniciais são os CD56 e /ou CD16 e a ausência de marcadores de células T CD3. Ao contrário dos linfócitos B e T, as células NK possuem a habilidade de reconhecer e eliminar o alvo sem a necessidade de uma sensibilização prévia (SUN; LANIER, 2009).

Possuem a capacidade de distinguir as células normais das alteradas, através de um sofisticado repertório de receptores de superfície celular que controlam suas funções de ativação, proliferação e efectora. Genes da linhagem germinativa que não necessitam de recombinação somática codificam seus receptores, assim essas células representam a linha de frente do sistema imune inato. O reconhecimento realizado pelas células NK envolve uma ligação inicial às células alvo potenciais, interações entre os receptores ativatórios e inibitórios e seus ligantes e a integração de sinais transmitidos por esses receptores, que irão determinar se essas células irão iniciar ou não a resposta (COLUCCI; CALIGIURI; DI SANTO, 2003).

De acordo com a hipótese do *missing self* (perda do próprio), descrita por Ljunggren e Kärre, 1990, as células NK promovem uma imunovigilância através do reconhecimento de células com baixa expressão de MHC classe I, evento frequente em células tumorais e infectadas por vírus. Até recentemente, acreditava-se que as células NK lisavam qualquer célula que não estivesse expressando ligantes MHC de classe I. Dados recentes indicam que as células NK detectam células que não expressam ou possuem uma expressão reduzida de moléculas MHC classe I ou uma expressão aumentada de ligantes para receptores ativadores das células NK (LANIER, 2005). As células NK estão envolvidas nesse mecanismo e na eliminação de diferentes tipos de linhagens de células tumorais em humanos e em murinos *in vitro*. Estudos em murinos

demonstraram o papel das células NK na resposta à rejeição de linhagens celulares tumorais induzidas experimentalmente (SMYTH et al., 2002).

Assim como os linfócitos T, as células NK possuem diferentes funções efetoras na resposta anti-tumoral. Podem eliminar as células alvo através de diferentes mecanismos, um dos mais estudados é através da liberação de grânulos citoplasmáticos. Esses grânulos contêm proteínas, perforinas e granzimas, que possuem a capacidade de lise de células alvo. Outro mecanismo é através da expressão de citocinas como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) ou pela via de sinalização do óxido nítrico. Também produzem citocinas como IFN- γ , que restringe a angiogênese e estimula a resposta imune adaptativa (SMYTH et al., 2005)

A detecção da ausência ou expressão reduzida das moléculas MHC classe I não é suficiente para causar a morte das células alvo. As células NK também necessitam de um estímulo via ligantes das células alvo que desencadeiam a ativação via receptores específicos. Atualmente se sabe que o reconhecimento dos tumores pelas células NK é regulado por um processo que envolve a integração de sinais liberados por diversos receptores ativatórios e inibitórios. A importância dos receptores ativatórios das células NK é apenas parcialmente conhecida. Muitas células tumorais expressam ligantes para diversos receptores ativatórios de células NK, que promovem a atividade efetora de eliminação das células tumorais.

1.2.3 Receptor NKG2D (*natural-killer group 2, member D*)

Células citotóxicas expressam uma variedade de receptores ativatórios, incluindo o grupo *Natural Killer 2D*, 2B4, NKp80 e os receptores citotóxicos (NCRs). O receptor NKG2D é um receptor ativatório fundamental encontrado nas células NK e nas células

T. A ativação das células NK é regulada conjuntamente com receptores inibitórios como os KIR, NKR-P1 e CD94/NKG2(A/B) que reconhecem as moléculas MHC classe I, expressas em células saudáveis (ANDRÉ et al., 2004; MORETTA et al., 2001). Os receptores inibitórios CD94/NKG2(A/B) se ligam a moléculas não clássicas do MHC classe I, como a HLA-E que parece ser um “marcador” de saúde intracelular. Essa interação previne a ativação da célula efetora e a subsequente lise da célula (BRAUD et al., 1998). A perda da expressão das moléculas MHC classe I em condições patológicas elimina o sinal inibitório das células efetoras citotóxicas. No entanto, as células tumorais e as células infectadas por vírus não apenas diminuem ou perdem a expressão das moléculas MHC classe I, mas também podem induzir a expressão de outras moléculas “próprias” que são marcadores de estresse celular (CERWENKA; LANIER, 2001; DIEFENBACH; RAULET, 2001). Em humanos, NKG2D foi primeiramente identificado como receptor para as moléculas MICA e MICB (codificadas por genes pertencentes ao complexo principal de histocompatibilidade) e subsequentemente para as moléculas ULBP 1-5 (UL-16 binding protein) (EAGLE; TROWSDALE, 2007). Esses ligantes encontram-se com altos níveis de expressão em células tumorais ou infectadas (BUSCHE et al., 2006).

NKG2D é uma molécula *C-type lectin-like*. É uma glicoproteína transmembrana homodimérica tipo II (figura 7). Esse receptor é expresso nas células NK, nas células T que expressam receptores TCR- $\alpha\beta$ e células T TCR- $\gamma\delta$ (MISTRY; O'CALLAGHAN, 2007). A ligação do substrato ao receptor NKG2D resulta na fosforilação da molécula adaptadora DAP10 pelas quinases da família Src e o recrutamento da subunidade p85 da molécula fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K), permitindo assim um fluxo de cálcio intracelular provocando a citotoxicidade (UPSHAW et al., 2006). Nas células NK ativadas, a molécula NKG2D funciona como um receptor ativatório primário, sua ligação

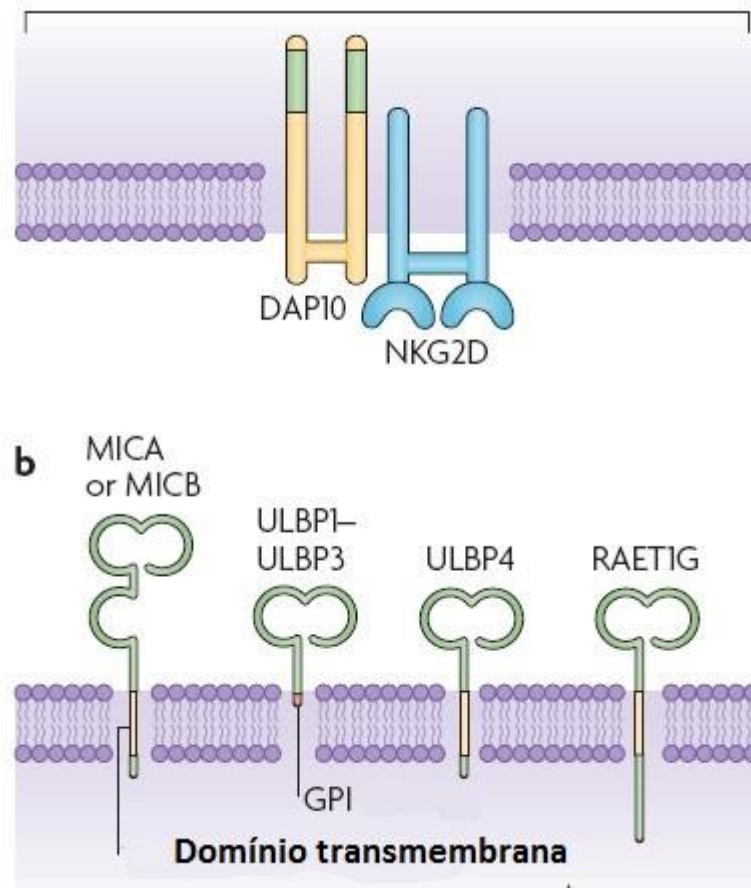


Figura 7: Representação do receptor humano ativatório NKG2D juntamente com a molécula adaptadora DAP10 e seus ligantes (Adaptado de EAGLE; TROWSDALE, 2007).

é suficiente para desencadear o processo de citotoxicidade. Em contraste, nas células T, ele parece agir como um receptor co-estimulatório, dependente da interação de outros receptores, como os TCRs (Receptores de células T) (JEANNET; COUDERT; HELD, 2006).

O gene se encontra no complexo gênico NKC (*natural killer complex*), que ocupa uma região de 270 kb localizada no cromossomo 12p13.2-p12.3 (figura 8). Estudos recentes têm descrito diversos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs, do inglês *Single Nucleotide polymorphisms*) que parecem estar associados com a atividade citotóxica aumentada ou diminuída das células NK. Em relação a doenças, ainda existem poucos estudos dessas variantes alélicas, mas alguns já indicam uma

associação de polimorfismos desse gene com o desenvolvimento de tumores (FURUE et al., 2008a; HAYASHI et al., 2006).

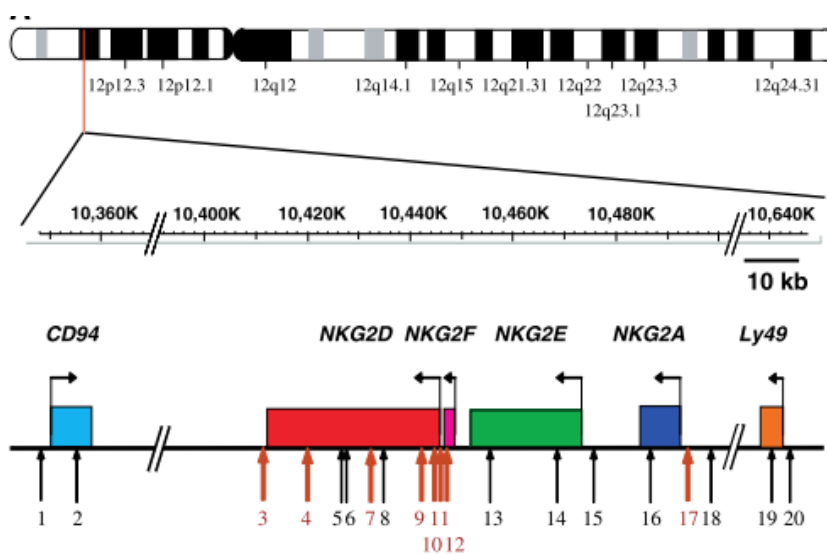


Figura 8: Representação do contexto genômico da localização do gene *NKG2D* no cromossomo 12p13.2-p12.3 (HAYASHI et al., 2006).

O polimorfismo *NKG2D* [rs2255336] consiste em uma troca de um único nucleotídeo através de uma transição de G→A, o que acarreta em uma troca de aminoácidos de treonina para alanina na posição 72 da proteína (Thr72Ala), próximo a uma arginina transmembrana que se encontra localizada na posição 66, que se liga ao adaptador DAP10. O SNP não afeta a expressão do *NKG2D* na superfície celular, mas parece afetar a afinidade de ligação pelo DAP10 e alterar a sinalização celular (MELUM et al., 2008).

O receptor *NKG2D* pelo seu papel de eficiente ativador das células NK, se demonstra como uma peça fundamental no desenvolvimento de uma resposta anti-tumoral e o estudo de suas variantes genéticas pode sinalizar aspectos importante dos mecanismos imunológicos envolvidos no processo tumoral.

1.2.4 Receptores KIR (*killer cell immunoglobulin-like receptors*)

Os dois grandes grupos de genes para receptores de NK em humanos encontram-se agrupados em dois cromossomos distintos. Os *C-type lectin genes*, como por exemplo *CD94* e *NKG2*, estão dentro da família gênica do complexo NKC, localizado no cromossomo 12. Os genes que codificam proteínas que irão formar os receptores pertencentes a superfamília das imunoglobulinas, os *Killer cell immunoglobulin-like receptors*, estão localizados no cromossomo 19 dentro do cluster gênico *leukocyte receptor complex* (LCR) (TROWSDALE, 2001). Ambas as famílias possuem membros inibitórios e ativadores (Figura 3) com função similar, regulando a atividade citotóxica das células NK. A presença do imunorreceptor *tyrosine-based inhibitory motifs* (ITIMs) na porção citoplasmática do receptor inibe a lise pelas células NK. Em contraste, a ativação requer o recrutamento de uma molécula adaptadora (DAP12) através de um aminoácido carregado no domínio transmembranar. A molécula DAP12 possui o *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM). Os KIRs se diferenciam através do número de domínios de imunoglobulina extracelulares e pelo comprimento do domínio citoplasmático (Figura 9) (CAMPBELL; PURDY, 2011). A presença de um domínio citoplasmático longo com dois domínios ITIM, que permitem a transdução de sinais inibitórios, caracteriza os KIRs que possuem função inibitória (2DL, 3DL), enquanto que a presença de um domínio citoplasmático curto corresponde aos KIRs ativadores (2DS, 3DS) (figura 9). KIR 2DL (p58) e KIR 2DS (p50) reconhecem um grupo de alotipos HLA-C com substituição nas posições 77 e 80 (S77 N80) incluindo HLA-Cw*01, Cw*03, Cw*07, Cw*08 e N77/K80 incluindo HLA-Cw*02, Cw*04, Cw*05 e Cw*06. KIR 3DL e KIR 3DS são específicos para os alotipos HLA-B que possuem motivos Bw4 nos resíduos 77-83 (VILCHES; PARHAM, 2002).

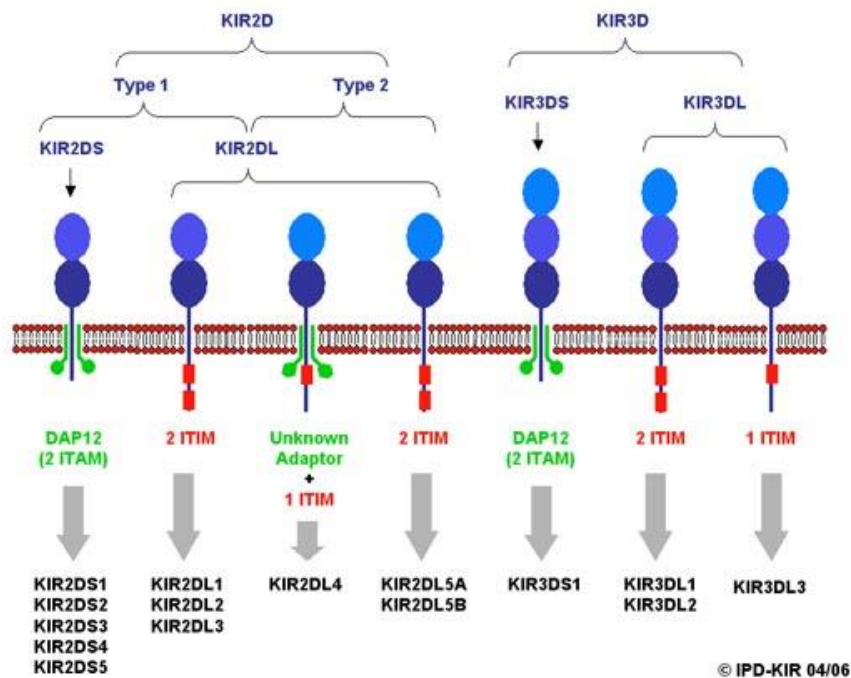


Figura 9: Estrutura das proteínas KIR. Características estruturais das proteínas KIR com 2 (KIR2D) ou 3 (KIR3D) domínios extracelulares semelhantes às imunoglobulinas. A associação dos KIRs ativadores com as proteínas adaptadoras é demonstrada em verde, enquanto que os domínios ITIMs dos receptores inibidores são mostrados em vermelho. A letra D seguida dos números 0, 1 e 2 indicam os domínios extracelulares semelhantes às imunoglobulinas. (Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html> Acesso em: dezembro de 2014.)

A interação dos receptores inibitórios com os ligantes MHC regula o processo de tolerância por parte das células NK (PASSWEG et al., 2007). Análises de diferentes clones de células NK demonstram que há uma expressão de diferentes tipos de combinações de KIRs inibitórios ou ativadores na superfície celular (YODER; LITMAN, 2011).

1.2.4.1 Imunogenética dos *KIR*

Os genes que codificam estes receptores nas células NK são conhecidos como *KIR*, que fazem parte do Complexo Receptor de Leucócitos (LRC) e estão localizados na região 19q13.4 (PARHAM, 2005a). A figura 10 representa os genes *KIR* e elucida os seus respectivos domínios.

Acredita-se que a família multigênica dos *KIR* em humanos, seja composta por 15 genes e 2 pseudogenes. A nomenclatura utilizada indica o número de domínios extracelulares de imunoglobulinas presentes (2D ou 3D), enquanto que as moléculas que possuem domínios intracitoplasmáticos longos, são identificadas pela letra L do inglês *long* e os que possuem domínio curto são identificadas pela letra S do inglês *short*. Os pseudogenes são identificados pela letra P. Postula-se que eventos de recombinação homóloga e não homólogos são os principais processos que permitem a formação de novos *loci* gênicos no complexo dos KIR (SAMBROOK; BECK, 2007).

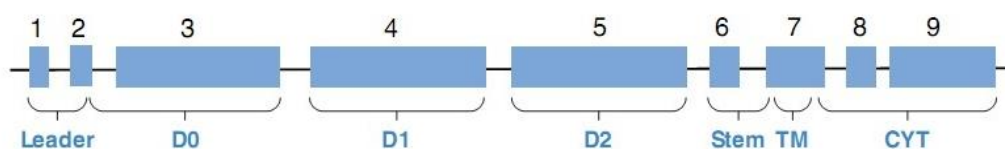


Figura 10: Estrutura de 9 éxons de um gene *KIR*. A organização éxon-intron se relaciona intimamente com o domínio funcional que ele codifica. Os retângulos azuis representam éxons e as linhas representam íntrons. *Leader* = sequência líder; D0 = domínio D0; D1 = domínio D1; D2 = domínio D2; *Stem* = haste; TM = região transmembranar; CYT = cauda citoplasmática (BASHIROVA et al., 2006).

São definidos dois grupos distintos de haplótipos contendo genes *KIR*, conhecidos como haplogrupos A e B, que diferem no número e na variedade de genes *KIR* (Figura 11). Quatro genes: *3DL3*, *3DP1*, *2DL4* e *3DL2* também conhecidos como genes “*framework*” são encontrados em ambos os grupos. O haplogrupo A possui genes dos receptores inibitórios *KIR2DL1*, *KIR2DL3* e *KIR3DL1* e não possui genes dos receptores ativatórios, com exceção apenas do *KIR2DS4*. Todos os outros haplótipos pertencem ao haplogrupo B. O haplogrupo B geralmente possui maior quantidade de genes que o haplogrupo A e também são funcionalmente mais importantes (figura11). Há uma quantidade maior de receptores ativatórios (NAUMOVA et al., 2007).

Haplogrupo A



Haplogrupo B



Figura 11: Organização do cluster gênico dos *KIR*. A ordem dos genes *KIR* é demonstrada para o haplogrupo A e uma representativa para o haplogrupo B. Os quadrados em vermelho representam os genes de receptores inibitórios, enquanto que os em verde representam os genes de receptores ativatórios. Os genes framework são indicados pela cor cinza e os pseudogenes pela cor preta. Cada gene possui comprimento entre 10 a 16 kb e a distância em relação aos demais é de 2 kb, com exceção do gene *KIR2DL4* que apresenta uma distância de 14 kb (adaptado de Carrington e Norman, 2003).

A diversidade genética dos *KIR* é tão ampla que mesmo os haplogrupos que possuem igual conteúdo gênico, podem se diferenciar através da extensa variabilidade alélica. Assim, a diversidade genotípica dos *KIR* em humanos deriva de três componentes: o conteúdo gênico do haplótipo, polimorfismos alélicos e combinação dos haplótipos maternos e paternos (PARHAM, 2005a).

Alguns mecanismos de controle da expressão gênica dos *KIR* vêm sendo determinados. Um acesso restrito às regiões promotoras dos genes *KIR* parece ser resultado de metilações que representam um importante mecanismo de regulação da transcrição dos *KIR*. Estudos demonstram que existem pequenas ilhas CpG próximas aos sítios de iniciação da transcrição em cada gene da família *KIR* (SANTOURLIDIS et al., 2002). As ilhas CpG são o principal alvo para a metilação do DNA e vem sendo demonstrado que o *status* de metilação de um determinado *KIR* está diretamente correlacionado com o seu nível de expressão na célula. Se o sítio de iniciação de um gene *KIR* encontra-se metilado, a transcrição do mesmo não ocorre. Um modelo sugere que os genes *KIR* são silenciados através da metilação do DNA e a condensação da cromatina nos primeiros estágios do desenvolvimento hematopoiético. Assim diferentes

clones expressam, em sua superfície celular, diferentes combinações de receptores ativadores e inibitórios (TROMPETER et al., 2005).

Um aspecto fascinante da biologia evolutiva dos *KIR* é a grande divergência nas frequências haplotípicas das diferentes populações humanas, indicando diferenças no mecanismo de seleção relacionado aos patógenos. As frequências desses haplótipos variam entre as diferentes populações. Já foram registradas frequências haplotípicas do haplótipo A de 75% em japoneses, 58% em caucasóides, mas de apenas 15% em aborígenes australianos (TONEVA et al., 2001). A maior diversidade haplotípica intrapopulacional foi registrada em populações sul-asiáticas (NORMAN et al., 2002) e a menor em japoneses (YAWATA et al., 2002).

As implicações da diversidade funcional destes genes ainda não estão elucidadas. Assim, estudos populacionais que avaliam a distribuição das frequências destes genes em diferentes populações humanas podem auxiliar na compreensão dos fatores evolutivos atuantes na origem e manutenção da diversidade dos genes *KIR*.

Para se delinear as futuras estratégias terapêuticas é necessário o entendimento do papel dos genes e suas moléculas envolvidas na regulação da atividade das células e o desenvolvimento do câncer de mama. No caso do gene *NKG2D*, é a primeira vez em que foi analisado o papel de um polimorfismo desse gene em pacientes com câncer de mama.

2 OBJETIVOS

Avaliar do papel de polimorfismos em genes envolvidos na regulação da atividade das células NK (*natural killer*) e sua relação com o desenvolvimento do câncer de mama em pacientes do Estado de Santa Catarina.

Para esse fim, os objetivos específicos do presente trabalho foram:

- 1- Determinar as frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos do gene da Interleucina 18, nas posições *IL18*, -607 (C/A) e -137 (G/C) nos grupos de pacientes (casos) e de indivíduos saudáveis (controles).
- 2- Determinar as frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo do gene *NKG2D* (Thr72Ala), nas amostras de casos e controles.
- 3 - Identificar a presença e ausência e estimar as frequências dos genes *KIR* ativatórios (*2DS2*, *2DS3*, *2DS4*, *2DS5*, *3DS1*) e inibitórios (*2DL1*, *2DL2*, *2DL3*, *2DL4*, *2DL5*, *3DL1*, *3DL2*, *3DL3*) e do pseudogene *KIR* (*3DPI*) nas amostras de casos e controles.
- 4- Verificar a existência de associação entre os genótipos dos genes identificados e o risco de desenvolvimento de câncer de mama.

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo faz parte de um projeto mais abrangente, intitulado “Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico, prognóstico e tratamento de pacientes na população do estado de Santa Catarina”. O projeto foi submetido e aprovado pelo: Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da UFSC, sob o parecer nº 349/05, de 26/06/2006; pelo CEP da Maternidade Carmela Dutra, em 20 de Julho de 2007 e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), sob o parecer nº. 027/2006 e registro 13312, de 24 de Janeiro de 2007, com emendas conforme cita o ofício de número 107/CEPSH/PRPE/09, da UFSC. A amostra populacional utilizada neste trabalho faz parte do Projeto de Pesquisa em Câncer de mama realizado pelo Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE) do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética da UFSC, coordenado pela Prof.^a Dr.^a Ilíada Rainha de Souza. Este é um estudo caso-controle composto por: um grupo de 154 mulheres diagnosticadas com câncer de mama, não submetidas à quimioterapia ou radioterapia, atendidas no Hospital Universitário da UFSC ou na Maternidade Carmela Dutra; e um grupo controle, constituído de 118 mulheres saudáveis, sem histórico de câncer de mama em parentes de primeiro grau, doadoras de sangue do HEMOSC ou participantes do Núcleo de Estudos da Terceira Idade (NETI) da UFSC.

As participantes dos dois grupos foram esclarecidas sobre os objetivos do projeto, o sigilo das suas informações e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (ANEXO A). Os dados familiares e epidemiológicos foram obtidos através de entrevista e preenchimento de questionários. Os dados clínicos das pacientes

foram obtidos a partir dos prontuários médicos, dos laudos anatomopatológicos e de imunohistoquímica (ANEXO B).

3.2 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA DAS PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA

Tabela 1: Informações clínico-patológicas das pacientes com câncer de mama do presente estudo.

Características clínico-patológicas	n=154 (%)
TIPO DE TUMOR	
IDC – Carcinoma invasivo ductal	116 (75%)
ILC – Carcinoma invasivo lobular	14 (9%)
Outros	11 (7%)
Desconhecido (NI)	13 (8%)
GRAU DE ELSTON E ELLIS	
1	13 (8%)
2	59 (38%)
3	32 (21%)
NI	50 (32%)
TAMANHO DO TUMOR	
Tis	7 (5%)
T1	42 (27%)
T2	34 (22%)
T3	8 (5%)
NI	63 (41%)
COMPROMETIMENTO DE LINFONODO	
Positivo	48 (31%)
Negativo	37 (24%)
NI	69 (45%)
RECEPTOR DE ESTRÓGENO (ER)	
Positivo	94 (61%)
Negativo	32 (21%)
NI	28 (18%)
RECEPTOR DE PROGESTERONA (PR)	
Positivo	86 (56%)
Negativo	39 (25%)
NI	29 (19%)
HER2/neu	
Positivo	32 (21%)
Negativo	83 (54%)
NI	39 (25%)

As pacientes analisadas foram caracterizadas quanto ao histórico familiar de câncer de mama em parentes de primeiro grau (mãe, irmã ou filha) e quanto às características do tumor (Tabela 1). Foi utilizada como critério de exclusão a realização prévia de tratamento quimioterápico.

As amostras biológicas foram centrifugadas, separando-se os constituintes do sangue e a partir da camada de leucócitos (*buffy coat*) foi obtido o DNA genômico. A extração de DNA foi realizada pelo método *salting-out* adaptado de S.A.MILLER; D.D.DYKES; H.F.POLESKY, 1988. Posteriormente o DNA foi quantificado e diluído em alíquotas de uso na concentração de 20µg/mL e armazenadas a -20°C.

3.3 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS *IL18 -137* E *IL18 -607*

Os polimorfismos analisados neste gene estão presentes na região promotora do mesmo. A genotipagem do SNP da posição -607 (C/A) [rs1946518] foi realizada através da reação de PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) e pelo método de detecção do polimorfismo pelo tamanho do fragmento com o uso de enzima de restrição (RFLP, do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*). Os *primers*, R e F na Tabela 2, utilizados na PCR amplificam um fragmento de 301pb (pares de bases), que abrange o polimorfismo investigado. O protocolo utilizado para a amplificação do gene através da técnica de PCR está descrito na Tabela 3 e o programa utilizado no termociclador para a amplificação pode ser encontrado na Tabela 4.

O produto de PCR foi digerido com 6U (unidades) da enzima *MseI* (Biolabs, New England) a 37°C por 12 a 24 horas e, o produto da digestão foi submetido a eletroforese em um gel de agarose 3% contendo brometo de etídeo (1%) (TAKADA et al., 2002).

Tabela 2: Sequência dos *Primers* dos polimorfismos do gene IL-18. Adaptado de TAKADA et al., 2002.

Posição	Sequência dos <i>primers</i> *
-607	F: 5'-CTTTGCTATCATTCCAGGAA-3' R: 5'-TAACCTCATTCCAGGACTTCC-3'
-137	controle F: 5'-CCAATAGGACTGATTATTCCGCA-3' controle R: 5'-AGGAGGGCAAATGCACTGG-3' F1 específico: 5'-CCCCAACTTTTACGGAAGAAAAG-3' F2 específico: 5'-CCCCAACTTTTACGGAAGAAAAC-3'

* F: forward primer; R: reverse primer

G e C alelos em destaque

Tabela 3: Protocolos da reação em cadeia da polimerase (PCR) para os dois SNPs (-607 e -137) do gene IL-18. Adaptado de TAKADA et al., 2002.

Componentes do MIX	<i>IL18(-607)</i>	<i>IL18(-137)</i>
Tampão 10x	2,5µl	1,20µl
MgCl ₂ 50mM	1,0µl	0,30µl
dNTP 10mM	0,6µl	0,28µl
Primer R 50µM	0,2µl	0,12µl
Primer F 50µM	0,2µl	0,12µl
Primer F1 ou F2 50µM	---	0,12µl
BSA 10mg/ml	0,2µl	---
Taq polimerase 5U/µl	0,2µl	0,08µl
Água ultra-purificada	16,1µl	7,98µl
DNA 20ng	4,0µl	2,00µl
Total	25,0µl	12,0µl

Tabela 4: Programa do termociclador utilizado para a amplificação de cada SNP (-607 e -137) do gene IL-18. Adaptado de TAKADA et al., 2002.

	<i>IL18(-607)</i>	
94°C	3 minutos	1 ciclo
94°C	20 segundos	
57°C	40 segundos	35 ciclos
72°C	40 segundos	
72°C	3 minutos	1 ciclo
	(-137)	
94°C	2 minutos	1 ciclo
94°C	20 segundos	5 ciclos
68°C	60 segundos	
94°C	20 segundos	
62°C	20 segundos	25 ciclos
72°C	40 segundos	1 ciclo

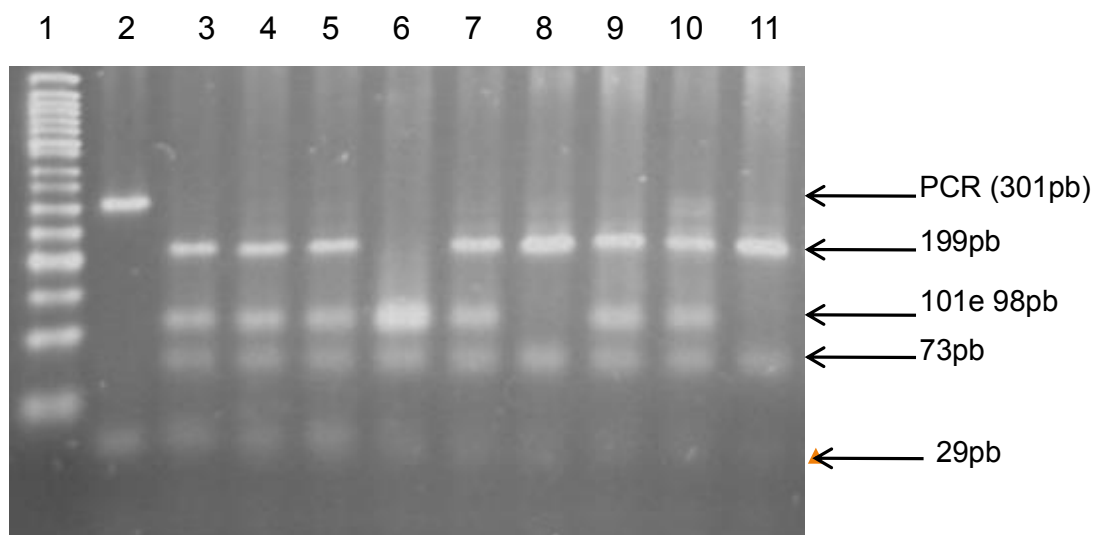


Figura 12: Foto de eletroforese em gel de agarose 3% no qual foram analisadas amostras do polimorfismo do gene *IL-18* (-607) tratado com enzima de restrição (PCR-RFLP) que detecta o polimorfismo. Na raia 1 está o padrão de peso molecular (50pb), na raia 2 está o produto de PCR de 301pb não submetido a digestão da enzima *MseI*. As amostras nas raias 3, 4, 5, 7, 9 e 10 são genótipos CA (199pb, 101pb, 98pb e 73pb), a amostra da raia 6 tem o genótipo AA (101pb, 98pb e 73pb) e as amostras das raias 8 e 11 são genótipos CC (199pb e 73pb) (Farias, 2009).

O polimorfismo do gene *IL-18* na posição -137 (G/C) [rs187238] foi analisado pelo método de PCR-SSP (do inglês, *Specific Sequence Primers*) (GIEDRAITIS et al., 2001). Os *primers* da reação em cadeia da polimerase são compostos por um *primer reverse* comum a ambos os alelos (controle R, Tabela 2) e dois *primers forward* de sequência específica (F1 e F2 específicos, na Tabela 2). Amplificou-se um produto de 261pb. E como controle interno foi usado um o *primer forward* (controle F, gene contitutivo, na Tabela 2) que abrange a região polimórfica, garantindo, assim, que há DNA na amostra analisada, e amplificando um fragmento de 446pb (TAKADA et al., 2002).

O protocolo da PCR para este loco está na Tabela 3 e o programa utilizado no termociclador para a amplificação dos fragmentos está na Tabela 4.

Os produtos de PCR foram visualizados na eletroforese de um gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídeo (1%) (TAKADA et al., 2002), como pode ser observado na Figura 13.

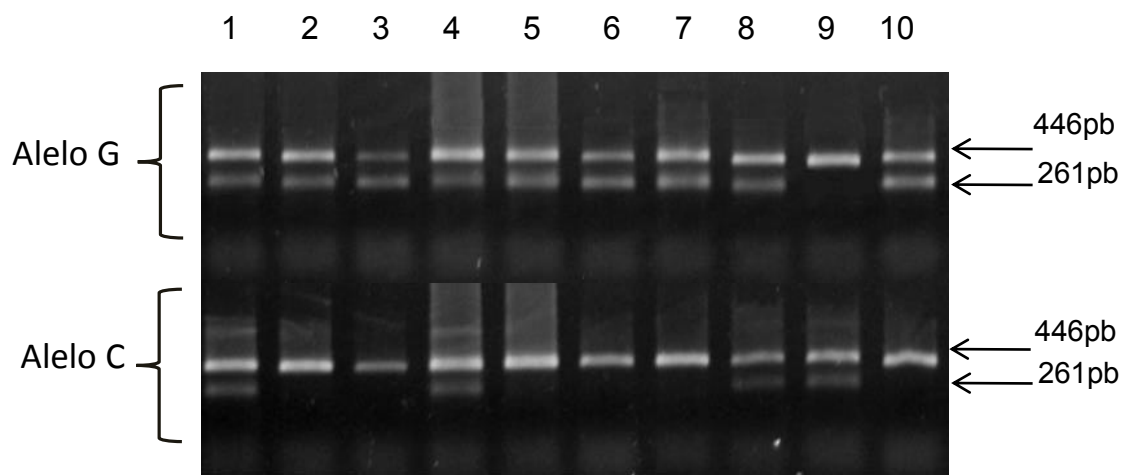


Figura 13 - Foto de eletroforese em gel 1,5% de agarose no qual foram analisadas amostras de PCR do polimorfismo do gene IL-18 (-137) por *primers* de seqüências específicas (PCR-SSP). Na foto, o indicador do alelo G são amostras que amplificaram para o protocolo de PCR-SSP para tal alelo (F1), sendo que a banda de maior tamanho (446pb) é o controle interno da reação e a banda de 261pb contém o alelo G. As amostras na parte inferior na foto estão indicadas para o alelo C que, por conseguinte, foram amplificadas por PCR-SSP para o alelo C (F2), sendo que a banda de 446pb é o controle interno da reação e a banda menor de 261pb contém o alelo C. As raias (vertical) são os mesmos indivíduos que foram submetidos a ambos as reações, desta forma a raia 1, 4 e 8 possuem o genótipo GC. Já as raias 2, 3, 5, 6, 7, 10 são amostras genotipadas como GG e por fim, a amostra da raia 9 é genotipada como CC (Farias, 2009).

3.4 ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO GENE *NKG2D*

Para a identificação do polimorfismo *NKG2D* [rs2255336], foi utilizada a técnica de PCR em tempo real. A técnica de PCR em tempo real foi realizada com a utilização do equipamento *StepOne™* da *Applied Biosystems*. Para a identificação dos polimorfismos foram utilizadas sondas de seqüência específica do tipo Taqman®. Dois tipos de sondas, com fluorescências de comprimento de onda diferentes, foram colocados em solução: VIC® e FAM™. Cada sonda identifica um alelo diferente do polimorfismo.

Os reagentes utilizados nas reações foram adquiridos de kits comerciais da *Applied Biosystems* e os protocolos foram elaborados de acordo com as instruções do fabricante (Tabela 5).

Tabela 5: Reagentes e volumes utilizados no protocolo de genotipagem dos SNPs.

Reagente	Volume para uma amostra
<i>Master Mix Universal TaqMan</i> [®]	10,0 µl
<i>TaqMan</i> [®] SNP Genotyping Assay	1,0 µl
Água ultrapura	7,0 µl
DNA genômico	2,0 µl
Volume Total	20,0 µl

3.5 DETECÇÃO DO POLIMORFISMO DOS GENES KIR ATRAVÉS DE PCR EM TEMPO REAL

A presença ou ausência dos genes KIRs foi avaliada através da técnica de PCR em Tempo Real, realizada no equipamento *StepOne*[™] da *Applied Biosystems*. A quantidade de produto formado foi monitorada ao longo do tempo através da variação observada na fluorescência. Fluoróforos foram adicionados à reação e se ligam ao fragmento amplificado, gerando um sinal de fluorescência que reflete a quantidade de produto formado (KUBISTA et al., 2006). A descrição e as quantidades de reagentes utilizadas em cada reação estão na Tabela 6. No presente trabalho o fluoróforo utilizado foi *Melt Doctor* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA).

Tabela 6: Protocolos da reação da PCR em tempo real para detecção da presença dos genes KIR.

Mix para KIR	1 amostra
MeltDoctor [™] HRM Master Mix	10,0 µl
Primer KIR F (5mM)	1,2 µl
Primer KIR R (5mM)	1,2 µl
Primer F (controle)	1,0µl
Primer R (controle)	1,0µl
Água	6,0 µl
DNA (20ng)	2,0 µl
Volume Total	22,0 µl

As sequências dos iniciadores específicos para amplificação dos genes KIR encontram-se listadas na Tabela 7. As condições da reação de PCR são: 2 min a 50°C e 10 min a 95°C seguido por 40 ciclos de 15s a 95°C e 1 min a 62°C. Foi utilizado o corante *MeltDoctor* que se liga de maneira não específica a qualquer DNA dupla fita presente na reação, incluindo os produtos de amplificação específicos para os genes KIR e os controles internos de amplificação da reação. A diferenciação dos produtos de amplificação específicos dos genes *KIR* foi realizada através da análise das temperaturas de *melting*, de acordo com ALVES et al. (2009) e da curva de dissociação. A amplificação de cada gene foi realizada individualmente devido à proximidade das temperaturas de dissociação. Na reação também foi utilizado um controle interno de amplificação. Esse controle é um gene constitutivo de amplificação obrigatória. Sua ausência indica problemas com a reação e não que a amplificação seja negativa. Esse controle interno garante uma maior qualidade dos resultados evitando falsos negativos.

A análise da presença e ausência dos genes *KIR* foi avaliada através da análise da curva de dissociação (figura 14). As temperaturas de *melting* (dissociação) de cada produto e do controle interno estão na Tabela 7.

Tabela 7: Conjunto de iniciadores utilizados neste trabalho, de acordo com VILCHES et al.(2007) e adaptados para PCR por tempo real quantitativa (ALVES; RAJALINGAM; CANAVEZ, 2009).

Genes KIR	Forward primer	Reverse primer	Temperatura de Melting (Tm)	Desvio padrão (SD)
<i>KIR2DL1</i>	3'GTTGGTCAGATGTCATGTTTGAA'5	3'CCTGCCAGGCTCTTGGC'5	81,44	0,40
<i>KIR2DL3</i>	3'AGACCCCTCAGGAGGTGA'5	3'CAGGAGACCACTTTGGATCA'5	81,44	0,40
<i>KIR2DL4</i>	3'TCAGGACAAAGCCCTTCTGC'5	3'GGACAGGGGACCCCATCTTTC'5	84,32	0,43
<i>KIR2DL5</i>	3'ATCTATCCAGGGGAGGGGAG'5	3'CATAGGGTGAGTCATGGAG'5	85,46	0,43
<i>KIR2DP1</i>	3'CGACACTTTGCACCTCAC'5	3'GGGAGCTGACCAACTGATG'5	83,18	0,53
<i>KIR2DS1</i>	3'TCTCCATCAGTCGCATGAG'5	3'GGTCACTGGGAGCTGAC'5	81,44	0,46
<i>KIR2DS2</i>	3'TGCACAGAGAGGGGAAAGTA'5	3'CCCTGCAAGGTCTTGCA'5	81,42	0,27
<i>KIR2DS3</i>	3'AAACCTTCTCTCAGCCCA'5	3'GCATCTGTAGGTTCTCTCT'5	85,95	0,32
<i>KIR2DS4</i>	3'GGTTCAGGCAGGAGAGAA'5	3'CTGGAAATGTTCCGTKGATG'5	83,25	0,20
<i>KIR2DS5</i>	3'AGAGAGGGGACGTTTAAACC'5	3'CTGATAGGGGAGTGAAGT'5	82,92	0,71
<i>KIR3DL1</i>	3'CCATYGGTCCCATGATGCT'5	3'CCACGATGCCAGGGGA'5	81,58	0,38
<i>KIR3DL2</i>	3'CATGAACGTAAGGCTCCG'5	3'GACCACACGCAGGGCAG'5	85,27	0,50
<i>KIR3DL3</i>	3'AATGTTGGTCAGATGTCAG'5	3'GCYGACAACTCATAGGGTA'5	83,87	0,25
<i>KIR3DP1</i>	3'GTGTGGTAGGAGCCTTAG'5	3'GAAAAACGGTGTTCGGAATAC'5	85,13	0,03
<i>KIR3DP1/2</i>	3'GTACGTCACCCCTCCCATGATGTA'5	3'GAAAAACGGTGTTCGGAATAC'5	87,45	0,10
<i>KIR3DS1</i>	3'CATCGGTTCCATGATGCG'5	3'CCACGATGCCAGGGGA'5	82,24	0,35
<i>Control1</i>	3'GGCTGCACCTGAGGCTAA'5	3'GCCCCAAAAGAACTCGTATTTC'5	87,50	0,23
<i>Control2</i>	3'TTACCAGAGAGCCCTAICGTTCT'5	3'GTCTGCCCATCACCACCTAATT'5	75,00	0,30

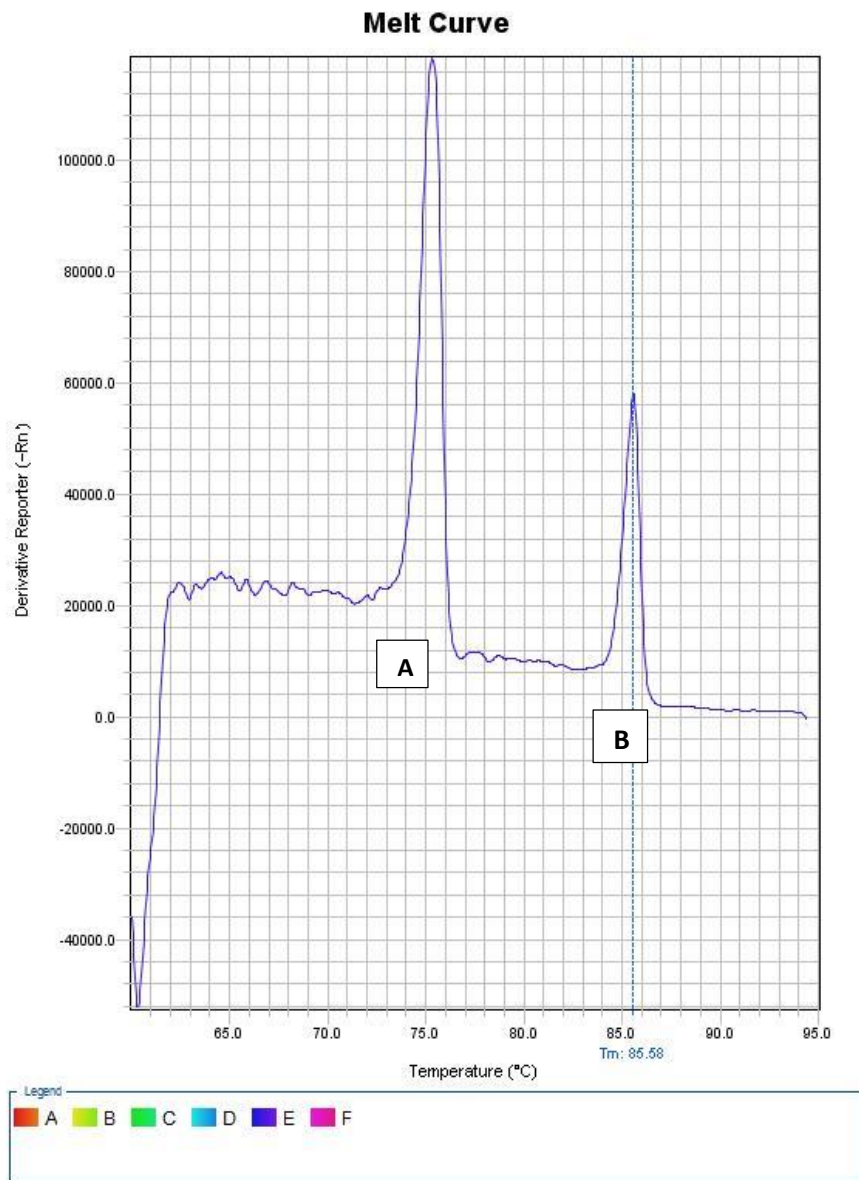


Figura 14: Exemplo de uma das reações realizadas para genotipagem dos genes *KIR* por análise de curva de dissociação. (A) Pico de dissociação do produto do controle interno de reação (gene constitutivo). (B) Pico de dissociação do gene *KIR2DS3* e sua respectiva temperatura de *melting* (dissociação). A presença do gene *KIR* investigado é verificada através dos picos com a temperatura de *melting* específica para o *KIR* analisado.

3.6 ANÁLISE E TRATAMENTO DOS DADOS

Através do *software* GenePop (disponível em <47ign://genepop.curtin.edu.au/>), foram realizados os seguintes cálculos: o teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW); as frequências alélicas e frequências genóticas, tanto para o grupo de pacientes como para o grupo controle; o desequilíbrio de ligação entre os SNPs do gene *IL18*.

Através do *software* HAPSTAT, versão 3.0, as frequências dos haplótipos do gene *IL18* foram estimadas e suas associações com o câncer de mama foram calculadas.

O teste de *Odds Ratio* (OR), ou razão de chances, foi realizado para as análises de associação nos diferentes modelos de herança. Este teste foi realizado através de regressão logística binária, com o uso do programa SPSS (versão 12.0), assumindo-se o intervalo de confiança (IC) de 95% e valor de *p* significativo quando menor ou igual a 0,05. O programa SPSS também foi utilizado para o cálculo do teste *t* de Student, para cálculo das médias.

As frequências de presença de cada gene *KIR* foram calculadas por contagem direta. Devido ao fato de que a ausência de um gene *KIR* é recessiva, no procedimento de tipagem os heterozigotos e os homozigotos para presença do gene apresentam o mesmo resultado. Para calcular a frequência do gene foi utilizada a fórmula de Bernstein: $F = 1 - \sqrt{1 - f}$, sendo (*F*) a frequência gênica estimada e *f* a frequência de presença do gene observada na população. Esta fórmula considera que as amostras estão distribuídas de acordo com equilíbrio de Hardy-Weinberg (SINGLE et al., 2008).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Na Tabela 8 estão apresentadas as características epidemiológicas do grupo de pacientes e do grupo controle, assim como as análises de associação com o câncer de mama. Em relação à idade, os indivíduos dos dois grupos foram divididos em classes de 10 anos. A maioria das mulheres está na faixa entre 44 e 53 anos e as classes de idade tiveram uma porcentagem de indivíduos relativamente semelhante. As médias das idades entre os dois grupos não mostraram diferenças significativas pelo teste *t* de *Student*.

Tabela 8: Características epidemiológicas do grupo de pacientes e do grupo controle.

	CASOS (n=154)	CONTROLES (n=118)	P
Ancestralidade Europeia	130 (84%)	99 (84%)	0,752 ^a
Ancestralidade Africana	16 (10%)	15 (13%)	
Ancestralidade Asiática	1 (1%)	0 (0%)	
Ancestralidade Indígena	2 (1%)	1 (1%)	
Desconhecido	5 (3%)	3 (3%)	
Idade (a): Média (faixa)	53,66 (29-86)	51,04 (17-77)	0,105 ^b
≤ 40 anos	28 (18%)	22 (19%)	0,922 ^a
> 40 anos	126 (82%)	96 (81%)	
Peso (kg): Média (faixa)	67,76 (40-104)	68,35 (41-106)	0,713 ^b
Altura (cm): Média (faixa)	1,59 (1,38-1,78)	1,60 (1,40-1,80)	0,245 ^b
BMI (kg/m²): Média (faixa)	27,03 (17,30-47,48)	26,81 (17,07-54,08)	0,735 ^b
Pré-menopausa	66 (43%)	32 (27%)	0,059 ^a
Pós-menopausa	83 (54%)	67 (57%)	
Desconhecido	5 (3%)	19 (16%)	
Fumante	25 (16%)	10 (8%)	0,091 ^a
Não fumante	129 (84%)	107 (91%)	
Desconhecido	0 (0%)	1 (1%)	

^a Qui quadrado de Pearson (valor de *P*)

^b Teste T; valor de *P*

4.2 ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS FUNCIONAIS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *IL18*

4.2.1 Frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos *IL18 -137* e *IL18 - 607*

Como demonstrado nas Tabelas 9 e 10, as diferenças entre os genótipos em pacientes e controles nesse estudo apresentaram uma associação significativa com o desenvolvimento do câncer de mama em diferentes modelos genéticos. Para os polimorfismos *IL18 - 607* e *IL18 -137*, foi observado um aumento na prevalência dos alelos variantes A e C, respectivamente, nos pacientes de câncer de mama em relação aos controles.

As frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos localizados na região promotora do gene *IL18* estão descritas na Tabela 8. As frequências genótípicas encontram-se de acordo com o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (P). Para os genótipos do polimorfismo -607 (C/A) [rs1946518], das 154 pacientes com câncer de mama, 39 apresentaram o genótipo CC (25%), 66 apresentaram o genótipo CA (43%) e 49 apresentaram o genótipo AA (32%). Para os controles em um total de 118 indivíduos, 43 apresentaram o genótipo CC (37%), 56 apresentaram o genótipo CA (47%) e 19 o genótipo AA (16%).

Para o polimorfismo -137 (G/C) [rs187238], 71 das 154 pacientes apresentaram o genótipo GG (46%), 59 apresentaram o genótipo GC (38%) e 24 o genótipo CC (16%). Nos 118 controles a distribuição dos genótipos foi de 59 indivíduos com o genótipo GG (50%), 54 apresentaram o genótipo GC (46%) e 5 eram genótipo CC (4%).

Para o polimorfismo -607 (C/A) [rs1946518], a presença do genótipo A/A representa um risco 2,843 (P=0,005; IC 95%[1,360-5,986]) vezes maior para o

desenvolvimento de câncer de mama. Para o polimorfismo -137 (G/C) [rs187238] indivíduos com o genótipo C/C apresentaram um risco 3.989 ($P=0,010$; IC 95%[1,333-12,77]) vezes maior de desenvolvimento do câncer de mama.

Tabela 9: Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos das posições -607 e -137 da região promotora do gene *IL18* e valores de *odds ratio* (OR) em casos (pacientes com câncer de mama) e controles.

	Casos	Controles	OR	(IC 95%)	Valor P
<i>IL18 -607</i> (rs1946518)					
Genotypes					
<i>C/C</i>	39 (25%)	43 (36%)	Ref	-	-
<i>C/A</i>	66 (43%)	56 (47%)	1,299	(0,714-2,368)	0,439
<i>A/A</i>	49 (32%)	19 (16%)	2,843	(1,360-5,986)	0,005
Alelo A	0,5325	0,3983	1,691	(0,971-2,947)	0,064
<i>IL18 -137</i> (rs187238)					
Genotypes					
<i>G/G</i>	71 (46%)	59 (50%)	Ref	-	-
<i>G/C</i>	59 (38%)	54 (46%)	0,908	(0,530-1,554)	0,806
<i>C/C</i>	24 (16%)	5 (4%)	3,989	(1,333-12,77)	0,010
Alelo C	0,3474	0,2712	1,169	(0,703-1,945)	0,606

4.2.2 Análise dos modelos de herança dos polimorfismos *IL18 -137* e *IL18 - 607*

Foi realizada a análise de modelos de herança (Tabela 9) com o objetivo de realizar uma análise mais apurada dos mecanismos que envolvem o risco da presença desses polimorfismos e o desenvolvimento do câncer de mama.

Foi encontrada uma associação de risco do polimorfismo *IL18 -607* (C/A) [rs1946518] utilizando o modelo genético aditivo ($P = 0,005$, OR = 1,623, 95%CI [1,154-2,283]), o modelo genético dominante ($P = 0,042$, OR = 1,735, 95%CI [1,019-2,953]) e o modelo genético codominante (CC vs AA, $P = 0,004$ OR = 2,782 95%CI [1,385-5,589]).

Para o polimorfismo *IL18 -137* (G/C) [rs187238] foi encontrada uma associação significativa utilizando o modelo de herança recessivo ($P = 0,008$, OR = 3,896, 95%CI

[1,427, 10,639]) e o modelo codominante (GG vs CC, $P = 0,016$ OR = 3,576 95%CI
[1,262, 10,131]).

Tabela 10: Polimorfismos do gene IL-18 e os modelos de herança analisados em pacientes com câncer de mama e indivíduos controles.

Gene/SNP	Modelo de herança	Análise			Análise ajustada*		
		OR	(CI 95%)	P	OR	(CI 95%)	P
<i>IL-18 -607</i>	Aditivo	1,649	(1,180-2,304)	0,003	1,623	(1,154-2,283)	0,005
	Dominante	1,691	(1,003-2,849)	0,049	1,735	(1,019-2,953)	0,042
	Recessivo	2,432	(1,339-4,416)	0,004	2,243	(1,224-4,110)	0,009
<i>IL-18 -137</i>	Codominante	2,843	(1,434-5,637)	0,003	2,782	(1,385-5,589)	0,004
	Codominante	1,299	(0,742-2,277)	0,360	1,415	(0,794-2,521)	0,239
	Aditivo	1,416	(0,980-2,045)	0,064	1,316	(0,903-1,919)	0,153
<i>IL-18 -137</i>	Dominante	1,169	(0,723-1,890)	0,524	1,046	(0,637-1,718)	0,859
	Recessivo	4,172	(1,541-11,296)	0,005	3,896	(1,427-10,639)	0,008
	Codominante	3,989	(1,433-11,100)	0,008	3,576	(1,262-10,131)	0,016
	Codominante	0,908	(0,548-1,505)	0,708	0,809	(0,479-1,366)	0,428

* Análise ajustada por idade e IMC
 % número relativo; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; P: probabilidade

4.2.3 Frequências dos Haplótipos dos SNPs da região promotora do gene *IL18*

Foi observado no presente estudo que os SNPs *IL18* -607 e *IL18* -137, localizados na região promotora do gene *IL18* encontram-se em desequilíbrio de ligação ($D' = 0,8237$). As frequências dos haplótipos estão demonstradas na Tabela 11. A associação entre os haplótipos do gene *IL18* e o câncer de mama foi confirmada. Foi observado que a frequência do haplótipo -607 C/-137 C foi menor em casos do que em controles (OR = 0,09; $P = 0,024$) e o haplótipo -607 A/-137 C apresentou frequências mais elevadas nos pacientes (OR = 1,64; $P = 0,022$). Os demais haplótipos não apresentaram diferenças significativas.

Tabela 11: Frequências dos Haplótipos dos polimorfismos da região promotora do gene *IL18* em pacientes com câncer de mama (casos) e indivíduos saudáveis (controles).

<i>IL18</i> -607	<i>IL18</i> -137	Frequências estimadas		OR (95% CI)	<i>P</i>
		Casos	Controles		
C	G	0,4598	0,5413	1,00	-
A	C	0,3397	0,2108	1,64 (1,08-2,50)	0,022
A	G	0,1928	0,1875	1,23 (0,78-1,94)	0,380
C	C	0,0077	0,0604	0,09 (0,01-0,71)	0,024

4.3 ANÁLISE DO POLIMORFISMO FUNCIONAL DO GENE RECEPTOR DE CÉLULAS NATURAL KILLER *NKG2D* [RS2255336]

As frequências alélicas e genóticas do polimorfismo funcional do gene *NKG2D* estão descritas na Tabela 12. As frequências genóticas encontram-se de acordo com o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($P > 0,05$). Em relação ao polimorfismo *NKG2D* (rs2255336), das 126 pacientes com câncer de mama analisadas, 86 apresentaram o genótipo GG (68%), 38 apresentaram o genótipo GA (30%) e 2

apresentaram o genótipo AA (3%). Para os controles em um total de 121 indivíduos, 78 apresentaram o genótipo GG (65%), 39 apresentaram o genótipo GA (32%) e 04 o genótipo AA (3%). As diferenças entre as frequências do polimorfismo *NKG2D* [rs2255336] entre pacientes com câncer de mama e controles saudáveis não apresentaram diferença significativa.

Tabela 12: Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo *NKG2D* (rs 2255336) em pacientes com câncer de mama (casos) e indivíduos saudáveis (controles).

	Controles	Casos	OR	(95% CI)	Valor P
<i>NKG2D</i> (rs 2255336)					
Genótipos					
G/G	78 (65%)	86 (68%)	Ref	-	-
G/A	39 (32%)	38 (30%)	0,908	(0,511-1,612)	0,831
A/A	4 (3%)	2 (3%)	0,431	(0,054-2,805)	0,567
Frequências alélicas					
Alelo G	0,81	0,83	Ref	-	-
Alelo A	0,19	0,17	0,873	(0,399-1,906)	0,854

% número relativo; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; P: probabilidade

4.4 ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DOS GENES *KIR*

Na Tabela 13 estão descritas as frequências dos genes *KIR* em pacientes com câncer de mama e indivíduos saudáveis. Os genes moldura (*KIR2DL2*, *KIR3DL3*, *KIR2DL4* e *KIR3DP1*) estavam presentes em pacientes e indivíduos do grupo controle na frequência de 100%.

O gene *KIR2DL3* apresentou uma frequência de 98,41% em pacientes e 92,52% em indivíduos do grupo controle, sendo essa diferença significativa. A presença do gene *KIR2DL3* apresentou um risco de 5,50 ($P = 0,046$; [1,02-33,36]) em relação a ausência desse gene para o desenvolvimento da doença.

A presença do gene *KIR2DL2* apresentou uma frequência de 86,4% em pacientes e 53,1% em indivíduos do grupo controle. Essa diferença significativa representa um risco de 5,62 ($P < 0,0001$; [2,81-11,33]).

Em relação ao gene *KIR2DL5*, a sua frequência significativamente maior nos indivíduos saudáveis, sendo que sua presença se apresentou como um fator de proteção para o desenvolvimento da doença nesse estudo ($P = 0,001$; [0,06-0,53]).

Tabela 13: Frequências dos genes KIR em pacientes com câncer de mama (casos) e indivíduos saudáveis (controles).

Genes KIR	Casos		Controles		OR (IC -95%)	P
Ativatórios						
<i>2DS2</i>	78/128	60,94%	93/166	56,02%	0,82 (0,50-1,34)	0,467
<i>2DS3</i>	29/59	49,15%	29/87	33,33%	0,52 (0,25-1,08)	0,081
<i>2DS4</i>	116/120	96,66%	108/110	98,18%	1,86 (0,29-14,92)	0,759
<i>2DS5</i>	94 /108	87,04%	44/47	93,62%	2,18 (0,55-10,12)	0,355
<i>3DS1</i>	48/118	40,68%	35/96	36,46%	0,84 (0,46-1,51)	0,624
Inibitórios						
<i>2DL1</i>	108/109	99,8%	81/85	95,29%	5,33 (0,57-130,1)	0,232
<i>2DL2</i>	108/125	86,4%	52/98	53,10%	5,62 (2,81-11,33)	<0,0001
<i>2DL3</i>	124/126	98,41%	136/147	92,52%	5,50 (1,02-33,36)	0,046
<i>2DL4</i>	94/94	100%	77/77	100%	-	-
<i>2DL5</i>	47/65	72,31%	87/93	93,55%	0,18 (0,06-0,53)	0,001
<i>3DL1</i>	122/125	97,60%	106/112	94,64%	2,30 (0,50-11,94)	0,496
<i>3DL2</i>	83/83	100%	79/79	100%	-	-
<i>3DL3</i>	82/82	100%	87/87	100%	-	-
Pseudogene						
<i>3DPI</i>	144/144	100%	72/72	100%	-	-
<i>2DL2/2DL3</i>	106/124	85,48%	30/61	49,2%	6,89 (2,83-13,18)	<0,001

% número relativo; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; P: probabilidade

Foi realizada a análise das frequências dos indivíduos que apresentam os dois genes em conjunto *KIR2DL2/KIR2DL3*. Os pacientes apresentaram uma frequência dessa combinação de 85,48% e os indivíduos controles apresentaram uma frequência dessa combinação de 49,2%. Essa diferença foi significativa, e apresentou um risco de 6,86 ($P < 0001$; [2,83-13,18]) com a presença dos dois genes e o desenvolvimento do câncer de mama.

5 DISCUSSÃO

O câncer faz parte da vida humana há muito tempo. Diversas referências ao câncer foram encontradas em relatos da antiguidade. Já na época do Egito antigo, por volta de 1.600 a.C. foram encontrados relatos de métodos de tratamento para tumores. Descrições similares também foram encontradas em manuscritos da Índia antiga, em que descreviam a remoção de tumores. Já o termo câncer em si foi introduzido por Hipócrates que investigou e descreveu diversos tipos de tumores, incluindo o de mama, estômago, pele, garganta, entre outros. Ele notou que os tumores apresentavam características semelhantes entre si, com um aspecto que parecia de um caranguejo e sugeriu que quando possível, deveriam ser removidos (BOZZONE, 2009). Atualmente, a doença, que na verdade consiste em um grupo de aproximadamente 200 tipos de doenças que compartilham as mesmas características como, o crescimento e proliferação celular de maneira descontrolada e divisão celular irregular e desorganizada, ainda permanece, em parte, um desafio para a ciência.

Apesar de diversos avanços em relação a parte diagnóstica e até mesmo de tratamento, ainda é um dos grandes problemas de saúde pública e uma das doenças que mais matam no mundo. Dependendo do tipo de tumor, as taxas de mortalidade ainda são muito elevadas, mesmo com os diversos avanços da medicina. Além disso, os gastos com a doença são muito elevados e algumas ações preventivas poderiam auxiliar a minimizar esse problema. De acordo com dados da Agência Internacional de Pesquisa do Câncer, no ano de 2008, mais de 12,4 milhões de novos casos foram registrados, 7,6 mortes causadas pela doença e 28 milhões de sobreviventes ao câncer foram identificados (JEMAL et al., 2010; UMAR; DUNN; GREENWALD, 2012)

O sistema imune ocupa um importante papel nas diversas áreas de estudos relacionados ao câncer. Um tumor, ao se estabelecer, viola diversos processos metabólicos e a célula tumoral adquire certa independência dos sistemas regulatórios do organismo. O mesmo tenta reverter esse processo através da resposta imune, que nem sempre é efetiva (CAVALLO et al., 2011).

Existe um número significativo de evidências que indicam o papel de grande relevância do sistema imune na batalha do organismo contra o processo tumoral. De acordo com o conceito de imunoeedição existem três fases essenciais de interação entre o organismo hospedeiro e as células tumorais: a eliminação, o equilíbrio e o escape (KIM; EMI; TANABE, 2007). A fase de eliminação consiste no reconhecimento do tumor em crescimento através dos antígenos que essas células tumorais expressam e que permite que células efectoras como as células NK, por exemplo, eliminem o tumor em formação. Essas células também desencadeiam a produção de citocinas que também contribuem para o processo de eliminação das células tumorais (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004).

De maneira subsequente, as células tumorais que eventualmente sobreviveram a essa resposta inicial entram em uma fase de equilíbrio, onde os linfócitos exercem uma pressão seletiva nas células tumorais que são geneticamente instáveis e com altas taxas de mutação. A fase de equilíbrio resulta na seleção imunológica de células tumorais com imunogenicidade diminuída. Ao desenvolverem essa característica, essas células passam a apresentar uma chance maior de sobreviverem em organismos imunocompetentes. Isso explica, em parte, o paradoxo de que mesmo em organismos inicialmente imunologicamente saudáveis, alguns tumores conseguem se desenvolver sem serem eliminados pelo sistema imune. Na fase final, as células tumorais adquirem uma resistência ao sistema imunológico e continuam assim o crescimento e a expansão

de maneira descontrolada e podem assim levar ao estabelecimento de um tumor maligno (DUNN et al., 2004).

Nesse contexto de tantas sutilezas na efetivação do desenvolvimento tumoral, qualquer desequilíbrio pode acarretar em uma maior predisposição para a doença. No presente estudo, o objetivo central foi verificar se polimorfismos genéticos localizados em genes que codificam essas moléculas tão significativas para a resposta imune tumoral podem afetar a efetividade dessa resposta, influenciando no risco para o desenvolvimento do câncer de mama em uma amostra da população de Santa Catarina. Os dados epidemiológicos não apresentaram uma diferença significativa entre pacientes e os indivíduos do grupo controle, indicando uma homogeneidade entre esses dois grupos analisados nesse estudo. Devido ao número incompleto de informações histopatológicas e dificuldades de acesso aos prontuários, não foi possível a análise estratificada das pacientes no que se refere a esses dados e uma possível associação com os polimorfismos analisados.

5.1 GENE *IL18*

Os múltiplos efeitos biológicos da IL-18 indicam um importante papel desta citocina no desenvolvimento tumoral. No entanto, investigações recentes demonstram um papel controverso dessa citocina. Muitos estudos demonstraram uma forte atividade antitumoral, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

No presente estudo foi avaliado, pela primeira vez em uma população brasileira, o papel desses polimorfismos em relação ao desenvolvimento do câncer de mama. Foi encontrada uma associação entre o risco para desenvolvimento do câncer de mama e a presença dos dois alelos variantes presentes na região promotora do gene que codifica a IL-18, -607 (C/A) [rs1946518] e -137 (G/C) [rs187238]. De acordo com um estudo

realizado por GIEDRAITIS et al., 2001 tanto o alelo *IL18* -607A quanto o *IL18* -137C estão associados a uma menor expressão do gene *IL18*. De acordo com os resultados encontrados no presente estudo, a presença do alelo *IL18* -607A em homozigose está associada a um risco maior de desenvolvimento do câncer de mama na população analisada. Esse risco se manteve significativo mesmo quando foi realizada a análise em relação aos diferentes modelos de herança. Nossos resultados demonstram uma associação do genótipo *IL18* -607 AA com o aumento do risco para desenvolver a doença de 2,843 vezes em relação aos indivíduos que não apresentam esse genótipo ($P=0,005$, [IC 95% 1,360-5,986]). Já nos diferentes modelos de herança testados, os significativos foram os modelos aditivo (OR=1,623; $P=0,005$, [IC 95% 1,154-2,283]), modelo dominante (OR=1,735; $P=0,042$, [IC 95% 1,019-2,953]), modelo recessivo (OR=2,243; $P=0,009$, [IC 95% 1,224-4,110]), e codominante (OR=2,782; $P=0,004$, [IC 95% 1,385-5,589]). Sendo que o modelo que melhor explicou o risco para o desenvolvimento da doença foi o codominante, onde foram analisados indivíduos homozigotos para o alelo variante *IL18* -607A e indivíduos homozigotos para o alelo ancestral *IL18* -607C. Quase todos os modelos apresentaram significância, sendo que alguns com o risco aumentado próximo de três, indicando que na população estudada essa variante possui uma importância como fator de risco para o câncer de mama. Para o *IL18* -137 (G/C) [rs187238] nossos resultados também demonstraram uma associação do alelo variante com o aumento de risco de desenvolvimento da doença. Indivíduos com o genótipo homozigoto do alelo variante C, apresentaram um risco próximo a quatro vezes mais de desenvolver a doença em relação aos indivíduos do grupo controle (OR=3,989; $P=0,010$, [IC 95% 1,333-12,77]). Nos diferentes modelos de herança, essa associação significativa se manteve no modelo recessivo (OR=3,896; $P=0,010$, [IC 95% 1,427-10,64]) e no modelo codominante (OR=3,576; $P=0,016$, [IC 95% 1,262-10,13]).

O modelo que melhor explicou o risco para o desenvolvimento do câncer de mama e esse polimorfismo foi o modelo recessivo, onde foram analisados indivíduos com a presença de pelo menos um alelo variante e indivíduos sem a presença do mesmo. A presença de pelo menos um alelo de risco *IL18* -137C se demonstrou como um fator de risco importante para o desenvolvimento do câncer de mama na população analisada.

Em relação à análise das frequências dos haplótipos, a presença dos dois alelos de risco (*IL18* -607A/-137/C) apresentou uma associação com um aumento de risco mais discreto, em relação aos alelos isoladamente (OR=1,64; $P=0,022$, [IC 95% 1,080-2,500]). Mas, quando analisados os indivíduos duplamente homocigotos para os dois alelos de risco, essa associação se demonstrou mais forte ainda (dados não demonstrados). Já a presença do haplótipo *IL18* -607C/-137/C se apresentou como um fator de proteção para o câncer de mama. Talvez esse fator de proteção possa ser explicado pelo papel dual da IL-18 em relação ao câncer de mama. Uma hipótese seria o fato de indivíduos com um alelo de risco e outro de proteção teriam um certo equilíbrio benéfico em relação à resposta imune tumoral o que pode funcionar como um fator protetor.

Existem apenas dois estudos anteriores desses polimorfismos e o câncer de mama, ambos em uma população de origem iraniana (KHALILI-AZAD et al., 2009; TAHERI et al., 2012). Os dois polimorfismos analisados são trocas de apenas um nucleotídeo, mas ambos com efeitos funcionais. Para essa população estudada, as duas variantes apresentam um aumento de risco considerável para o desenvolvimento da doença. Os dois alelos de risco promovem uma diminuição da transcrição do gene que acarreta na produção de níveis diminuídos das citocinas. Nesse contexto, indivíduos com uma menor produção da molécula IL-18 apresentam uma pré-disposição maior para desenvolver o câncer de mama.

Esses dois polimorfismos têm sido investigados em diversos tipos de tumor, como renal (BAI et al., 2007; SÁENZ-LÓPEZ et al., 2010), de ovário (BUSHLEY et al., 2004; SAMSAMI; KHATERE, 2009), nasofaríngeo (GUO; XIA, 2013; PRATESI et al., 2006), cervical (T et al., 2008; YANG et al., 2013), de próstata (LIU et al., 2007), oral (TSAI et al., 2013), colorretal (NIKITEAS et al., 2007), de esôfago (TSUBOI et al., 2004; WEI et al., 2007), de cabeça e pescoço (ASEFI et al., 2009), de estômago (HAGHSHENAS et al., 2009), de pulmão (FARJADFAR et al., 2009), de linfoma (ANDRIE et al., 2009) e de mama (TAHERI et al., 2012).

Uma meta-análise, realizada por MI et al., 2011, identificou uma associação de ambos os polimorfismos *IL18* -607 (C/A) [rs1946518] e -137 (G/C) [rs187238] com o aumento do risco para o desenvolvimento de câncer de maneira geral, ao analisarem diversos estudos em diferentes populações e com diferentes tipos de tumores, os autores sugerem que os polimorfismos da região promotora do *IL18* possuem um papel na modulação do risco para o desenvolvimento de câncer, mas que atuam como alelos de baixa penetrância.

Recentemente, um estudo de meta-análise determinou a associação isoladamente do polimorfismo *IL18* -607 (C/A) [rs1946518] e o envolvimento com o risco de câncer (WANG et al., 2013). Nesse estudo foram avaliados 22 estudos de análise caso-controle, com 4.100 indivíduos com câncer (casos) e 4.327 indivíduos saudáveis (controles). Um aumento significativo do risco foi observado no modelo de herança codominante (CC vs CA) e no modelo dominante (AA/CA vs CC). Em relação às frequências alélicas e outros modelos, não foi encontrada uma associação. Esses achados indicam uma associação desse polimorfismo com a susceptibilidade ao câncer. Da mesma maneira foi realizada uma outra meta-análise analisando o polimorfismo *IL18* -137 (G/C) [rs187238] (LIANG et al., 2013). Nesse estudo foi encontrada uma associação apenas

nas populações de origem asiática e não na caucasiana, e com tumores nasofaríngeos. É importante ressaltar que a maioria desses estudos até então foram realizados em populações asiáticas e existem ainda poucos estudos em outras populações, tanto europeias, americanas e africanas, o que não permite uma conclusão consistente em relação ao papel dessas variantes no risco para o desenvolvimento do câncer.

Em relação aos presentes polimorfismos analisados nesse estudo e o câncer de mama existem apenas dois estudos e ambos na população iraniana. Nossos resultados são os primeiros reportados em uma população diferente, e em conjunto com mais estudos em diferentes regiões poderá auxiliar na elucidação do risco da presença desses alelos para o desenvolvimento do câncer de mama.

Analisando esses resultados fica clara a importância desses dois polimorfismos funcionais no desenvolvimento do câncer de mama. Futuramente, em um modelo de análise de epistasia entre diversos *loci* de associação, estes poderão contribuir para uma estimativa de risco individual mais precisa para o desenvolvimento do câncer de mama e sinalizarem para um importante papel dessa interleucina no câncer de mama.

5.2 GENES DOS RECEPTORES DE CÉLULAS NK

As células NK foram originalmente descritas como grandes linfócitos granulares com citotoxicidade natural contra tumores. Posteriormente foram reconhecidas como uma linhagem à parte de linfócitos, com ambas as funções citotóxica e de produção de citocinas. A aquisição da citotoxicidade celular ao longo da evolução vem sendo associada com o desenvolvimento de um sofisticado e robusto mecanismo de controle e iniciação do processo citolítico e a proteção ao dano tecidual. A intensidade e a qualidade da resposta citotóxica e de produção de citocinas das NK depende do microambiente e as citocinas presentes, assim como as interações com outras células do

sistema imunológico, como as células T, células dendríticas e macrófagos (LONG, 2007). IFN do tipo I, IL-12, IL-15 e IL-18 são potentes ativadores da função citotóxica efetora das células NK (COOPER et al., 2009). Essas células também apresentam um papel como mediadoras dos efeitos anti-tumorais de diversas citocinas recombinantes, como IL-2, IL-12, IL-18 e IL-21. Nesse sentido, a IL-18 é uma citocina diretamente interligada com as células NK e faz parte do seu processo de ativação, assim como estas células também potencializam o efeito anti-tumoral da IL-18.

5.2.1 Gene *NKG2D*

As células NK expressam um repertório de receptores ativatórios e inibitórios que regulam a sua ativação. Entre os receptores ativatórios constitutivamente expressos está o NKG2D. O NKG2D é um receptor ativatório chave encontrado em células NK e também em linfócitos T. A interação NKG2D-ligante estimula o sinal de ativação nas células que expressam esse receptor e promove a lise citotóxica da célula que expressa o ligante (MISTRY; O'CALLAGHAN, 2007). Existem múltiplos ligantes para o NKG2D, todos eles relacionados estruturalmente às moléculas MHC classe I. Em humanos, esses ligantes são MICA/MICB e membros da família RAET1. Os ligantes NKG2D geralmente não são expressos em células saudáveis, mas são encontrados com frequência em situações de estresse celular como infecções virais e processos de transformação celular (LANIER, 2008).

Polimorfismos presentes no gene *NKG2D* propiciam alterações funcionais que acarretam em menor ou maior atividade citotóxica das células NK. Já foram descritos associados a doenças autoimunes (KABALAK et al., 2010; PARK; PARK; SONG, 2008; PIOTROWSKI et al., 2012), hepatite B crônica (MA et al., 2010), resultado de transplante de medula óssea (ESPINOZA et al., 2009), reprodução (UCISIK-

AKKAYA; DORAK, 2009) e alguns tipos de câncer. Atualmente existem poucos estudos analisando polimorfismos localizados no gene *NKG2D* e são ainda mais restritos os que analisam em pacientes com câncer.

HAYASHI et al. (2006) descreveram de maneira pioneira o papel de alguns polimorfismos no gene *NKG2D* na eficiência da resposta citotóxica em uma população japonesa. Esse estudo avaliou um grande número de pacientes com câncer. Além de identificar um haplótipo que aumenta os níveis de atividade citotóxica, esse estudo determinou que o haplótipo de baixa atividade citotóxica confere um risco maior para o desenvolvimento de câncer naquela população. Posteriormente um outro estudo, também realizado na população japonesa, avaliou o papel desses haplótipos em pacientes com câncer colorretal. Nesse estudo foi encontrada uma associação de proteção em relação ao haplótipo de alta atividade citotóxica, indo de encontro ao estudo anterior realizado na população de mesma origem étnica (FURUE et al., 2008b). Em outro estudo de câncer colorretal em uma população norueguesa não foi encontrada uma associação dos polimorfismos analisados com o desenvolvimento do tumor (MELUM et al., 2008).

ROSZAK et al., 2012, avaliaram o mesmo polimorfismo analisado no presente estudo, em pacientes com câncer cervical, *NKG2D* (rs2255336). Esse polimorfismo consiste em uma substituição nucleotídica do tipo transição de G para A, que acarreta em uma troca de aminoácidos, treonina para alanina. Essa variante está localizada em uma região do gene *NKG2D* que codifica uma região transmembrana desse receptor e pode estar associada a um decréscimo na funcionalidade das células NK e células T. Foi encontrada uma associação de proteção significativa do alelo G em relação ao desenvolvimento de câncer cervical.

O presente estudo foi o primeiro a realizar a análise de um polimorfismo funcional do gene *NKG2D* e o seu papel no desenvolvimento do câncer de mama. Apesar desse gene parecer ter um importante papel na imunopatologia dos diversos tipos de câncer, em nosso estudo não foi detectada uma associação significativa do polimorfismo *NKG2D* (*rs2255336*) com o desenvolvimento do câncer de mama. Foi o primeiro a ser realizado, sendo interessante uma investigação futura buscando outros polimorfismos desse gene, que possam estar envolvidos na etiologia e no risco de desenvolvimento de câncer de mama nessa e em outras populações.

5.2.2 Genes *KIR*

Os genes *KIR* formam uma das famílias gênicas mais recentes nos seres humanos (PARHAM, 2005b). Foram descobertos no início dos anos 90 e constituem um conjunto de genes que codificam receptores ativatórios e inibitórios altamente polimórficos e que se ligam aos alótipos MHC classe I. A principal característica que distingue esses receptores dos demais receptores de células NK é a grande variabilidade tanto em termos de presença ou ausência quanto em termos de variabilidade alélica (BASHIROVA et al., 2006). Os receptores *KIR* possuem um papel chave no desenvolvimento e função das células NK. Desde sua descoberta, foram identificados 14 genes que codificam receptores *KIR* e mais dois pseudogenes. Desses, alguns descritos com atividade inibitória (*3DL1-3*, *2DL1-3*, *2DL5*), ativatória (*3DS1*, *2DS1-5*) e um deles com ambas as atividades (*2DL4*).

Diversos estudos apontam a importância da combinação desses genes presente em cada indivíduo e uma predisposição ou proteção para o desenvolvimento de doenças autoimunes como: artrite reumatoide (MAJORCZYK et al., 2014; RAMÍREZ-DE LOS SANTOS et al., 2012), lúpus (HOU et al., 2010), espongilite anquilosante (ZUO et al.,

2014), esclerose múltipla (BETTENCOURT et al., 2014); doenças infecciosas como: HIV-1, hepatite C (MARRAS et al., 2014), tuberculose (BRAUN et al., 2013), citomegalovírus (CHAROUDEH et al., 2013) e malária (YINDOM et al., 2012). Esses receptores também estão associados com o desenvolvimento de diversos tipos de tumores como, por exemplo: melanoma (MIRJAČIĆ MARTINOVIĆ et al., 2011), leucemias (O'REILLY, 2013), pulmão (AL OMAR et al., 2011), câncer cervical (BRESTOVAC et al., 2013), tireoide (ASHOURI et al., 2012) e câncer de mama (JOBIM et al., 2013; OZTURK; GUN; POLAT, 2012).

A interação entre os membros da família de genes *KIR* expressos pelas células NK com as moléculas MHC classe I nas células alvo, possui um papel chave na modulação da vigilância imunológica realizada pelas células NK e na citotoxicidade mediada pelas mesmas (THIELENS; VIVIER; ROMAGNÉ, 2012). Um número considerável de estudos demonstra que a presença de determinados receptores KIR e suas interações com moléculas HLA podem estar associadas à incidência e desenvolvimento de tumores sólidos e hematológicos (PURDY; CAMPBELL, 2010). Essas observações foram constatadas particularmente em relação ao papel de combinações de efeito inibitório, expressas de maneira aumentada em melanomas, câncer de ovário, câncer nasofaríngeo e leucemias crônicas (BUTSCH KOVACIC et al., 2005; CAMPILLO et al., 2013; GIEBEL et al., 2014; MIRJAČIĆ MARTINOVIĆ et al., 2011; NAUMOVA et al., 2005; VENSTROM et al., 2012). Em contraste, combinações onde há uma expressão ativatória aumentada estão associadas a um melhor prognóstico em diversos tumores (JONCKER et al., 2009).

No presente estudo foi analisado o papel da presença dos genes *KIR* no desenvolvimento do câncer de mama em uma população do estado de Santa Catarina. Nossos dados demonstraram um aumento de risco para o desenvolvimento da doença na

presença do gene *KIR2DL2* de 5,62 ($P < 0001$; [2,81-11,33]). Um outro estudo realizado na população do Rio Grande do Sul (JOBIM et al., 2013), também detectou uma frequência maior desse gene em pacientes com câncer de mama em relação aos indivíduos controles de maneira significativa, o que pode indicar que para a população brasileira, a presença desse gene pode aumentar de maneira significativa a susceptibilidade ao desenvolvimento do carcinoma mamário.

Nossos dados demonstram uma frequência de 98,41% do gene *KIR2DL3* em pacientes e de 92,52% em indivíduos controles. Essa diferença foi significativa acarretando em um aumento de risco de 5,50 ($P = 0,046$; [1,02-33,36]) com a presença desse gene. Devido ao resultado de risco aumentado para a doença na presença desses dois genes, foi avaliada também a frequência da presença dos genes *2DL2/2DL3* em conjunto em pacientes e indivíduos do grupo controle. A frequência de pacientes que apresentaram esses dois genes inibitórios em conjunto foi de 85,48% e entre os controles essa frequência foi significativamente menor, com apenas 49,2% dos indivíduos apresentando esses genes em conjunto. Essa combinação apresentou um risco de 6,86 para o desenvolvimento do câncer de mama nessa população analisada ($P < 0001$; [2,83-13,18]). Esse fato condiz com a teoria de que a presença de mais genes com função inibitória acarreta em um risco aumentado para o desenvolvimento do câncer.

Também foi encontrada uma associação de proteção na presença do gene *KIR2DL5*, que se encontra em uma frequência menor nos pacientes em relação aos indivíduos do grupo controle. Esse resultado pode parecer um pouco contraditório, mas atualmente é considerada uma forte associação entre a inflamação crônica e o desenvolvimento do câncer e vem sendo reportada por diversas linhas de pesquisa (COUSSENS; WERB, 2002; VENDRAMINI-COSTA; CARVALHO, 2012; WU et al.,

2014). Nesse sentido, indivíduos com um repertório mais ativatório, podem estimular as de células NK, no sentido de uma resposta inflamatória, que se estabelecer um processo crônico, também pode propiciar um ambiente que favoreça o desenvolvimento tumoral.

Outro estudo anterior avaliando esses genes em relação ao câncer de mama foi realizado em uma amostra de apenas 33 pacientes diagnosticadas com a doença (OZTURK; GUN; POLAT, 2012). Foi encontrada uma frequência menor da presença de genes *KIR2DL1* em pacientes do que em indivíduos controles e uma quantidade aumentada de *KIR2DS1* em pacientes. Devido ao número amostral extremamente reduzido, a análise do mecanismo biológico envolvido nesses resultados fica prejudicada.

Em relação a outros tumores, ASHOURI et al., 2012, encontraram uma frequência aumentada do gene *KIR2DS5* em pacientes com carcinoma de tireoide, e também foi colocada pelos autores a hipótese de que a presença de um repertório de ativação das células NK favorece a criação de um ambiente pró-tumoral. Um estudo realizado em pacientes com tumores de ovário detectou uma frequência aumentada do gene *KIR2DS4* em pacientes em relação ao grupo controle, essa associação foi ainda maior quando as pacientes foram estratificadas em relação a presença de endometriose (GIEBEL et al., 2014). Outro estudo realizado em pacientes com melanoma detectou uma presença aumentada de genes inibitórios e seus ligantes em pacientes (NAUMOVA et al., 2005).

Uma análise realizada com três tipos de tumores sólidos, pulmão, colorretal e rim, identificou uma associação de aumento de risco na presença de genes inibitórios em relação ao câncer de pulmão. Essa associação foi detectada apenas quando foi realizada a análise combinada dos genes *KIR* e seus ligantes HLA (AL OMAR et al.,

2010). Esse é mais um indicativo de que a atividade das células NK inibida favorece o processo tumoral.

Neste contexto, como perspectiva para pesquisas futuras, são necessários estudos adicionais que avaliem não só a presença dos genes *KIR*, mas também a variabilidade alélica desses genes (SHAW; KOLLNBERGER, 2012). Já se sabe que polimorfismos genéticos como trocas nucleotídicas, deleções e duplicações possuem papel preponderante no funcionamento adequado das inúmeras moléculas do organismo humano. Assim, seria muito importante uma análise da variabilidade alélica, principalmente dos genes *2DL2*, *2DL3* e *2DL5* em que foi encontrada uma associação e sua importância também para a etiologia do câncer de mama.

O estudo conjunto dos respectivos ligantes também será de sua importância para que seja obtido um quadro mais completo e conclusivo da possível associação existentes entre estas moléculas e uma associação ao desenvolvimento das doenças. A efetivação da resposta ativatória ou inibitória das células NK não depende apenas da presença ou ausência de seus receptores, mas também da interação dos mesmos com suas moléculas ligantes, assim, torna-se interessante a avaliação futura dessas moléculas ligantes nos pacientes avaliados no presente estudo, para verificar a predominância de combinações inibitórias ou ativatórias. Também é importante sinalizar que os receptores *KIR* se apresentam como possíveis alvos de futuras terapias contra o câncer (MORETTA et al., 2014), assim como outras moléculas do sistema imunológico, por esse motivo o aprofundamento em sua relação com a etiologia do câncer de mama é extremamente indicado.

6 - CONCLUSÕES

O presente estudo realizou a análise de polimorfismos genéticos ligados à regulação de células NK e o desenvolvimento do câncer de mama em uma população do Estado de Santa Catarina. Considera-se que:

- Os polimorfismos funcionais da região promotora do gene *IL18*, -607 (C/A) [rs1946518] e -137 (G/C) [rs187238] se apresentaram como um importante fator de risco para o desenvolvimento do câncer da mama na população estudada.
- A presença do haplótipo (*IL18* -607A/-137C), que apresenta os dois alelos variantes também é um fator de risco para o câncer de mama na população estudada.
- O polimorfismo no gene *NKG2D* [rs2255336], analisado pela primeira vez em pacientes com câncer de mama, nessa população não apresentou uma associação com o desenvolvimento da doença.
- A presença do gene *KIR2DL2* se apresentou como um fator de risco para o câncer de mama na população estudada.
- A presença do gene *KIR2DL3* se apresentou como um fator de risco para o câncer de mama na população estudada.
- A presença dos genes *2DL2/2DL3* em conjunto se apresentou como um fator de risco para o câncer de mama na população estudada.
- A presença do gene *KIR2DL5* se apresentou como um fator de proteção para o desenvolvimento do câncer de mama na população estudada.

Salientamos então a importância da continuidade dos estudos dos polimorfismos envolvidos na regulação das células NK, ampliando o número de indivíduos analisados e adicionando estudos funcionais a fim de elucidar ainda mais o importante papel que esses genes parecem apresentar no desenvolvimento do câncer de mama.

7 REFERÊNCIAS

ADVANI, P.; MORENO-ASPITIA, A. Current strategies for the prevention of breast cancer. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v. 6, p. 59–71, 2014.

AGORIO, C. et al. Live attenuated Salmonella as a vector for oral cytokine gene therapy in melanoma. **The Journal of Gene Medicine**, v. 9, n. 5, p. 416–423, 2007.

AKGUN, M. et al. Serum IL-18 levels in tuberculosis: comparison with pneumonia, lung cancer and healthy controls. **Respirology (Carlton, Vic.)**, v. 10, n. 3, p. 295–9, jun. 2005.

AL OMAR, S. et al. Associations between genes for killer immunoglobulin-like receptors and their ligands in patients with solid tumors. **Human immunology**, v. 71, n. 10, p. 976–81, out. 2010.

AL OMAR, S. Y. et al. Increased killer immunoglobulin-like receptor expression and functional defects in natural killer cells in lung cancer. **Immunology**, v. 133, n. 1, p. 94–104, maio 2011.

ALVES, L. G. T.; RAJALINGAM, R.; CANAVEZ, F. A novel real-time PCR method for KIR genotyping. **Tissue antigens**, v. 73, n. 2, p. 188–91, fev. 2009.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures (2014)**American Cancer Society. Atlanta: [s.n.].

AMIN, M. A et al. Interleukin-18 induces angiogenic factors in rheumatoid arthritis synovial tissue fibroblasts via distinct signaling pathways. **Arthritis and rheumatism**, v. 56, n. 6, p. 1787–97, jun. 2007.

ANDRÉ, P. et al. Comparative analysis of human NK cell activation induced by NKG2D and natural cytotoxicity receptors. **European journal of immunology**, v. 34, n. 4, p. 961–71, abr. 2004.

ANDRIE, E. et al. Genetic variants in immunoregulatory genes and risk for childhood lymphomas. **European journal of haematology**, v. 83, n. 4, p. 334–42, out. 2009.

ANTONIOU, A C. et al. The BOADICEA model of genetic susceptibility to breast and ovarian cancer. **British journal of cancer**, v. 91, n. 8, p. 1580–90, 18 out. 2004.

APARICIO, S.; CALDAS, C. The Implications of Clonal Genome Evolution for Cancer Medicine. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 9, p. 842–851, 2013.

ASEFI, V. et al. Head and neck squamous cell carcinoma is not associated with interleukin-18 promoter gene polymorphisms: a case-control study. **The Journal of laryngology and otology**, v. 123, n. 4, p. 444–8, abr. 2009.

ASHOURI, E. et al. Activating KIR2DS5 receptor is a risk for thyroid cancer. **Human immunology**, v. 73, n. 10, p. 1017–22, out. 2012.

- BAI, J. et al. Interleukin-18 gene polymorphisms and haplotypes in patients with oral lichen planus: a study in an ethnic Chinese cohort. **Tissue antigens**, v. 70, n. 5, p. 390–7, nov. 2007.
- BALKWILL, F.; COUSSENS, L. M. An inflammatory link. **Nature**, v. 431, n. September, p. 405–406, 2004.
- BASHIROVA, A. A. et al. The Killer Immunoglobulin-Like Receptor Gene Cluster: Tuning the Genome for Defense. **Annual Reviews in Genomics and Human genetics**, v. 7, p. 277–300, 2006.
- BETTENCOURT, A. et al. The role of KIR2DS1 in multiple sclerosis--KIR in Portuguese MS patients. **Journal of neuroimmunology**, v. 269, n. 1-2, p. 52–5, 15 abr. 2014.
- BIET, F.; LOCHT, C.; KREMER, L. Immunoregulatory functions of interleukin 18 and its role in defense against bacterial pathogens. **Journal of molecular medicine**, v. 80, p. 147–162, 2002.
- BINDEA, G. et al. Natural immunity to cancer in humans. **Current opinion in immunology**, v. 22, n. 2, p. 215–22, abr. 2010.
- BISSELL, M. J.; HINES, W. C. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. **Nature medicine**, v. 17, n. 3, p. 320–9, mar. 2011.
- BLANKENSTEIN, T. et al. The determinants of tumour immunogenicity. **Nature reviews. Cancer**, v. 12, n. 4, p. 307–13, abr. 2012.
- BORRELLO, M. G.; DEGL'INNOCENTI, D.; PIEROTTI, M. A. Inflammation and cancer: the oncogene-driven connection. **Cancer letters**, v. 267, n. 2, p. 262–70, 28 ago. 2008.
- BRAUD, V. M. et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 795–9, 19 fev. 1998.
- BRAUN, K. et al. Killer immunoglobulin-like receptor (KIR) centromeric-AA haplotype is associated with ethnicity and tuberculosis disease in a Canadian First Nations cohort. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e67842, jan. 2013.
- BRESTOVAC, B. et al. Human papillomavirus, high-grade intraepithelial neoplasia and killer immunoglobulin-like receptors: a Western Australian cohort study. **Infectious agents and cancer**, v. 8, n. 1, p. 33, jan. 2013.
- BROMBERG, J.; WANG, T. C. Inflammation and cancer: IL-6 and STAT3 complete the link. **Cancer cell**, v. 15, n. 2, p. 79–80, 3 fev. 2009.
- BUI, J. D.; SCHREIBER, R. D. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? **Current opinion in immunology**, v. 19, n. 2, p. 203–8, abr. 2007.
- BUKAN, N. et al. Serum interleukin-18 and nitric oxide activity in bladder carcinoma. **European cytokine network**, v. 14, n. 3, p. 163–7, 2003.

BUSCHE, A. et al. Natural killer cell-mediated rejection of experimental human lung cancer by genetic overexpression of major histocompatibility complex class I chain-related gene A. **Human gene therapy**, v. 17, n. 2, p. 135–46, fev. 2006.

BUSHLEY, A. W. et al. Polymorphisms of interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-6, IL-10, and IL-18 and the risk of ovarian cancer. **Gynecologic oncology**, v. 95, n. 3, p. 672–9, dez. 2004.

BUTSCH KOVACIC, M. et al. Variation of the killer cell immunoglobulin-like receptors and HLA-C genes in nasopharyngeal carcinoma. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 14, n. 11 Pt 1, p. 2673–7, nov. 2005.

CAMPBELL, K. S.; PURDY, A. K. Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. **Immunology**, v. 132, n. 3, p. 315–25, mar. 2011.

CAMPILLO, J. A et al. KIR gene variability in cutaneous malignant melanoma: influence of KIR2D/HLA-C pairings on disease susceptibility and prognosis. **Immunogenetics**, v. 65, n. 5, p. 333–43, maio 2013.

CAVALLO, F. et al. 2011: the immune hallmarks of cancer. **Cancer immunology immunotherapy**, p. 319–326, 2011.

CERWENKA, A; LANIER, L. L. Ligands for natural killer cell receptors: redundancy or specificity. **Immunological reviews**, v. 181, p. 158–69, jun. 2001.

CHAROUDEH, H. N. et al. Modulation of the natural killer cell KIR repertoire by cytomegalovirus infection. **European journal of immunology**, v. 43, n. 2, p. 480–7, fev. 2013.

CHIN, K. et al. Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiology. **Cancer cell**, v. 10, n. 6, p. 529–41, dez. 2006.

CHO, D. et al. Endogenous Interleukin-18 Modulates Immune Escape of Murine Melanoma Cells by Regulating the Expression of Fas Ligand and Reactive Oxygen Intermediates
Endogenous Interleukin-18 Modulates Immune Escape of Murine Melanoma Cells by Regulating the Expression. **Cancer research**, v. 60, n. 3, p. 2703–2709, 2000.

COLUCCI, F.; CALIGIURI, M. A; DI SANTO, J. P. What does it take to make a natural killer? **Nature reviews. Immunology**, v. 3, n. 5, p. 413–25, maio 2003.

COMA, G. et al. Treatment of monocytes with interleukin (IL)-12 plus IL-18 stimulates survival, differentiation and the production of CXC chemokine ligands (CXCL)8, CXCL9 and CXCL10. **Clinical and experimental immunology**, v. 145, n. 3, p. 535–44, set. 2006.

COOPER, M. A et al. Cytokine-induced memory-like natural killer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 6, p. 1915–9, 10 fev. 2009.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. December, p. 860–867, 2002.

- DE VISSER, K. E.; COUSSENS, L. M. The interplay between innate and adaptive immunity regulates cancer development. **Cancer immunology, immunotherapy : CII**, v. 54, n. 11, p. 1143–52, nov. 2005.
- DE VISSER, K. E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L. M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature reviews. Cancer**, v. 6, n. 1, p. 24–37, jan. 2006.
- DE VISSER, K. E.; KORETS, L. V.; COUSSENS, L. M. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. **Cancer cell**, v. 7, n. 5, p. 411–23, maio 2005.
- DIEFENBACH, A; RAULET, D. H. Strategies for target cell recognition by natural killer cells. **Immunological reviews**, v. 181, n. 7, p. 170–84, jun. 2001.
- DINARELLO, C. A et al. Interleukin-18 and IL-18 binding protein. **Frontiers in immunology**, v. 4, n. October, p. 289, jan. 2013.
- DOSSUS, L. et al. Active and passive cigarette smoking and breast cancer risk: results from the EPIC cohort. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 134, n. 8, p. 1871–88, 15 abr. 2014.
- DUNN, G. P. et al. of Cancer Immun-surveillance and Immunoediting. v. 21, p. 137–148, 2004.
- DUNN, G. P.; KOEBEL, C. M.; SCHREIBER, R. D. Interferons, immunity and cancer immunoediting. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 11, p. 836–48, nov. 2006.
- DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The three Es of cancer immunoediting. **Annual review of immunology**, v. 22, n. 4, p. 329–60, jan. 2004.
- EAGLE, R. A.; TROWSDALE, J. Promiscuity and the single receptor: NKG2D. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. september, p. 737–744, 2007.
- EASTON, D. F. et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. **Nature**, v. 447, n. 7148, p. 1087–93, 28 jun. 2007.
- EISSA, S. A L. et al. Importance of serum IL-18 and RANTES as markers for breast carcinoma progression. **Journal of the Egyptian National Cancer Institute**, v. 17, n. 1, p. 51–5, mar. 2005.
- EMAUS, M. J. et al. Weight change in middle adulthood and breast cancer risk in the EPIC-PANACEA study. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 00, p. 1–13, 26 abr. 2014.
- ESPINOZA, J. L. et al. NKG2D gene polymorphism has a significant impact on transplant outcomes after HLA-fully-matched unrelated bone marrow transplantation for standard risk hematologic malignancies. **Haematologica**, v. 94, n. 10, p. 1427–34, out. 2009.
- FARJADFAR, A. et al. Interleukin-18 promoter polymorphism is associated with lung cancer: a case-control study. **Acta oncologica (Stockholm, Sweden)**, v. 48, n. 7, p. 971–6, jan. 2009.
- FERRARI, P. et al. Lifetime alcohol use and overall and cause-specific mortality in the European Prospective Investigation into Cancer and nutrition (EPIC) study. **BMJ open**, v. 4, n. 7, p. e005245, jan. 2014.

- FINN, O. J. Cancer immunology. **The New England journal of medicine**, v. 358, n. 25, p. 2704–15, 19 jul. 2008.
- FLETCHER, O.; HOULSTON, R. S. Architecture of inherited susceptibility to common cancer. **Nature reviews cancer**, v. 10, n. MAy, p. 353–361, 2010.
- FOSTER, S. S. et al. Cell cycle- and DNA repair pathway-specific effects of apoptosis on tumor suppression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 25, p. 9953–9958, 2012.
- FUJITA, K. et al. Cytokine profiling of prostatic fluid from cancerous prostate glands identifies cytokines associated with extent of tumor and inflammation. **The Prostate**, v. 68, n. 8, p. 872–82, 1 jun. 2008.
- FURUE, H. et al. Decreased risk of colorectal cancer with the high natural killer cell activity NKG2D genotype in Japanese. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 2, p. 316–20, fev. 2008a.
- FURUE, H. et al. Decreased risk of colorectal cancer with the high natural killer cell activity NKG2D genotype in Japanese. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 2, p. 316–20, fev. 2008b.
- GARCIA, C. et al. Risk management options elected by women after testing positive for a BRCA mutation. **Gynecologic oncology**, v. 132, n. 2, p. 428–33, fev. 2014.
- GARLANDA, C.; DINARELLO, C. A; MANTOVANI, A. The interleukin-1 family: back to the future. **Immunity**, v. 39, n. 6, p. 1003–18, 12 dez. 2013.
- GIEBEL, S. et al. Associations between genes for killer immunoglobulin-like receptors and their ligands in patients with epithelial ovarian cancer. **Human immunology**, v. 75, n. 6, p. 508–13, jun. 2014.
- GIEDRAITIS, V. et al. Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation. **Journal of Neuroimmunology**, v. 112, p. 146–152, 2001.
- GILLIES, R. J.; VERDUZCO, D.; GATENBY, R. A. Evolutionary dynamics of carcinogenesis and why targeted therapy does not work. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 7, p. 487–493, 2012.
- GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883–99, 19 mar. 2010.
- GUO, X.-G.; XIA, Y. The Interleukin-18 Promoter -607C>A Polymorphism Contributes to Nasopharyngeal Carcinoma Risk: Evidence from a Meta-analysis Including 1,886 Subjects. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 14, n. 12, p. 7577–81, jan. 2013.
- GUTCHER, I. et al. Interleukin 18-independent engagement of interleukin 18 receptor-a is required for autoimmune inflammation. **Nature immunology**, v. 7, n. 9, p. 946–953, 2006.
- HAGHSHENAS, M. R. et al. IL-18 serum level and IL-18 promoter gene polymorphism in Iranian patients with gastrointestinal cancers. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 24, n. 6, p. 1119–22, jun. 2009.

- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 4 mar. 2011.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A.; FRANCISCO, S. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57–70, 2000.
- HASHEMI, M. et al. Functional Polymorphisms of FAS and FASL Gene and Risk of Breast Cancer – Pilot Study of 134 Cases. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e53075, 2013.
- HAYASHI, T. et al. Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes and cancer immunosurveillance. **Cancer research**, v. 66, n. 1, p. 563–70, 1 jan. 2006.
- HOU, Y.-F. et al. Disparate distribution of activating and inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor genes in patients with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 19, n. 1, p. 20–6, jan. 2010.
- HU, H. et al. Expression of Interleukin-18 by Nasopharyngeal Carcinoma Cells: A Factor That Possibly Initiates the Massive Leukocyte Infiltration. **Human Pathology**, v. 35, n. 6, p. 722–728, 2004.
- HUA, Z. et al. PD-1 polymorphisms are associated with sporadic breast cancer in Chinese Han population of Northeast China. **Breast cancer research and treatment**, v. 129, n. 1, p. 195–201, ago. 2011.
- HUNTER, D. J. et al. A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer. **Nature genetics**, v. 39, n. 7, p. 870–4, jul. 2007.
- INOUE, J.-I. et al. NF-kappaB activation in development and progression of cancer. **Cancer science**, v. 98, n. 3, p. 268–74, mar. 2007.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: [s.n.].
- JEANNET, G.; COUDERT, J. D.; HELD, W. T and B lymphocytes exert distinct effects on the homeostasis of NK cells. **European journal of immunology**, v. 36, n. 10, p. 2725–34, out. 2006.
- JEBREEL, A et al. Investigation of interleukin 10, 12 and 18 levels in patients with head and neck cancer. **The Journal of laryngology and otology**, v. 121, n. 3, p. 246–52, mar. 2007.
- JEMAL, A. et al. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 19, n. 8, p. 1893–907, ago. 2010.
- JIANG, L. et al. CD44 rs13347 C>T polymorphism predicts breast cancer risk and prognosis in Chinese populations. **Breast cancer research : BCR**, v. 14, n. 4, p. R105, 12 jul. 2012.
- JOBIM, M. R. et al. Analysis of KIR gene frequencies and HLA class I genotypes in breast cancer and control group. **Human immunology**, v. 74, n. 9, p. 1130–3, set. 2013.

- JONCKER, N. T. et al. NK cell responsiveness is tuned commensurate with the number of inhibitory receptors for self-MHC class I: the rheostat model. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 182, n. 8, p. 4572–80, 15 abr. 2009.
- KABALAK, G. et al. Association of an NKG2D gene variant with systemic lupus erythematosus in two populations. **Human immunology**, v. 71, n. 1, p. 74–8, jan. 2010.
- KALINA, U. et al. Genomic Organization and Regulation of the Human Interleukin-18 Gene. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 52, p. 525–530, 2000.
- KANG, J. S. et al. Interleukin-18 increases metastasis and immune escape of stomach cancer via the downregulation of CD70 and maintenance of CD44. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 12, p. 1987–96, dez. 2009.
- KARIN, M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. **Nature**, v. 441, n. 7092, p. 431–6, 25 maio 2006.
- KHALILI-AZAD, T. et al. Association of Interleukin-18 gene promoter polymorphisms with breast cancer. **Neoplasma**, v. 56, n. 1, p. 22–25, 2009.
- KIM, H. J.; HAWKE, N.; BALDWIN, A S. NF-kappaB and IKK as therapeutic targets in cancer. **Cell death and differentiation**, v. 13, n. 5, p. 738–47, maio 2006.
- KIM, R.; EMI, M.; TANABE, K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. **Immunology**, v. 121, n. 1, p. 1–14, maio 2007.
- KOHKA, H. et al. up-regulates ICAM-1 (CD54) expression in KG-1 cells Abstract : Intercellular adhesion molecule-1. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 64, n. October, p. 2–5, 1998.
- KRETOWSKI, A. et al. **Interleukin-18 promoter polymorphisms in type 1 diabetes**. **Diabetes**, nov. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23557801>>
- KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular aspects of medicine**, v. 27, n. 2-3, p. 95–125, 2006.
- LANIER, L. L. Missing self, NK cells, and The White Album. **Journal of immunology**, v. 174, n. 11, p. 6565, 1 jun. 2005.
- LANIER, L. L. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. **Nature immunology**, v. 9, n. 5, p. 495–502, maio 2008.
- LI, C.-J. et al. Correlations of IFN- γ genetic polymorphisms with susceptibility to breast cancer: a meta-analysis. **Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 35, n. 7, p. 6867–77, jul. 2014.
- LI, D. et al. Association of CTLA-4 gene polymorphisms with sporadic breast cancer risk and clinical features in Han women of northeast China. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 364, n. 1-2, p. 283–90, maio 2012.
- LIANG, T.-J. et al. The -137G>C polymorphism in interleukin-18 promoter region and cancer risk: evidence from a meta-analysis of 21 studies. **Tumour biology : the journal of the**

International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, v. 34, n. 6, p. 3483–90, dez. 2013.

LIEW, F. Y. The role of innate cytokines in inflammatory response. **Immunology letters**, v. 85, p. 131–134, 2003.

LIU, W. et al. Overexpression of Interleukin-18 Induces Growth Inhibition, Apoptosis and Gene Expression Changes in a Human Tongue Squamous Cell Carcinoma Cell Line. **Journal of International Medical Research**, v. 40, n. 2, p. 537–544, 1 abr. 2012.

LIU, Y. et al. Genetic polymorphisms of the interleukin-18 gene and risk of prostate cancer. **DNA and cell biology**, v. 26, n. 8, p. 613–8, ago. 2007.

LJUNGGREN, H. G.; KÄRRE, K. In search of the “missing self”: MHC molecules and NK cell recognition. **Immunology today**, v. 11, n. 7, p. 237–44, jul. 1990.

LOKATE, M. et al. Age-related changes in mammographic density and breast cancer risk. **American journal of epidemiology**, v. 178, n. 1, p. 101–9, 1 jul. 2013.

LONG, E. O. Ready for prime time: NK cell priming by dendritic cells. **Immunity**, v. 26, n. 4, p. 385–7, abr. 2007.

LONG, J. et al. Identification of a functional genetic variant at 16q12.1 for breast cancer risk: results from the Asia Breast Cancer Consortium. **PLoS genetics**, v. 6, n. 6, p. e1001002, jun. 2010.

MA, J. et al. Association of NKG2D Genetic Polymorphism with Susceptibility to Chronic Hepatitis B in a Han Chinese Population. **Journal of Medical Virology**, v. 82, p. 1501–1507, 2010.

MAJORCZYK, E. et al. Presence of the full-length KIR2DS4 gene reduces the chance of rheumatoid arthritis patients to respond to methotrexate treatment. **BMC musculoskeletal disorders**, v. 15, n. 1, p. 256, jan. 2014.

MARJANOVIC, N. D.; WEINBERG, R. A.; CHAFFER, C. L. Cell Plasticity and Heterogeneity in Cancer. **Clinica Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 168–177, 2013.

MARRAS, F. et al. Baseline and Dynamic Expression of Activating NK Cell Receptors in the Control of Chronic Viral Infections: The Paradigm of HIV-1 and HCV. **Frontiers in immunology**, v. 5, n. July, p. 305, jan. 2014.

MELUM, E. et al. Investigation of cholangiocarcinoma associated NKG2D polymorphisms in colorectal carcinoma. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 123, n. 1, p. 241–2, 1 jul. 2008.

MI, Y.-Y. et al. Review and pooled analysis of studies on -607(C/A) and -137(G/C) polymorphisms in IL-18 and cancer risk. **Medical oncology (Northwood, London, England)**, v. 28, n. 4, p. 1107–15, dez. 2011.

MIRJAČIĆ MARTINOVIĆ, K. et al. The stage dependent changes in NK cell activity and the expression of activating and inhibitory NK cell receptors in melanoma patients. **The Journal of surgical research**, v. 171, n. 2, p. 637–49, dez. 2011.

- MISTRY, A. R.; O'CALLAGHAN, C. A. Regulation of ligands for the activating receptor NKG2D. **Immunology**, v. 121, n. 4, p. 439–47, ago. 2007.
- MORETTA, A. et al. Activating Receptors and Coreceptors Involved in Human Natural Killer Cell-Mediated Cytolysis. **Annual review of immunology**, v. 19, p. 197–223, 2001.
- MORETTA, L. et al. Human NK cells: from surface receptors to the therapy of leukemias and solid tumors. **Frontiers in immunology**, v. 5, n. March, p. 87, jan. 2014.
- MUTCH, D.; DENNY, L.; QUINN, M. Hereditary gynecologic cancers. **International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics**, v. 124, n. 3, p. 189–92, mar. 2014.
- NAKANISHI, K. et al. Interleukin-18 Regulates Both Th1 and Th2 Responses. **Annual review of immunology**, v. 19, p. 423–474, 2001.
- NAROD, S. A. Modifiers of risk of hereditary breast and ovarian cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. February, p. 113–123, 2002.
- NAUMOVA, E. et al. Genetic polymorphism of NK receptors and their ligands in melanoma patients: prevalence of inhibitory over activating signals. **Cancer immunology, immunotherapy : CII**, v. 54, n. 2, p. 172–8, fev. 2005.
- NAUMOVA, E. et al. Impact of KIR/HLA ligand combinations on immune responses in malignant melanoma. **Cancer immunology, immunotherapy : CII**, v. 56, n. 1, p. 95–100, jan. 2007.
- NI, J. et al. Sustained effector function of IL-12/15/18-preactivated NK cells against established tumors. **The Journal of experimental medicine**, v. 209, n. 13, p. 2351–65, 17 dez. 2012.
- NIKITEAS, N. et al. Heterozygosity for Interleukin-18 – 607 A / C Polymorphism is Associated with Risk for Colorectal Cancer. **Anticancer research**, v. 3854, p. 3849–3853, 2007.
- NORMAN, P. et al. Natural killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) locus profiles in African and South Asian populations. **Genes and immunity**, v. 3, p. 86–95, 2002.
- O'REILLY, R. J. Allelic polymorphisms of inhibitory killer immunoglobulin-like receptor natural killer cell function can also influence the graft-versus-leukemia response. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 31, n. 30, p. 3742–5, 20 out. 2013.
- ORR, N. et al. Genetic variants at chromosomes 2q35, 5p12, 6q25.1, 10q26.13, and 16q12.1 influence the risk of breast cancer in men. **PLoS genetics**, v. 7, n. 9, p. e1002290, set. 2011.
- OZTURK, O. G.; GUN, F. D.; POLAT, G. Killer cell immunoglobulin-like receptor genes in patients with breast cancer. **Medical oncology (Northwood, London, England)**, v. 29, n. 2, p. 511–5, jun. 2012.
- PAGES, F. et al. Control of tumor development by intratumoral cytokines. **Immunology Letters**, v. 68, p. 135–139, 1999.
- PARHAM, P. Immunogenetics of killer cell immunoglobulin-like receptors. **Molecular Immunology**, v. 42, p. 459–462, 2005a.

- PARHAM, P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. **Nature reviews. Immunology**, v. 5, n. 3, p. 201–14, mar. 2005b.
- PARK, K. S.; PARK, J. H.; SONG, Y. W. Inhibitory NKG2A and activating NKG2D and NKG2C natural killer cell receptor genes: susceptibility for rheumatoid arthritis. **Tissue antigens**, v. 72, n. 4, p. 342–6, out. 2008.
- PASSWEG, J. R. et al. HLA and KIR polymorphisms affect NK-cell anti-tumor activity. **Trends in immunology**, v. 28, n. 10, p. 437–41, out. 2007.
- PERKINS, N. D. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 8, n. 1, p. 49–62, jan. 2007.
- PIOTROWSKI, P. et al. Prevalence of the NKG2D Thr72Ala polymorphism in patients with systemic lupus erythematosus. **Molecular biology reports**, v. 39, n. 2, p. 1343–7, mar. 2012.
- PRATESI, C. et al. Interleukin-10 and interleukin-18 promoter polymorphisms in an Italian cohort of patients with undifferentiated carcinoma of nasopharyngeal type. **Cancer immunology immunotherapy CII**, v. 55, n. 1, p. 23–30, 2006.
- PURDY, A. K.; CAMPBELL, K. S. NIH Public Access. **Cancer Biology & Therapy**, v. 8, n. 23, p. 13–22, 2010.
- QUANTE, A. S. et al. Breast cancer risk assessment across the risk continuum: genetic and nongenetic risk factors contributing to differential model performance. **Breast cancer research : BCR**, v. 14, n. 6, p. R144, 5 nov. 2012.
- RAMÍREZ-DE LOS SANTOS, S. et al. Associations of killer cell immunoglobulin-like receptor genes with rheumatoid arthritis. **Disease markers**, v. 33, n. 4, p. 201–6, jan. 2012.
- REDDY, P. Interleukin-18: recent advances. **Current opinion in hematology**, v. 11, n. 6, p. 405–10, nov. 2004.
- REDLINGER, R. E. et al. Synergistic interleukin-18 and low-dose interleukin-2 promote regression of established murine neuroblastoma in vivo. **Journal of pediatric surgery**, v. 38, n. 3, p. 301–7; discussion 301–7, mar. 2003.
- RITTE, R. et al. Reproductive factors and risk of hormone receptor positive and negative breast cancer : a cohort study. **BMC cancer**, v. 13, p. 1–12, 2013.
- ROSZAK, A.; LIANERI, M.; JAGODZIŃSKI, P. P. Prevalence of the NKG2D Thr72Ala polymorphism in patients with cervical carcinoma. **Genetic testing and molecular biomarkers**, v. 16, n. 8, p. 841–5, ago. 2012.
- RUSSO, J. et al. Chapter 1: Developmental, Cellular, and Molecular Basis of Human Breast Cancer. **JNCI Monographs**, v. 2000, n. 27, p. 17–37, 1 jul. 2000.
- S.A.MILLER; D.D.DYKES; H.F.POLESKY. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 55404, 1988.
- SAÉNZ-LÓPEZ, P. et al. Impact of interleukin-18 polymorphisms-607 and -137 on clinical characteristics of renal cell carcinoma patients. **Human immunology**, v. 71, n. 3, p. 309–13, mar. 2010.

SAINSBURY, J. R. C.; ANDERSON, T. J.; LMORGAN, D. A. Breast cancer. **BMJ**, v. 321, n. 9, p. 745 – 751, 2000.

SAMBROOK, J. G.; BECK, S. **Evolutionary vignettes of natural killer cell receptors.** **Current opinion in immunology**, out. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17884420>>

SAMSAMI, A.; KHATERE, D. Æ. Interleukin-18 gene promoter and serum level in women with ovarian cancer. **Molecular biology reports**, v. 36, n. 36, p. 2393–2397, 2009.

SANTOURLIDIS, S. et al. Crucial Role of DNA Methylation in Determination of Clonally Distributed Killer Cell Ig-like Receptor Expression Patterns in NK Cells. **The Journal of Immunology**, v. 169, p. 4253–4261, 2002.

SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science (New York, N.Y.)**, v. 331, n. 6024, p. 1565–70, 25 mar. 2011.

SHAW, J.; KOLLNBERGER, S. New perspectives on the ligands and function of the killer cell immunoglobulin-like receptor KIR3DL2 in health and disease. **Frontiers in immunology**, v. 3, n. November, p. 339, jan. 2012.

SHIRATORI, I. et al. Recombinant interleukin-12 and interleukin-18 antitumor therapy in a guinea-pig hepatoma cell implant model. **Cancer science**, v. 98, n. 12, p. 1936–42, dez. 2007.

SHOWS, I.--ENCODING P. D. N. A. et al. Double-blind Placebo-controlled Study With Interleukin-18 Antitumor Effect in Metastatic Melanoma in Gray Horses. **Journal of Immunotherapy**, v. 34, n. 1, p. 58–64, 2011.

SHUANG, C. et al. Association of CD40 gene polymorphisms with sporadic breast cancer in Chinese Han women of Northeast China. **PloS one**, v. 6, n. 8, p. e23762, jan. 2011.

SIDDIQ, A. et al. A meta-analysis of genome-wide association studies of breast cancer identifies two novel susceptibility loci at 6q14 and 20q11. **Human molecular genetics**, v. 21, n. 24, p. 5373–84, 15 dez. 2012.

SINGLE, R. M. et al. Methods for assessing gene content diversity of KIR with examples from a global set of populations. **Immunogenetics**, v. 60, n. 12, p. 711–25, dez. 2008.

SIVALINGAM, S. P. et al. Single-nucleotide polymorphisms of the interleukin-18 gene promoter region in rheumatoid arthritis patients: protective effect of AA genotype. **Tissue antigens**, v. 62, p. 498–504, 2003.

SMYTH, M. J. et al. NEW ASPECTS OF NATURAL-KILLER- CELL SURVEILLANCE AND THERAPY OF CANCER. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 11, p. 827–37, nov. 2002.

SMYTH, M. J. et al. Activation of NK cell cytotoxicity. **Molecular immunology**, v. 42, n. 4, p. 501–10, fev. 2005.

STACEY, S. N. et al. Common variants on chromosome 5p12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer. **Nature genetics**, v. 40, n. 6, p. 703–6, jun. 2008.

- SUN, J. C.; LANIER, L. L. Natural killer cells remember: an evolutionary bridge between innate and adaptive immunity? **European journal of immunology**, v. 39, n. 8, p. 2059–64, ago. 2009.
- T, Q. et al. Correlation of serum IL-18 level and IL-18 gene promoter polymorphisms to the risk of cervical cancer. **Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao**, v. 28, n. 5, p. 9–12, 2008.
- TAHERI, M. et al. Association of – 607 C / A Polymorphism of IL-18 Gene (rs1946518) with Breast Cancer Risk in Zahedan , Southeast Iran. **Prague medical Report**, v. 11, n. 3, p. 217–222, 2012.
- TAKADA, T. et al. Association of single nucleotide polymorphisms in the IL-18 gene with sarcoidosis in a Japanese population. **Tissue antigens**, v. 60, p. 36–42, 2002.
- THIELENS, A.; VIVIER, E.; ROMAGNÉ, F. NK cell MHC class I specific receptors (KIR): from biology to clinical intervention. **Current opinion in immunology**, v. 24, n. 2, p. 239–45, abr. 2012.
- TONEVA, M. et al. Genomic diversity of natural killer cell receptor genes in three populations. **Tissue antigens**, v. 57, p. 358–362, 2001.
- TRESZL, A.; TULASSAY, T.; VASARHELYI, B. Genetic basis for necrotizing enterocolitis - risk factors and their relations to genetic polymorphisms. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, p. 570–580, 2006.
- TROMPETER, H.-I. et al. Three Structurally and Functionally Divergent Kinds of Promoters Regulate Expression of Clonally Distributed Killer Cell Ig-Like Receptors (KIR), of KIR2DL4, and of KIR3DL3. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 7, p. 4135–4143, 18 mar. 2005.
- TROWSDALE, J. Genetic and Functional Relationships between MHC and NK Receptor Genes. **Immunity**, v. 15, n. 09, p. 363–374, 2001.
- TSAI, H.-T. et al. Impact of Interleukin-18 Polymorphisms -607A/C and -137G/C on Oral Cancer Occurrence and Clinical Progression. **PloS one**, v. 8, n. 12, p. e83572, 2013.
- TSUBOI, K. et al. Serum interleukin-12 and interleukin-18 levels as a tumor marker in patients with esophageal carcinoma. **Cancer letters**, v. 205, p. 207–214, 2004.
- TURNBULL, C. et al. Genome-wide association study identifies five new breast cancer susceptibility loci. **Nature genetics**, v. 42, n. 6, p. 504–7, jun. 2010.
- UCISIK-AKKAYA, E.; DORAK, M. T. A study of natural killer cell lectin-like receptor K1 gene (KLRK1/NKG2D) region polymorphisms in a European population sample. **Tissue antigens**, v. 73, n. 2, p. 177–83, fev. 2009.
- UMAR, A.; DUNN, B. K.; GREENWALD, P. Future directions in cancer prevention. **Nature reviews. Cancer**, v. 12, n. 12, p. 835–48, dez. 2012.
- UPSHAW, J. L. et al. NKG2D-mediated signaling requires a DAP10-bound Grb2-Vav1 intermediate and phosphatidylinositol-3-kinase in human natural killer cells. **Nature immunology**, v. 7, n. 5, p. 524–32, maio 2006.

- UZAN, B. et al. Interleukin-18 produced by bone marrow-derived stromal cells supports T-cell acute leukaemia progression. **EMBO molecular medicine**, v. 6, n. 6, p. 821–34, jun. 2014.
- VENDRAMINI-COSTA, D. B.; CARVALHO, J. E. Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. **Current pharmaceutical design**, v. 18, n. 26, p. 3831–52, jan. 2012.
- VENSTROM, J. M. et al. HLA-C-dependent prevention of leukemia relapse by donor activating KIR2DS1. **The New England journal of medicine**, v. 367, n. 9, p. 805–16, 30 ago. 2012.
- VILCHES, C. et al. Facilitation of KIR genotyping by a PCR-SSP method that amplifies short DNA fragments. **Tissue antigens**, v. 70, n. 5, p. 415–22, nov. 2007.
- VILCHES, C.; PARHAM, P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. **Annual review of immunology**, v. 20, p. 217–51, jan. 2002.
- WALSH, T.; KING, M.-C. Ten genes for inherited breast cancer. **Cancer cell**, v. 11, n. 2, p. 103–5, fev. 2007.
- WANG, M. et al. The -607C/A polymorphisms in interleukin-18 gene promoter contributes to cancer risk: evidence from a meta-analysis of 22 case-control studies. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e76915, jan. 2013.
- WEI, Y.-S. et al. Interleukin-18 gene promoter polymorphisms and the risk of esophageal squamous cell carcinoma. **Acta oncologica**, v. 46, p. 1090–1096, 2007.
- WU, Y. et al. Molecular mechanisms underlying chronic inflammation-associated cancers. **Cancer letters**, v. 345, n. 2, p. 164–73, 10 abr. 2014.
- XIA, D. et al. Effective induction of therapeutic antitumor immunity by dendritic cells coexpressing interleukin-18 and tumor antigen. **Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)**, v. 81, n. 9, p. 585–96, set. 2003.
- YAMANAKA, K. et al. Expression of interleukin-18 and caspase-1 in cutaneous T-cell lymphoma. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 12, n. 2, p. 376–82, 15 jan. 2006.
- YANG, Y.-C. et al. Genetic variants in interleukin-18 gene and risk for cervical squamous cell carcinoma. **Humman Immunology**, v. 74, n. 4, 2013.
- YAQUB, S.; AANDAHL, E. M. Inflammation Versus Adaptive Immunity in Cancer Pathogenesis. **Critical Reviews in Oncogenesis**, v. 15, p. 43–63, 2009.
- YAWATA, M. et al. Predominance of group A KIR haplotypes in Japanese associated with diverse NK cell repertoires of KIR expression. **Immunogenetics**, v. 54, p. 543–550, 2002.
- YINDOM, L.-M. et al. Killer-cell immunoglobulin-like receptors and malaria caused by Plasmodium falciparum in The Gambia. **Tissue antigens**, v. 79, n. 2, p. 104–13, fev. 2012.
- YODER, J. A.; LITMAN, G. W. The phylogenetic origins of natural killer receptors and recognition: relationships, possibilities, and realities. **Immunogenetics**, v. 63, n. 3, p. 123–41, mar. 2011.

YOSHIMURA, K. et al. Successful immunogene therapy using colon cancer cells (colon 26) transfected with plasmid vector containing mature interleukin-18 cDNA and the Ig leader sequence. **Cancer Gene Therapy**, v. 8, n. 1, p. 9–16, 2001.

ZAKI, M. H. et al. IL-18 production downstream of the Nlrp3 inflammasome confers protection against colorectal tumor formation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 185, n. 8, p. 4912–20, 15 out. 2010.

ZHANG, B. et al. Genetic Variants Associated with Breast Cancer Risk: Comprehensive Field Synopsis, Meta-Analysis, and Epidemiologic Evidence. **Lancet Oncology**, v. 12, n. 5, p. 477–488, 2011.

ZHENG, J. et al. Potent antitumor efficacy of interleukin-18 delivered by conditionally replicative adenovirus vector in renal cell carcinoma-bearing nude mice via inhibition of angiogenesis. **Cancer Biology & Therapy**, n. April, p. 599–606, 2009a.

ZHENG, W. et al. Genome-wide association study identifies a new breast cancer susceptibility locus at 6q25.1. **Nature genetics**, v. 41, n. 3, p. 324–8, mar. 2009b.

ZUO, H.-N. et al. Genetic variations in the KIR gene family may contribute to susceptibility to ankylosing spondylitis: a meta-analysis. **Molecular biology reports**, v. 41, n. 8, p. 5311–9, ago. 2014.

8 ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - GRUPO CONTROLE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA

LABORATÓRIO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projetos de Pesquisa:

“Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina”

e

“Genética da autoimunidade: polimorfismos em lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide em pacientes de Santa Catarina”

Informações:

Pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina estão desenvolvendo projetos de pesquisa para avaliação de fatores genéticos, doenças e hábitos alimentares e pessoais que podem estar associados ao **aparecimento do câncer de mama e doenças autoimunes**. Para isto pedimos sua **colaboração e permissão** para fazer parte do **grupo controle** e para extrairmos de parte de seu material biológico, uma quantia pequena de **DNA** (molécula que contém os genes, que são as informações de suas características biológicas). O DNA será analisado no laboratório para tentarmos descobrir se há relação entre alguns genes, propostos nos atuais projetos (ligados ao metabolismo de hormônios sexuais, de substâncias estranhas ao organismo, relacionados ao reparo de DNA e sistema imune) e o aparecimento destas doenças. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em possíveis futuros projetos que envolvam testes genéticos, aprovados pelo sistema CEP/CONEP, desde que receba novamente sua autorização, após um novo contato. Deixamos claro que **sua participação é voluntária**. A equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à sua disposição para responder qualquer pergunta que você queira fazer, e esclarecer quaisquer dúvidas que porventura apareçam. Para isso você pode telefonar para o número **(48) 3721-9804** e conversar com a Profa. Dra. Ilíada Rainha de Souza ou seus orientandos.

Procedimentos:

Caso você concorde em participar, você irá preencher um questionário para sabermos seus dados pessoais (como nome, endereço e telefone) e irá assinar um termo de consentimento livre e esclarecido para que possamos utilizar seus dados pessoais e material biológico nestas pesquisas.

Também precisaremos tirar um pouco de sangue numa seringa.

O DNA extraído das amostras coletadas será guardado no Laboratório sob responsabilidade da coordenadora do projeto.

Entraremos em contato pelo telefone fornecido o mais breve possível para realizarmos um novo questionário de duração máxima de 20 minutos. Este questionário irá conter dados como seus hábitos alimentares e pessoais, histórico reprodutivo e histórico clínico, essenciais para o desenvolvimento das pesquisas.

Riscos:

A coleta de sangue é um procedimento normal para a realização de vários exames. O aparecimento de mancha roxa ou dor no local da espetada da agulha podem ocorrer sem representar maiores preocupações. As informações coletadas, bem como os resultados das análises genéticas serão mantidas em sigilo e serão utilizadas somente pela equipe da pesquisa.

Custos:

Você não precisará pagar nada para fazer parte deste estudo.

Benefícios

Você não terá nenhum benefício direto ao participar desta pesquisa, mas os resultados deste estudo poderão no futuro proporcionar novas alternativas para prevenção do câncer de mama e doenças autoimunes, e para identificação de pessoas que tem risco de desenvolver essas doenças, podendo beneficiar muitas outras pessoas.

Assinaturas:

Pesquisador responsável _____

Florianópolis, ___/___/_____

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, fui esclarecido(a) sobre as pesquisas “Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina” e “Genética da autoimunidade: polimorfismos em lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide em pacientes de Santa Catarina”, e concordo que meus dados sejam utilizados na realização das mesmas.

Florianópolis,

Assinatura: _____

RG: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - GRUPO DE PACIENTES

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA

LABORATÓRIO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: “Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina”.

Informações:

Pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina estão desenvolvendo um projeto de pesquisa para avaliação de fatores genéticos, doenças e hábitos alimentares e pessoais que podem estar associados ao aparecimento do câncer de mama. Pedimos a sua colaboração através da doação de uma amostra de seu material biológico e permissão para extrairmos dele uma quantidade de DNA (molécula que contém os genes, que são as informações de suas características biológicas). O DNA será analisado no laboratório para tentarmos descobrir se há relação entre alguns genes, propostos no atual projeto (ligados ao metabolismo de hormônios sexuais e de substâncias estranhas ao organismo e também relacionados ao reparo de DNA) e o aparecimento dessa doença. A amostra coletada poderá ser utilizada em projetos futuros que envolvam análises genéticas, aprovados pelo sistema CEP/CONEP, desde que receba novamente sua autorização, após um novo contato. Deixamos claro que sua participação é voluntária e que ela não influenciará no seu atendimento e tratamento. A equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à disposição para responder qualquer pergunta ou esclarecer dúvidas que porventura apareçam. Para isto, você poderá telefonar para o número (48) 3721-9804 ou (48) 3721-5154 e conversar com a Profa. Dra. Ilíada Rainha de Souza ou com a Profa. Dra. Maria Cecília Menks Ribeiro.

Procedimentos:

Caso você concorde em participar, você irá responder um questionário de duração aproximada de 5 minutos, para sabermos se você teve outras doenças, se outras pessoas na sua família tiveram câncer, etc.

Também precisaremos de um pedacinho do tumor que será retirado pelo médico na hora da cirurgia e de tirar um pouco de sangue numa seringa.

O DNA extraído das amostras coletadas será guardado no Laboratório sob responsabilidade da coordenadora do projeto.

Riscos:

A coleta de sangue e a retirada do tumor são procedimentos normais para o tratamento da sua doença. O aparecimento de mancha roxa ou dor no local da espetada da agulha podem ocorrer sem representar maiores preocupações. As informações coletadas, bem como os resultados das análises genéticas serão mantidos em sigilo e serão utilizadas somente pela equipe da pesquisa.

Custos:

Você não precisará pagar nada para fazer parte deste estudo

Benefícios

Você não terá nenhum benefício direto ao participar desta pesquisa, mas os resultados deste estudo poderão no futuro proporcionar novas alternativas para prevenção do câncer, e para identificação de pessoas que tem risco de desenvolver a doença, podendo beneficiar muitas outras pessoas.

Assinaturas:

Pesquisador principal _____

Pesquisador responsável _____

Florianópolis, __/__/____

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, fui esclarecida sobre a pesquisa “Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina”, e concordo que meus dados sejam utilizados na realização da mesma e autorizo a guarda de meu material biológico para o caso de futuras pesquisas, sendo eu contatado para fornecer nova autorização caso forem realizadas novas pesquisas não mencionadas neste projeto.

Florianópolis, _____

Assinatura: _____ RG: _____

9 ANEXO B

QUESTIONÁRIOS DO GRUPO CONTROLE

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – BEG
Laboratório de Polimorfismos Genéticos



QUESTIONÁRIO – GRUPO CONTROLE

Data: __/__/__ Coleta: () sangue

Dados Pessoais:

Nome: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ Telefone Residencial: _____ Telefone Trabalho:
_____ Celular: _____

Idade: _____ Sexo: () M () F Data de nascimento: _____

Estado Civil: _____ Tipo de sangue: _____

Profissão: _____ Aposentado: () Sim () Não

Escolaridade: () analfabeto () 1º grau incompleto

() 1º grau completo () 2º grau incompleto

() 2º grau completo () superior incompleto

() superior completo () pós graduação

Peso: _____ Altura: _____

Cidade onde nasceu: _____

Ascendência: Materna _____ Paterna _____

Etnia: () Euro descendente () Afro descendente

() Asiático descendente () Indígena descendente

Cor da pele: () negra () mulata () amarela () branca

Observação: _____

Dados Familiares:

Nome do pai: _____

Cidade onde nasceu: _____

Ascendência do pai: Materna _____ Paterna _____

Profissão: _____

Nome da mãe: _____

Cidade onde nasceu: _____

Descendência da mãe: Materna _____ Paterna _____

Profissão: _____

Possui Irmãos: (). Sim (). Não Quantos: _____

Possui filhos: (). Sim (). Não Quantos: _____

Ingere **BEBIDA ALCOÓLICA**? (). Sim (). Não

Frequência: (). Todos os dias (). Fim de semana

(). Esporadicamente (Festas).

Quantidade (copos 200ml): _____

Que tipo de bebida alcoólica ingere mais frequentemente?

(). Cerveja (). Vinho (). Cachaça (). Outro _____

Que tipo de bebida alcoólica nunca ingere?

(). Cerveja (). Vinho (). Cachaça (). Outro _____

Pratica **EXERCÍCIOS FÍSICOS**? (). Sim (). Não

Tipo: _____

Quantidade: (). menos de 30 min (). 30 min (). 1h (). mais de 1 h

Frequência: (). 1x semana (). 2-3x semana (). 4-6x semana

(). Todo os dias (). Menos de 1x semana

Você **FUMA**? (). Sim (). Não Você já **FUMOU**? (). Sim (). Não

Tipo: (). Cigarro (). Charuto (). Cachimbo (). Outro _____

Quantidade e Frequência (nº de cigarros por dia): _____

Tempo que fuma ou fumou: _____

Há quanto tempo parou: _____

Entrevistador: _____ Data da entrevista: ___/___/___

Nome:

Identificação:

Histórico Hormonal e Reprodutivo

Idade da MENARCA: _____

MENOPAUSA: (). Sim (). Não Idade: _____

HISTERECTOMIA: (). Sim (). Não

PARIDADE:

Nº de gestações ___ Idade da 1ª estação ___ nº de filhos (). nulípara N: ___

Abortos (). P (). E N: _____

Amamentou: (). Sim (). Não Tempo total (meses):

TRAT. HORMONAL:

Utiliza AC? (). Sim (). Não Já utilizou AC? (). Sim (). Não

Nome e tipo (oral, adesivo, injetável). do AC: _____

Tempo que usa ou usou AC: _____

Há quanto tempo parou? _____

Faz TRH? (). Sim (). Não Já fez TRH? (). Sim (). Não

Nome do hormônio:

Tempo que faz ou fez TRH

Há quanto tempo parou?

(). Outros hormônios _____ Tempo total:

Observações:

Histórico Médico

Caso de **CÂNCER** pessoal? (). Sim (). Não

Tipo: _____

Casos de **CÂNCER DE MAMA** na família? (). Sim (). Não

Grau de Parentesco: (). filha (). irmã (). mãe (). avó

(). tia materna 1º grau (). tia paterna 1º grau

(). prima materna 1º grau (). prima paterna 1º grau

(). Outros _____

Casos de **CÂNCER** de outro tipo na família? ().Sim (). Não

Grau de Parentesco e tipo: _____

Caso de **TUMOR BENIGNO** pessoal? ().Sim (). Não

Local: _____

Caso de **DOENÇA AUTOIMUNE** pessoal? ().Sim (). Não

Qual? _____

Tempo de diagnóstico: _____

Casos de **DOENÇA AUTOIMUNE** na família? ().Sim (). Não

Grau de Parentesco e tipo: _____

Você tem alguma **DOENÇA CARDIOVASCULAR**? ().Sim (). Não

Qual? (s). _____

HIPERTENSÃO ARTERIAL: ().Sim (). Não

HIPERCOLESTEROLEMIA: ().Sim (). Não

OSTEOPOROSE: ().Sim (). Não

DOENÇA REUMÁTICA: ().Sim (). Não

DIABETES: ().Sim (). Não

ASMA: ().Sim (). Não

HIV: ().Sim (). Não (). Nunca fez exame

HEPATITE: ().Sim (). Não (). Nunca fez exame

DENGUE: ().Sim (). Não

TUBERCULOSE: ().Sim (). Não

DISTÚRPIO RENAL: ().Sim (). Não

DISTÚRPIO PULMONAR: ().Sim (). Não

DISTÚRPIO HEPÁTICO: ().Sim (). Não

Casos de **DOENÇA DE ALZHEIMER** na família: ().Sim (). Não

Grau de parentesco: _____

Casos de **DOENÇA DE PARKINSON** na família: ().Sim (). Não

Grau de parentesco: _____

OUTRAS DOENÇAS?: _____

Alérgico a algum medicamento? _____

Alérgico a algum alimento? _____

Teve DEPRESSÃO? _____

Utilizou ou utiliza alguma medicação por longo tempo? () Sim () Não Nome do medicamento (dosagem e frequência). e tempo que utilizou: _____

Profissão: _____

Possui Irmãos: () Sim () Não Quantos: _____

Possui filhos: () Sim () Não Quantos: _____

Ingere **BEBIDA ALCOÓLICA**? () Sim () Não

Frequência: () Todos os dias () Fim de semana

() Esporadicamente (Festas)

Quantidade (copos 200ml): _____

Que tipo de bebida alcoólica ingere mais frequentemente?

() Cerveja () Vinho () Cachaça () Outro _____

Que tipo de bebida alcoólica nunca ingere?

() Cerveja () Vinho () Cachaça () Outro _____

Pratica **EXERCÍCIOS FÍSICOS**? () Sim () Não

Tipo: _____

Quantidade: () menos de 30 min () 30 min () 1h () mais de 1 h

Frequência: () 1x semana () 2-3x semana () 4-6x semana

() Todo os dias () Menos de 1x semana

Você **FUMA**? () Sim () Não Você já **FUMOU**? () Sim () Não

Tipo: () Cigarro () Charuto () Cachimbo () Outro _____

Quantidade e Frequência (nº de cigarros por dia): _____

Tempo que fuma ou fumou: _____

Há quanto tempo parou: _____

Histórico Hormonal e Reprodutivo

Idade da MENARCA: _____

MENOPAUSA: () Sim () Não Idade: _____

HISTERECTOMIA: () Sim () Não

PARIDADE:

Nº de gestações _____ Idade da 1ª estação _____

Nº de filhos () nulípara N: _____

Abortos () P () E N: _____

Amamentou: () Sim () Não Tempo total (meses): _____

TRAT. HORMONAL:

Utiliza AC? () Sim () Não Já utilizou AC? () Sim () Não

Nome e tipo (oral, adesivo, injetável) do AC: _____

Tempo que usa ou usou AC: _____

Há quanto tempo parou? _____

Faz TRH? () Sim () Não Já fez TRH? () Sim () Não

Nome do Hormônio _____ Tempo que faz ou fez TRH: _____

Há quanto tempo parou? _____

Outros hormônios _____ Tempo total: _____

Observações: _____

Histórico Médico

Casos de **CÂNCER DE MAMA** na família? () Sim () Não

Grau de Parentesco: () filha () irmã () mãe () avó

() tia materna 1º grau () tia paterna 1º grau () prima materna 1º grau ()
prima paterna 1º grau

Outros _____

Casos de **CÂNCER** de outro tipo na família ou pessoal? () Sim () Não

Grau de Parentesco e tipo: _____

Caso de **TUMOR BENIGNO DE MAMA** pessoal? () Sim () Não

Classificação: _____

HISTÓRICO do câncer de mama (versão PACIENTE):

HISTÓRICO do câncer de mama (PRONTUÁRIO):

CLASSIFICAÇÃO do tumor (biópsia após cirurgia):

() Carcinoma ductal () Invasivo

() Carcinoma lobular () "in situ"

() Microcalcificações () Doença de Paget

Outro _____

Resultado imunohistoquímica:

Você tem alguma DOENÇA CARDIOVASCULAR?: ()Sim () Não

Qual? (s) _____

HIPERTENSÃO ARTERIAL: ()Sim () Não

HIPERCOLESTEROLEMIA: ()Sim () Não

OSTEOPOROSE: ()Sim () Não

DOENÇA REUMÁTICA: ()Sim () Não

DIABETES: ()Sim () Não

ASMA: ()Sim () Não

HIV: ()Sim () Não () Nunca fez exame

HEPATITE: ()Sim () Não () Nunca fez exame

DENGUE: ()Sim () Não

TUBERCULOSE: ()Sim () Não

DISTÚRBO RENAL: ()Sim () Não

DISTÚRBO PULMONAR: ()Sim () Não

DISTÚRBO HEPÁTICO: ()Sim () Não

Casos de DOENÇA DE ALZHEIMER na família: ()Sim () Não

Grau de parentesco: _____

Casos de DOENÇA DE PARKINSON na família: ()Sim () Não

Grau de parentesco: _____

Há quanto tempo parou? _____

Outros hormônios _____ Tempo total: ____

Observações: _____

Histórico Médico

Casos de **CÂNCER DE MAMA** na família? ()Sim () Não

Grau de Parentesco: () filha () irmã () mãe () avó

() tia materna 1º grau () tia paterna 1º grau () prima materna 1º grau ()
prima paterna 1º grau

Outros _____

Casos de **CÂNCER** de outro tipo na família ou pessoal? ()Sim () Não

Grau de Parentesco e tipo: _____

Caso de **TUMOR BENIGNO DE MAMA** pessoal? ()Sim () Não

Classificação: _____

HISTÓRICO do câncer de mama (versão PACIENTE):

HISTÓRICO do câncer de mama (PRONTUÁRIO):

CLASSIFICAÇÃO do tumor (biópsia após cirurgia):

Carcinoma ductal Invasivo

Carcinoma lobular "in situ"

Microcalcificações Doença de Paget

Outro _____

Resultado imunohistoquímica:

Você tem alguma DOENÇA CARDIOVASCULAR?: Sim Não

Qual? (s) _____

HIPERTENSÃO ARTERIAL: Sim Não

HIPERCOLESTEROLEMIA: Sim Não

OSTEOPOROSE: Sim Não

DOENÇA REUMÁTICA: Sim Não

DIABETES: Sim Não

ASMA: Sim Não

HIV: Sim Não Nunca fez exame

HEPATITE: Sim Não Nunca fez exame

DENGUE: Sim Não

TUBERCULOSE: Sim Não

DISTÚRBO RENAL: Sim Não

DISTÚRBO PULMONAR: Sim Não

DISTÚRBO HEPÁTICO: Sim Não

Casos de DOENÇA DE ALZHEIMER na família: Sim Não

Grau de parentesco: _____

Casos de DOENÇA DE PARKINSON na família: Sim Não

Grau de parentesco: _____

OUTRAS DOENÇAS?: _____

Alérgico a algum medicamento? _____

Alérgico a algum alimento? _____

Teve DEPRESSÃO? _____

Utilizou ou utiliza alguma medicação por longo tempo? () Sim () Não

Nome do medicamento (dosagem e frequência) e tempo que utilizou:

BRIEF COMMUNICATION

Functional polymorphisms of interleukin-18 gene and risk of breast cancer in a Brazilian populationL. K. d. C. Back^{1,2}, T. D. J. Farias¹, P. A. da Cunha¹, Y. C. N. Muniz¹, M. C. M. Ribeiro¹, B. L. Fernandes^{3,4}, C. K. Fernandes² & I. R. de Souza¹

1 Departamento de Biologia, Embriologia e Genética (UFSC - BEG), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

2 Molecular Diagnostic, Biogenética, Florianópolis, Brazil

3 Hospital Universitário (HU-UFSC), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

4 Mastologia, Hospital e Maternidade Carmela Dutra, Florianópolis, Brazil

Key words

breast cancer; interleukin-18; polymorphisms

Correspondence

Ilíada Rainha de Souza
 Laboratório de Polimorfismos Genéticos
 Depto. BEG
 Centro de Ciências Biológicas
 Universidade Federal de Santa Catarina
 Campus Universitário
 setor F, ed. Fritz Müller
 sala 311. Trindade, Mailbox: 476
 Florianópolis
 SC 88040-900
 Brazil
 Tel: +55 (48) 37219804
 Fax: +55 (48) 37215148
 e-mail: rainha@ccb.ufsc.br

Received 19 September 2013; revised 27 February 2014; accepted 14 April 2014

doi: 10.1111/tan.12367

Abstract

Interleukin-18 (IL-18) is a key cytokine responsible for immune response and involved in the process of cancer development. In this case-control study, we tested whether *IL-18* promoter polymorphism contributes to breast cancer susceptibility in Brazilian patients. The two groups studied were 154 patients with breast cancer and 118 healthy individuals. The frequency of *IL-18* promoter single nucleotide polymorphisms (SNPs) at positions -607 (C/A) (rs1946518) and -137 (G/C) (rs187238) was determined by polymerase chain reaction analyses. The polymorphisms genotyped in this study showed a significant association with breast cancer under different genetic models. Both SNPs showed a positive association. For the *IL18-607* polymorphism the best model was the codominant genetic model [CC vs AA, $P = 0.004$, odds ratio (OR) = 2.782, 95% confidence interval (CI) 1.385–5.589]. For *IL18-137* statistical significance was found using the recessive genetic model ($P = 0.008$, OR = 3.896, 95% CI 1.427–10.639). The association between the haplotypes of the *IL18* gene and breast cancer was further confirmed. Our results suggest that *IL18-607* and *IL18-137* polymorphism contributes to increase the breast cancer risk. To our knowledge, this is the first report regarding Brazilian breast cancer patients and *IL18* promoter polymorphisms.

Breast cancer is one of the most common malignant tumors contributing to the high mortality among females worldwide (1). The etiology of breast cancer is complex and not fully understood, however, recent studies have focused on the roles of immunity and inflammation and its implication in cancer development (2–4). The progression of breast cancer is a multi-step process that involves multiple genetic alterations including the activation of oncogenes and the inactivation of tumor suppressor genes (5). The risk of breast cancer is determined by both genetic factors and lifestyle factors. Some etiological aspects have been established for breast cancer, such as ionizing radiation exposure, alcohol consumption, high-fat based diets, oral contraceptives and hormone therapy use (6, 7). Besides the environmental factors listed above, genetic variations also play an important role in increasing an individual's risk of developing breast cancer (8, 9). Nevertheless, there is substantial variation within a population that seems to be determined by inherited genetic risk factors, possibly modified by external factors (10, 11). In addition, recent research has suggested that variations in some immune regulatory genes

can drive inter-individual differences in sporadic breast cancer susceptibility (12–15).

Chronic inflammation, alongside the intrinsic properties of premalignant cells and other determinants, may be one of the driving forces of tumor initiation and promotion. Thus, numerous mediators released in deregulated chronic inflammation were found to stimulate cell growth and tissue invasion, inducing mutagenesis and increasing angiogenesis. Factors involved in angiogenesis, inflammation and thrombosis have been associated with increased risk for several types of cancers (16). Beside the central role of interleukin-18 (*IL-18*) in innate and adaptive immune response, there is evidence suggesting that the pro-inflammatory cytokines such IL-18 are associated with tumorigenesis, which indicates the link between inflammation and cancer (17–21). IL-18 is a pleiotropic cytokine playing an important role as a modulator of immune responses (22, 23). IL-18-induced natural killer (NK) cells can promote antitumor immunity by elevating the production of TH1 (type-1-polarized helper CD4⁺ T cell) and CTL (cytotoxic CD8⁺ T cell), IL-12 driving by local dendritic cells (DCs), stimulating the immune

response (24). IL-18 therapy has been shown to activate NK cells *in vivo*, promote interferon- γ (IFN- γ) production (25), and cause complete tumor regression in the MOPC-315 (ATCC® TIB-237™, Manassas, VA) plasmacytoma tumor model (26). Higher IL-18 levels were found in breast tumor tissue and lymph nodes during the progression of tumor growth in mice (27). Elevated levels of IL-18 were found in serum obtained from breast cancer patients with than without metastasis and were implicated as an important marker of breast cancer risk and progression (28).

The *IL-18* gene is located on chromosome 11q22.2-q22.3 and is composed of six exons and five introns. Several single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been identified in the *IL-18* gene. A number of SNPs in the promoter region of *IL18* gene have been associated with differential levels of gene transcription and protein production. Cloning and transcriptional analysis have showed that two functional SNPs in the promoter region of *IL18* gene seem to modulate the gene expression at transcriptional level. These two SNPs *IL18-607* (rs1946518) and *IL18-137* (rs187238) were predicted to be nuclear factor binding sites for the cAMP-responsive element binding protein and the H4TF-1 nuclear factor, respectively. In the transcription activity assay of *IL18* gene promoter fragments, all of the three possible haplotypes showed clear promoter activity, but one of the haplotype A at position *IL18-607* and C at position *IL18-137* had lower promoter activity than the other after stimulation (29, 30).

In summary, the functional properties concerning the IL-18 pathway suggest an important and strong effect of the gene on the pathogenesis of breast cancer. These findings led us to further investigate the link between two SNPs in the *IL-18* gene promoter region, possibly associated with functional alterations of the protein, and breast cancer risk (30) In this study, we hypothesized that specific *IL18* gene polymorphism were associated with breast cancer risk.

This case-control study included 272 individuals from which 154 were sporadic breast cancer patients and 118 were healthy controls, from Santa Catarina, Southern Brazil. All patients from the case group had histopathologically confirmed primary breast cancer diagnosis and were recruited from the University Hospital of the Federal University of Santa Catarina (HU-UFSC) or Carmela Dutra Maternity Hospital (MCD). Pathological and clinical information was obtained from medical records. The controls were volunteers and had no history of any kind of tumor or autoimmune diseases. Both breast cancer patients and healthy controls were genetically unrelated, at recruitment; each subject signed a written informed consent. All women were informed about the study objectives, confidentiality of information, allowing the use of their biological material and their epidemiological and clinical data. The institutional ethical review board [Conselho Nacional de ética em pesquisa (CONEP), Conselho de ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa

Catarina (CEP-HU) and Conselho de Ética em Pesquisa da Maternidade Carmela Dutra (CEP-MCD)] approved the study.

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by the phenol-chloroform method. The *IL-18* polymorphisms were determined by the polymerase chain reaction (PCR)/restriction fragment length polymorphism (RFLP) and PCR-sequence-specific primers (SSP) methods as previously described (31). The sequence of the primers for the *IL-18-607* site were the following two: 5'-CTT TGC TAT CAT TCC AGG AA-3' and 5'-TAA CCT CAT TCA GGA CTT CC-3'. They were used to amplify a 301-bp segment covering the polymorphic site. PCR was performed using denaturation at 94°C for 3 min, followed by 35 cycles at 94°C for 20 s, 57°C for 40 s, and 72°C for 40 s, and a final extension at 72°C for 3 s. The PCR products were digested with 2.0 U of *Mse* I (New England Biolabs, Beverly, MA) at 37°C for 2 h. The primers for the nucleotide position -137 were F1: 5'-CCC CAA CTT TTA CGG AAG AAA AG-3', F2: 5'-CCC CAA CTT TTA CGG AAG AAA AC-3', F: 5'-AGG AGG GCA AAA TGC ACT GG-3' and R: 5' AGG AGG GCA AAA TGC ACT GG-3'. An amplification product of 261 bp was detected. A control forward primer was used to amplify a 446-bp fragment covering the polymorphic site to serve as an internal positive amplification control. PCR was performed in a Mastercycler Thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). The products were analyzed by electrophoresis in 3% agarose gel containing ethidium bromide. Positive and negative controls were included in each gel that was generated.

Genotype frequencies of these polymorphisms were tested for Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). Comparisons of genotype, allele and haplotype frequencies in cases and controls were assessed by either a chi-squared test or Fisher exact test. Statistical software and statistical significance were set at $P \leq 0.05$. The odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) were also calculated using SPSS 13.0 (Chicago, IL) software. All statistical analyses were performed with either SNPSTATS (available at <http://bioinfo.iconcologia.net/index.php> Module = Snpstats) or SPSS 13.0. Quantitative and categorical variables were compared using analysis of Student's *t*-test and Person's chi-squared, respectively. The association analyses were performed by logistic regression and were adjusted for age and body mass index (BMI). Multiple SNPs inheritance models (log-additive, dominant, recessive and codominant) were performed to determine ORs, assuming 95% CI and P -value ≤ 0.05 was considered the significance limit. Using Akaike Information Criteria (AIC) and Bayesian Information Criteria (BIC) we selected the best SNP inheritance model. The linkage disequilibrium between the *IL-18* SNPs was measured using D' and r^2 statistics. We estimated the frequencies of different allele combinations in the two different loci and established their association with breast cancer.

The difference in mean age between cases and controls was not statistically significant (53.66) and controls

Table 1 Clinicopathological information of breast cancer patients

Clinicopathological information	n= 154 (%)
Tumor type	
Invasive ductal carcinoma (IDC)	116 (75%)
Invasive lobular carcinoma (ILC)	14 (9%)
Others	11 (7%)
Unknown	13 (8%)
Elston grade	
1	13 (8%)
2	59 (38%)
3	32 (21%)
Unknown	50 (32%)
Tumor size	
Tis	7 (5%)
T1	42 (27%)
T2	34 (22%)
T3	8 (5%)
Unknown	63 (41%)
Lymph node involvement	
Positive	48 (31%)
Negative	37 (24%)
Unknown	69 (45%)
Estrogen receptor (ER)	
Positive	94 (61%)
Negative	32 (21%)
Unknown	28 (18%)
Progesterone receptor (PR)	
Positive	86 (56%)
Negative	39 (25%)
Unknown	29 (19%)
HER2/neu	
Positive	32 (21%)
Negative	83 (54%)
Unknown	39 (25%)

(51.04) (P -value = 0.105). The clinicopathological characteristics of the tumor and patients are summarized in Table 1.

Genotype and allele frequencies for *IL-18* polymorphisms are summarized in Table 2. The different genotype frequencies in both patient and control group were in agreement with the HWE (data not shown). For the -607 genotypes, from the 154 breast cancer patients, 39 had the CC genotype (25%), the 66 CA genotype (43%) and 49 the AA genotype (32%). Of the 118 healthy control subjects, 43 had the CC genotype (36.4%), 56 the CA genotype (47.5%) and 19 the AA genotype (16.1%). A significant increase is observed for AA genotype at position *IL18-607* among patients ($P = 0.005$, OR = 2.843, 95% CI 1.360–5.986). As for the *IL18-137* genotypes, 71 of 154 patients had the GG genotype (46%), 59 the GC genotype (38%) and 24 the CC genotype (16%). Fifty-nine of 118 healthy control subjects were genotyped GG (50%), 54 were GC (46%) and 5 were CC (4%). The *IL18-137* CC genotype was associated with a significantly increased risk of breast cancer as compared with the *IL18-137* GG genotypes ($P = 0.01$, OR = 3.989, 95% CI 1.333–12.77).

As shown in Table 2, the best inheritance model for *IL18-607* was the codominant inheritance model (CC vs AA, $P = 0.004$, OR = 2.782, 95% CI 1.385–5.589). For *IL18-137* statistical significance was found using the recessive inheritance model ($P = 0.008$, OR = 3.896, 95% CI 1.427–10.639).

Our results demonstrated that the *IL18-137* G/C and *IL18-607* C/A polymorphisms were in strong linkage disequilibrium ($|D'| = 0.82$), in this population. The association between the haplotypes of the *IL18* gene and breast cancer was further confirmed, and the haplotypes with its frequencies in a general population are shown in Table 2. We also observed that the frequencies of $-137C/-607C$ haplotype were lower in cases than those in controls ($P = 0.024$, OR = 0.09, 95% CI 0.01–0.71) and $-137C/-607A$ haplotype had higher frequencies in cases ($P = 0.022$, OR = 1.64, 95% CI 1.08–2.50) than in controls. Other possible haplotypes had no statistical significant association with breast cancer.

The etiology of breast cancer is complex, and the genetic factor involved plays an important role in its development. Although high-penetrant susceptibility genes such as *BRCA1* and *BRCA2* demonstrate potent associations with the familial breast cancer, many low-penetrant susceptibility genes predisposing to breast cancer remain to be elucidated (32, 33). The genetic variation in the sequence of immune regulatory genes might affect the immune responses and surveillance (34, 35).

The proinflammatory cytokine IL-18 showed protective effects against cancer in several murine models, and recombinant human IL-18 is in preclinical trials for the treatment of cancer (24). Despite the conventional view of IL-18 as an anticancer agent, recent data suggest a tumor stimulating activity of this multifunctional cytokine under some conditions (30). The human *IL-18* gene is located on chromosome 1q22.2-q22.3 and is composed of six exons and five introns. Two common -137 G/C and -607 C/A polymorphisms of the *IL-18* promoter have been reported to influence gene activity and expression of IL-18. Thus, a higher promoter activity of haplotype $-137G/-607C$ of the *IL-18* gene might increase expression of IL-18, resulting in upregulation of IFN- γ -inducing factor, enhancing the Th1 immune response by stimulation of NK and cytotoxic T cells promoting the tumor cell death by activation of the cells (36).

Several studies have shown that polymorphisms of cytokine genes influence cytokine production, which may or may not be associated with susceptibility to certain diseases (4, 21, 34). *IL-18* promoter polymorphisms (-607 and -137) were previously shown to be statistically associated with many types of cancer in different populations: esophageal squamous cell carcinoma oral cancer (37) and prostate cancer in Chinese populations, colorectal cancer in a Greek population (38), ovarian cancer in native Hawaiians (39) and nasopharyngeal carcinoma risk in a meta-analysis (40). One comprehensive case-control study in Iranian population provided evidence that a particular genotype of *IL-18-607* was associated with a higher breast cancer risk (41). Nevertheless, another study

Table 2 Genotype, allele and haplotype frequencies of *IL-18* polymorphisms in breast cancer patients and health controls^a

	Controls	Cases	OR1	(95% CI)	P-value
<i>IL-18-607</i> (rs1946518)					
Genotypes					
C/C	43 (36%)	39 (25%)	Ref	—	—
C/A	56 (47%)	66 (43%)	1.299	(0.714–2.368)	0.439
A/A	19 (16%)	49 (32%)	2.843	(1.360–5.986)	0.005
Best inheritance model ^b					
Codominant (CC vs AA)					
A-allele	0.3983	0.5325	1.691	(0.971–2.947)	0.064
<i>IL-137</i> (rs187238)					
Genotypes					
G/G	59 (50%)	71 (46%)	Ref	—	—
G/C	54 (46%)	59 (38%)	0.908	(0.530–1.554)	0.806
C/C	5 (4%)	24 (16%)	3.989	(1.333–12.77)	0.010
Best inheritance model ^b					
Recessive (GG + GC vs CC)					
C-allele	0.2712	0.3474	1.169	(0.703–1.945)	0.606
Haplotype					
CG	0.5413	0.4598	1.00	—	—
AC	0.2108	0.2108	1.64	(1.08–2.50)	0.022
AG	0.1875	0.1875	1.23	(0.78–1.94)	0.380
CC	0.0604	0.0604	0.09	(0.01–0.71)	0.024

BMI, body mass index; CI, confidence interval.

^aSignificant results are in bold.

^bBest model according to the Akaike Information Criteria (AIC) and Bayesian Information Criteria (BIC).

^cAdjusted analysis for age and BMI.

with a population from the same region did not find any association with higher breast cancer risk (42). Furthermore, to our knowledge there are no studies in other populations with different genetic background, to support this association. In our study, 154 Brazilian breast cancer patients were analyzed for *IL-18* gene promoter polymorphisms. We found a significant association between *IL-18-607* A/A and *IL-18-137* C/C and the predisposition to breast malignancy development.

IL-18 and IFN- γ expression analysis by reverse transcriptional polymerase chain reaction (RT-PCR) showed that subjects homozygous for haplotype (–137G/–607C) had higher levels of IL-18 mRNA compared with other haplotypes. Thus, a higher promoter activity of haplotype –137G/–607C of the *IL-18* gene might increase expression of IL-18, resulting in upregulation of the IFN- γ producing T-cells and increasing the cytotoxic potential of these cells (28, 36). We found that the haplotype (–137C/–607A) was significantly higher in breast cancer patients than in controls ($P=0.022$, OR=1.64, 95% CI 1.08–2.50). Our results suggest that the haplotype (–137C/–607A) of *IL-18* gene may play a facilitative role in the development of breast cancer.

In summary, this study demonstrated that both *IL-18* promoter polymorphisms *IL18-607* C/A and *IL18-137* G/C are associated with increased risk to breast cancer development in this population. To our knowledge, this is the first report regarding Brazilian breast cancer patients and *IL18* promoter polymorphisms. More data from a larger number of patients are needed to determine the possible association between *IL-18* promoter polymorphism and breast cancer.

Acknowledgments

The authors are grateful to the volunteers, the hospitals and the research teams. We also wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) and Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Conflict of interest

The authors have declared no conflicting interests.

References

- DeSantis C, Siegel R, Siegel R. *Breast Cancer Facts & Figures. Atlanta: American Cancer Society, 2012, 3320–33.*
- Trinchieri G. Cancer and inflammation: an old intuition with rapidly evolving new concepts. *Annu Rev Immunol* 2012; **30**: 677–706.
- Korkaya H, Liu S, Wicha MS. Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment. *J Clin Invest* 2011; **121**: 3804–9.
- Liu Y, Lin N, Huang L, Xu Q, Pang G. Genetic polymorphisms of the interleukin-18 gene and risk of prostate cancer. *DNA Cell Biol* 2007; **26**: 613–8.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; **144**: 646–74.
- Quante AS, Whittmore AS, Shriver T, Strauch K, Terry MB. Breast cancer risk assessment across the risk continuum: genetic and nongenetic risk factors contributing to differential model performance. *Breast Cancer Res* 2012; **14**: R144.

7. Umar A, Dunn BK, Greenwald P. Future directions in cancer prevention. *Nat Rev Cancer* 2012; **12**: 835–48.
8. Pharoah PDP, Dunning AM, Ponder BAJ, Easton DF. Association Studies for finding cancer-susceptibility genetic variants. *Nat Rev Cancer* 2004; **4**: 850–60.
9. Dong LM, Potter JD, White E, Ulrich CM, Cordon LR. Genetic susceptibility to cancer the role of polymorphisms in candidate genes. *JAMA* 2008; **299**: 2423–36.
10. Park CC, Morel JC, Amin MA, Connors MA, Harlow LA., Koch AE. Evidence of IL-18 as a novel angiogenic mediator. *J Immunol* 2001; **167**: 1644–53.
11. Hollestelle A, Wasielewski M, Martens JW, Schutte M. Discovering moderate-risk breast cancer susceptibility genes. *Curr Opin Genet Dev* 2010; **20**: 268–76.
12. Xu F, Li D, Zhang Q *et al.* ICOS gene polymorphisms are associated with sporadic breast cancer: a case–control study. *BMC Cancer* 2011; **11**: 392.
13. Wang L, Jiang Y, Zhang Y *et al.* Association analysis of IL-17A and IL-17F polymorphisms in Chinese Han women with breast cancer. *PLoS One* 2012; **7**.
14. Yang C-X, Li C-Y, Feng W. *Toll-Like Receptor 4 Genetic Variants and Prognosis of Breast Cancer. Tissue antigens*, 2013.
15. You Y, Deng J, Zheng J *et al.* IL-21 gene polymorphism is associated with the prognosis of breast cancer in Chinese populations. *Breast Cancer Res Treat* 2013; **137**: 893–901.
16. Hamed EA, Zakhary MM, Maximous DW. Apoptosis, angiogenesis, inflammation, and oxidative stress: basic interactions in patients with early and metastatic breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012; **138**: 999–1009.
17. Berger A, Henglein B, Piqueras B *et al.* Modulation of interleukin-18 expression in human colon carcinoma: consequences for tumor immune surveillance. *Int J Cancer* 1999; **84**: 326–30.
18. Sáenz-López P, Carretero R, Vazquez F *et al.* Impact of interleukin-18 polymorphisms-607 and -137 on clinical characteristics of renal cell carcinoma patients. *Hum Immunol* 2010; **71**: 309–13.
19. Teixeira AC, Mendes-Junior CT, Marano LA *et al.* Alleles and genotypes of polymorphisms of IL-18, TNF- α and IFN- γ are associated with a higher risk and severity of hepatocellular carcinoma (HCC) in Brazil. *Hum Immunol* 2013; **74**: 1024–9.
20. Tsuboi K, Miyazaki T, Nakajima M, Fukai Y. Serum interleukin-12 and interleukin-18 levels as a tumor marker in patients with esophageal carcinoma. *Cancer Lett* 2004; **205**: 207–14.
21. Yang Y-C, Chang T-Y, Chen T-C, Chang S-C, Lin W-S, Lee Y-J. Genetic variants in interleukin-18 gene and risk for cervical squamous cell carcinoma. *Hum Immunol* 2013; **74**.
22. Gracie JA, Robertson SE, McInnes IB. Interleukin-18. *J Leukoc Biol* 2003; **73**: 213–24.
23. Liew FY. The role of innate cytokines in inflammatory response. *Immunol Lett* 2003; **85**: 131–4.
24. Srivastava S, Peloso D, Feng H *et al.* Effects of interleukin-18 on natural killer cells: costimulation of activation through Fc receptors for immunoglobulin. *Cancer Immunol Immunother* 2013; **62**: 1073–82.
25. Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A. Cloning of a new cytokine that induces IFN gamma production by T cells. *Nature* 1995; **378**: 88–91.
26. Ni J, Miller M, Stojanovic A, Garbi N, Cerwenka A. Sustained effector function of IL-12/15/18-preactivated NK cells against established tumors. *J Exp Med* 2012; **209**: 2351–65.
27. Jung MIY, Kim SH, Cho D, Kim TAES. Analysis of the expression profiles of cytokines and cytokine-related genes during the progression of breast cancer growth in mice. *Oncol Rep* 2009; **22**: 1141–7.
28. Eissa SA, Zaki SA, El-Maghraby SM, Kadry DY. Importance of serum IL-18 and RANTES as markers for breast carcinoma progression. *J Egypt Natl Canc Inst* 2005; **17**: 51–5.
29. Giedraitis V, He B, Huang W-X, Hillert J. Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation. *J Neuroimmunol* 2001; **112**: 146–52.
30. Bai J, Zhang Y, Lin M *et al.* Interleukin-18 gene polymorphisms and haplotypes in patients with oral lichen planus: a study in an ethnic Chinese cohort. *Tissue Antigens* 2007; **70**: 390–7. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2007.00922.x.
31. Vidal-Vanaclocha F, Mendoza L, Telleria N, Salado C. Clinical and experimental approaches to the pathophysiology of interleukin-18 in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 2006; **25**: 417–34.
32. Takada T, Suzuki E, Morohashi K, Gejyo F. Association of single nucleotide polymorphisms in the IL-18 gene with sarcoidosis in a Japanese population. *Tissue Antigens* 2002; **60**: 36–42.
33. Barzan D, Veldwijk MR, Herskind C, Li Y. Comparison of genetic variation of breast cancer susceptibility genes in Chinese and German populations. *Eur J Hum Genet* 2013; **21**: 1–7.
34. Andersen SW, Trentham-Dietz A, Gangnon RE. Breast cancer susceptibility loci in association with age at menarche, age at natural menopause and reproductive lifespan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013; **22**: 471–8.
35. Wei Y-S, Lan Y, Liu Y-G, Tang H, Tang R-G, Wang J-C. Interleukin-18 gene promoter polymorphisms and the risk of esophageal squamous cell carcinoma. *Acta Oncol* 2007; **46**: 1090–6.
36. Bai J, Zhang Y, Lin M *et al.* Interleukin-18 gene polymorphisms and haplotypes in patients with oral lichen planus: a study in an ethnic Chinese cohort. *Tissue Antigens* 2007; **70**: 390–7.
37. Nikiteas N, Yannopoulos A, Chatzitheofylaktou A, Tsigris C. Heterozygosity for interleukin-18 – 607 A/C polymorphism is associated with risk for colorectal cancer. *Anticancer Res* 2007; **3854**: 3849–53.
38. Bushley AW, Ferrell R, McDuffie K *et al.* Polymorphisms of interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, and IL-18 and the risk of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2004; **95**: 672–9.
39. Guo X-G, Xia Y. The interleukin-18 promoter -607C>A polymorphism contributes to nasopharyngeal carcinoma risk: evidence from a meta-analysis including 1,886 subjects. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24460336>. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; **14**, 7577–81.
40. Liang T-J, Ma H, Wang C-X, Liu Y-R, Wang X-G. The -137G>C polymorphism in interleukin-18 promoter region and cancer risk: evidence from a meta-analysis of 21 studies. *Tumour Biol* 2013; **34**: 3483–90. DOI: 10.1007/s13277-013-0926-5.
41. Khalili-Azad T, Razmkhah M, Ghiam AF, Doroudchi M, Talei AR, Mojtahedi Z. Association of Interleukin-18 gene promoter polymorphisms with breast cancer. *Neoplasma* 2009; **56**: 22–5.
42. Taheri M, Hashemi M, Fazaeli A, Arbabi F, Bahari G. Association of – 607 C/A polymorphism of IL-18 gene (rs1946518) with breast cancer risk in Zahedan, Southeast Iran. *Prague Med Rep* 2012; **11**: 217.

