

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DOS GENES KIR E HLA CLASSE I EM PACIENTES COM  
CÂNCER COLORRETAL**

**PÂMELA PORTELA DA SILVA**

**PORTO ALEGRE**

**2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DOS GENES KIR E HLA CLASSE I EM PACIENTES COM  
CÂNCER COLORRETAL**

**PÂMELA PORTELA DA SILVA**

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Tese apresentada como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

**PORTO ALEGRE**

**2016**

**BANCA EXAMINADORA**

**MARIA LUCIA SCROFERNEKER**

Professor do PPG em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS

**MELISSA MEDEIROS MARKOSKI**

Fundação Universitária de Cardiologia, FUC

**CAROLINE BRUNETTO DE FARIAS**

Coordenadora de Pesquisa Celular e Molecular, ICI-RS

A minha família, pelo apoio e incentivo.  
Ao meu namorado por todo carinho e compreensão.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo.

Ao Professor Luiz Fernando Jobim, obrigada pela orientação, confiança e oportunidade. Sou muito grata por todos os ensinamentos nesses 10 anos no Serviço de Imunologia.

Ao Professor Rafael Roesler pela acolhida como orientador e por ter possibilitado a concretização desta pesquisa.

À Dra Mariana Jobim pelo estímulo e ajuda neste trabalho.

Ao Professor Daniel Damin, pela oportunidade de trabalhar com seus pacientes e por todo auxílio na seleção dos pacientes.

Ao Dr. Cláudio Tarta e ao Dr. Paulo Contu pela colaboração na coleta das amostras.

Aos meus pais Airton e Eloni e o meu irmão Raison, que sempre me incentivaram e me deram forças para que eu fosse até onde meus sonhos me levassem.

Ao meu namorado Renatho, por todo amor, carinho, apoio e pela compreensão em todos os momentos em que estive ausente.

À minha querida amiga Joice Merzoni, pela indispensável colaboração no desenvolvimento do trabalho laboratorial desta pesquisa.

À Rosani Beuren pela ajuda nas extrações de DNA.

À Juliana Lindenau pela ajuda com as análises estatísticas.

A toda equipe do Serviço de Imunologia do HCPA, pela compreensão e auxílio.

A todos os meus colegas de trabalho do Laboratório de Imunologia de Transplantes da Santa Casa de Porto Alegre, principalmente as colegas da citometria de fluxo.

A todos os pacientes que participaram deste estudo, a minha sincera gratidão.

**“Yes, We Can!”**

**— Barack Obama**

## RESUMO

O câncer colorretal (CCR) pode ocorrer em qualquer parte do cólon ou do reto e representa o terceiro câncer mais comum no mundo em ambos os sexos. As células *Natural Killer* (NK) fazem parte do sistema imune inato reconhecendo moléculas de HLA de classe I em células alvo, através de seus receptores de membrana *killer cell immunoglobulin-like receptors* (KIR). O objetivo deste estudo foi avaliar a associação entre os genes KIR e os ligantes HLA em pacientes com câncer colorretal e controles saudáveis. Examinamos o polimorfismo de 16 genes KIR e seus ligantes HLA em 154 pacientes caucásóides com CCR e 216 controles saudáveis pela técnica de PCR-SSO e PCR-SSP. Quando comparamos os dois grupos, não foram encontradas diferenças significativas para os ligantes HLA e os genes KIR após correção de Bonferroni. Entretanto, o grupo de genótipos Bx (heterozigoto e homozigoto para o haplótipo B) foi mais frequente nos controles, quando comparados com os pacientes. Estes achados sugerem que altos níveis de ativação de sinais KIR aparecem como proteção para o câncer colorretal.

**PALAVRAS-CHAVE:** antígeno leucocitário humano, células natural killer, genes KIR, receptores KIR, câncer colorretal.

## **ABSTRACT**

*Colorectal cancer (CRC) can occur anywhere in the colon or rectum and represents the third most common cancer in the world in both sexes. Natural killer cells (NK) are part of the innate immune system recognizing class I HLA molecules on target cells through their membrane receptors, called killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR). The aim of our study was to evaluate the association between the KIR genes and HLA ligands in patients with colorectal cancer and healthy controls. We examined the polymorphism of 16 KIR genes and their HLA ligands in 154 caucasoid CRC patients and 216 healthy controls by PCR-SSO and PCR-SSP. When both groups were compared, no significant differences were found for HLA ligands and KIR genes after Bonferroni correction. However, the Bx group genotypes (heterozygous and homozygous for the haplotype B) were more frequent in controls, when compared with patients. These findings suggest that individuals with Bx genotypes could have some protection to colorectal cancer. These findings suggest that higher levels of activating KIR signals appear as protective to colorectal cancer.*

*Keywords: Human leukocyte antigen; natural killer cell; Killer cell immunoglobulin-like receptor; colorectal cancer.*



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estratégia de busca de referências bibliográficas.....	16
<b>Figura 2:</b> Anatomia colorretal.....	18
<b>Figura 3:</b> Pólipo adenomatoso no cólon sigmóide.....	22
<b>Figura 4:</b> Sequência adenoma-carcinoma.....	23
<b>Figura 5:</b> Subgrupos de células NK baseadas na expressão de CD56 e CD16.....	30
<b>Figura 6:</b> Inibição, ativação ou balanço de sinais entre as células NK e célula-alvo.....	32
<b>Figura 7:</b> Características na estrutura dos genes KIR.....	34
<b>Figura 8:</b> Haplótipos A e B dos genes KIR.....	35

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Classificação TNM.....	25
<b>Tabela 2:</b> Receptores KIR e seus ligantes específicos.....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>CCR</b>	Câncer colorretal
<b>SL</b>	<i>Lynch Syndrome</i>
<b>FAP</b>	<i>Familial Adenomatous Polyposis</i>
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
<b>RCU</b>	Retocolite ulcerativa
<b>DC</b>	Doença de Crohn
<b>APC</b>	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
<b>DCC</b>	<i>Deleted in colorectal câncer</i>
<b>KRAS</b>	<i>Kirsten rat Sarcoma viral oncogene homolog</i>
<b>CIN</b>	<i>Chromosomal instability</i>
<b>MSI</b>	<i>Microsatellite instability</i>
<b>CIMP</b>	<i>CpG island methylator phenotype</i>
<b>DCC</b>	<i>Deleted in colorectal carcinoma</i>
<b>TP53</b>	<i>Tumor Protein P53</i>
<b>LOH</b>	<i>Loss of heterozygosity</i>
<b>MMR</b>	<i>Mismatch repair</i>
<b>TNM</b>	<i>Tumor-node-metastasis</i>
<b>AJCC</b>	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
<b>NK</b>	<i>Natural killer</i>
<b>TNK</b>	<i>Natural Killer T Cells</i>
<b>HLA</b>	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
<b>TNF</b>	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
<b>TRAIL</b>	<i>Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>
<b>INF</b>	<i>Interferons</i>
<b>GM-CSF</b>	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
<b>IL</b>	<i>Interleukin – Interleucina</i>
<b>ADCC</b>	<i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
<b>Fc</b>	Fragmento cristalizável das imunoglobulinas
<b>LCR</b>	<i>Leukocyte Receptor Complex</i>
<b>KIR</b>	<i>Killer-cell immunoglobulin-like receptor</i>
<b>ITIMs</b>	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs</i>
<b>ITAMs</b>	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activating motif</i>
<b>PCR</b>	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
<b>SSO</b>	<i>Sequence Specific Oligonucleotide</i>
<b>SSP</b>	<i>Sequence Specific Primers</i>
<b>HCPA</b>	Hospital de Clínicas de Porto Alegre

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO NA LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
2.1. ESTRATÉGIA DE BUSCA E SELEÇÃO DA INFORMAÇÃO .....	16
2.2. CÂNCER COLORRETAL .....	17
2.2.1. ANATOMIA COLORRETAL .....	17
2.2.2. EPIDEMIOLOGIA .....	18
2.2.3. FATORES DE RISCO E PROTEÇÃO.....	19
2.2.4. PÓLIPOS E CÂNCER COLORRETAL.....	21
2.2.5. CARCINOGENESE COLORRETAL.....	22
2.2.6. SINTOMAS, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO .....	25
2.3. CÂNCER COLORRETAL E O SISTEMA IMUNOLÓGICO .....	28
2.4. CÉLULAS <i>NATURAL KILLER</i> (NK).....	30
2.5. GENES E RECEPTORES KIR .....	35
2.5.1. DIVERSIDADE HAPLOTÍPICA .....	38
2.5.2. LIGANTES DOS GENES KIR .....	39
<b>3. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>41</b>
<b>4. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>42</b>
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>43</b>
5.1 OBJETIVO GERAL .....	43
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>44</b>
<b>7. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS.....</b>	<b>57</b>
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>78</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>80</b>
9.1. CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO.....	80
9.2. PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS.....	81
9.3. TERMO DE CONSENTIMENTO DOS PACIENTES .....	82
9.4. TERMO DE CONSENTIMENTO DO GRUPO CONTROLE (DOADORES DE PLAQUETAS).....	84

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tumor maligno mais comum no mundo, constituindo a terceira principal causa de morte por câncer em ambos os sexos<sup>1</sup>. Fatores genéticos e ambientais associam-se ao desenvolvimento do CCR esporádico. Geralmente ocorre após os 50 anos, sem relação com alterações hereditárias específicas, surgindo de mutações somáticas e evolução do clone celular. Contudo, o CCR hereditário está relacionado com história familiar e síndromes hereditárias, como a polipose adenomatosa familiar e a síndrome de Lynch, que aumentam as chances de desenvolvimento da doença. Apesar de vários fatores de risco já terem sido apontados, o mecanismo da carcinogênese colorretal ainda continua em investigação<sup>2; 3; 4</sup>.

As células *Natural Killer* (NK) são linfócitos provenientes da medula óssea, que não possuem as mesmas características dos linfócitos T e B. Elas fazem parte do sistema imune inato e são responsáveis pela vigilância imunológica contra células infectadas por vírus e bactérias, atacando também células transformadas ou tumorais. Além disso, as células NK podem secretar citocinas, as quais modulam o sistema imune adaptativo na defesa contra esses agentes agressores, também protegendo o organismo<sup>5; 6</sup>.

As células NK reconhecem moléculas de HLA (*human leukocyte antigen*) de classe I, presente na maioria das células normais, através de seus receptores KIR (*Killer-cell immunoglobulin-like receptor*). Quando a expressão do HLA de classe I estiver diminuída numa célula tumoral, a célula NK poderá ser ativada levando a célula transformada à morte. A regulação da célula NK é realizada por um balanço entre sinais gerados pelos receptores KIR de ativação e de inibição. Havendo uma interação apropriada entre o KIR e o HLA de classe I, dar-se-á uma inibição da célula NK, não ocorrendo o ataque à célula alvo. Caso contrário, a célula-alvo será destruída<sup>6; 7</sup>.

Os genes KIR, que codificam os receptores das células NK, estão localizados no cromossomo 19q13.4, junto com todos os outros genes do complexo de receptores

leucocitários<sup>8</sup>. A família KIR é altamente polimórfica e o seu funcionamento regula a função da célula NK. Estes genes têm sido associados com várias doenças, entre elas a psoríase vulgar<sup>9; 10</sup>, artrite psoriática<sup>11; 12</sup>, lúpus eritematoso sistêmico<sup>13</sup>, hepatite C<sup>14</sup>, tumores sólidos<sup>15</sup> e neoplasias hematológicas<sup>16</sup>.

Nosso grupo de pesquisa já realizou diversos estudos com genes KIR e ligantes HLA. Tivemos a oportunidade de estudar a diversidade dos genes KIR em uma população de indivíduos saudáveis de origem caucasóide da região Sul do Brasil<sup>17</sup>, bem como a sua distribuição e prevalência em pacientes com diabetes do tipo I<sup>18</sup>, esclerose sistêmica<sup>19</sup>, doença inflamatória intestinal<sup>20</sup> e Doença de Gaucher<sup>21; 22</sup>.

Recentemente, avaliamos a frequência dos genes KIR e alelos HLA em 230 pacientes com diagnóstico de câncer de mama e 278 controles saudáveis. Os resultados mostraram que a presença do inibidor KIR2DL2 e o ligante HLA-C1 foi maior em pacientes com câncer de mama, sugerindo risco para a doença<sup>23</sup>. Ainda realizamos outro estudo com câncer de próstata: 200 casos e 185 controles. Contudo, os resultados não confirmaram diferenças significativas na prevalência de genes KIR e alelos HLA entre pacientes e controles<sup>24</sup>.

Alguns estudos descreveram a relação entre o câncer colorretal e o polimorfismo dos genes KIR e seus ligantes HLA. Contudo, observamos resultados contraditórios. Middleton e colaboradores (2007) estudaram um grupo de pacientes com câncer de laringe, bexiga e colorretal, demonstrando resultados significativos no câncer de bexiga (maior frequência do KIR3DL1 e KIR2DS4), mas não encontrando diferenças em pacientes com tumor de laringe e colorretal<sup>15</sup>. Outro estudo por Al Omar e colaboradores (2010) também não encontrou nenhuma diferença significativa nos genes KIR entre os grupos de tumores sólidos estudados (câncer de cólon, câncer renal e câncer de pulmão - não pequenas células e de pequenas células) em comparação com controles saudáveis<sup>25</sup>.

Já em estudo recente na população coreana e saudita, foram encontrados resultados significativos com câncer colorretal e genes KIR. Kim e colaboradores (2014) encontraram maior frequência dos genes KIR2DS5 nos casos, sugerindo risco para a doença, e KIR3DL1, KIR2DS2 e

KIR2DS4 nos controles, sugerindo proteção para doença<sup>26</sup>. Paradoxalmente, Al Omar e colaboradores (2015), em recente publicação, constataram que o KIR3DS1, KIR2DS1 e KIR2DS5 foram mais frequente nos casos de CCR, quando comparado com controles, sugerindo risco para doença<sup>27</sup>.

Tendo em vista a importância epidemiológica do câncer colorretal no mundo e no Brasil e o fato da literatura apresentar estudos contraditórios, consideramos oportuno o estudo da associação dos genes KIR e HLA de classe I no câncer colorretal. O projeto, que foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, contou com apoio financeiro do Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos (FIPE-HCPA).

## 2. REVISÃO NA LITERATURA

### 2.1. ESTRATÉGIA DE BUSCA E SELEÇÃO DA INFORMAÇÃO

A revisão da literatura deste estudo está focada nas seguintes palavras chave: 1) *colorectal cancer*; 2) *KIR genes*; 3) *natural killer cell*; 4) *Human leukocyte antigen*; 5) *immune system*. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: LILACS, SciELO e PubMed/Medline. As referências bibliográficas dos artigos encontrados foram revisadas para localizar outros estudos não contemplados na busca. A revisão sistemática está representada na figura 1.

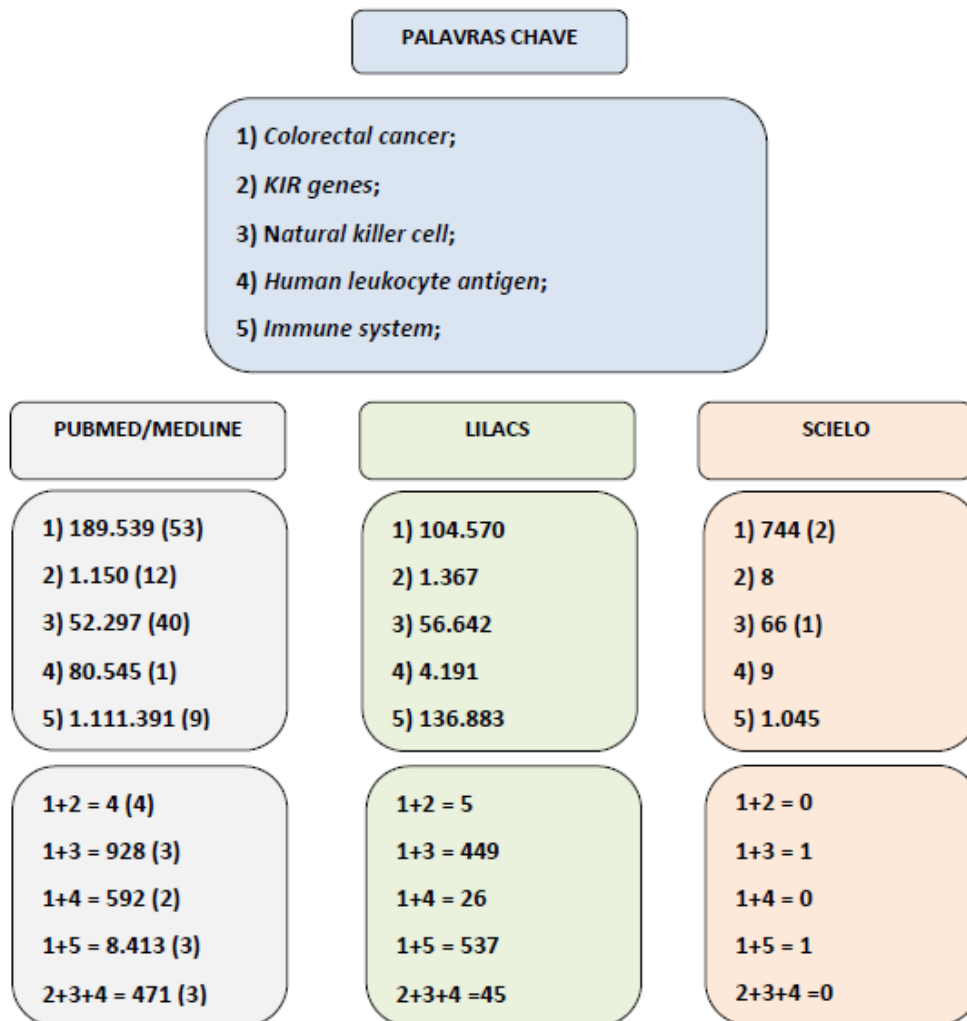


Figura 1: Estratégia de busca de referências bibliográficas. O número de referências selecionadas está entre parênteses.



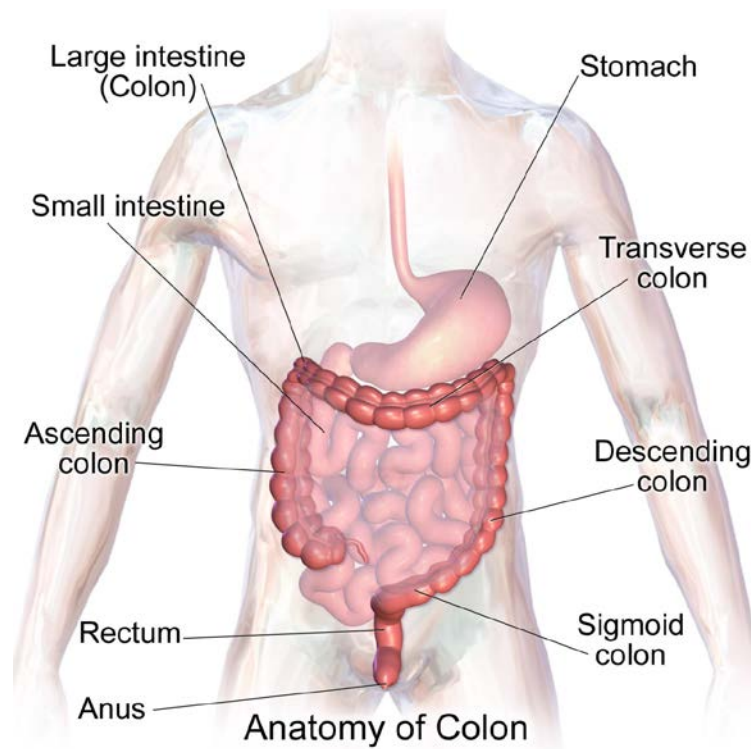
## 2.2. CÂNCER COLORRETAL

### 2.2.1. ANATOMIA COLORRETAL

O cólon é a parte mais extensa do intestino grosso, constituindo um tubo muscular de 1,5 metros de comprimento. É responsável pelos estágios finais do processo digestivo, como reabsorver água e eletrólitos do processo de digestão, armazenar e eliminar os resíduos sólidos do corpo. O cólon é dividido em quatro segmentos: cólon ascendente, cólon transverso, cólon descendente e sigmóide (figura 2)<sup>1; 28</sup>.

O cólon ascendente começa no ceco (porção inicial do intestino grosso) e se estende para cima, no lado direito do abdômen. Em seguida, o intestino grosso atravessa o abdome até a parede abdominal esquerda e é denominado de cólon transverso, pois atravessa o corpo da direita para a esquerda. O cólon transverso, por sua vez, segue até a parte inferior esquerda, passando a ser chamado de cólon descendente, porque desce no lado esquerdo. Após o cólon descendente, o intestino grosso assume a forma de “S”, recebendo o nome de sigmóide. O cólon sigmóide se junta o reto, que liga ao ânus, sendo o segmento final do intestino grosso<sup>1; 29</sup>.

As junções entre o cólon ascendente e transverso é chamada de flexura hepática e entre o descendente e transverso de flexura esplênica. Os segmentos transversais e ascendentes são coletivamente chamados de cólon proximal, enquanto o descendente e sigmóide são referidos como o cólon distal. O câncer colorretal tem características diferentes com base em sua localização no cólon ou reto<sup>30; 31</sup>.



**Figura 2: Anatomia colorretal<sup>1</sup> (adaptado). O cólon é dividido em quatro segmentos: cólon ascendente, cólon transverso, cólon descendente e sigmóide. O câncer colorretal é uma neoplasia maligna que acomete o cólon ou o reto.**

### 2.2.2. EPIDEMIOLOGIA

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tumor maligno mais comum no mundo entre homens e mulheres<sup>1</sup>. A maioria dos casos se desenvolve lentamente a partir de lesões precursoras que podem se transformar em neoplasia maligna<sup>32</sup>. Estimam-se, para 2016, no Brasil, 16.660 casos novos de câncer de cólon e reto em homens e 17.620 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 16,84 casos novos a cada 100 mil homens e 17,10 para cada 100 mil mulheres. Na Região Sul, o câncer de cólon e reto é o segundo mais frequente em mulheres (23,27/100 mil) e o terceiro mais frequente em homens (22,35/100 mil)<sup>33</sup>.

Alguns países com maiores taxas de incidência incluem Austrália, Nova Zelândia, Europa e América do Norte, o que pode ser atribuído a fatores de risco comportamentais, como dieta e estilo de vida<sup>34; 35</sup>. Contudo, em países como os Estados Unidos, observa-se um padrão estável ou de diminuição da incidência nos últimos anos, devido à detecção precoce e remoção de lesões pré-cancerosas<sup>33</sup>.

A sobrevida do câncer de colón e reto é altamente dependente do estágio da doença<sup>33</sup>. Apenas 40% dos pacientes são diagnosticados com a doença em estágio localizado. A taxa de sobrevida de cinco anos para a fase inicial é maior do que 90%, enquanto que para aqueles em estágio avançado é de 13%<sup>1</sup>.

Indivíduos com história familiar, doença inflamatória intestinal e síndromes hereditárias, como a polipose adenomatosa familiar (PAF) e a síndrome de Lynch (SL), tem maiores chances de desenvolver a doença. No entanto, a maior parte dos casos ocorre sem qualquer um desses fatores envolvidos, sendo a idade acima de 50 anos o fator de risco mais importante para a doença<sup>32</sup>.

### 2.2.3. FATORES DE RISCO E PROTEÇÃO

O câncer colorretal pode ser classificado em esporádico e familiar (hereditário). Setenta e cinco por cento dos casos são de origem esporádica e 25% de origem familiar, incluindo as síndromes hereditárias (FAP e SL)<sup>2</sup>. Fatores genéticos e ambientais estão associados ao desenvolvimento do CCR esporádico. Geralmente esses tumores ocorrem após os 50 anos, sem relação com alterações hereditárias específicas, surgindo de mutações somáticas e evolução do clone celular. O CCR é considerado familiar quando há dois ou mais membros da família com um histórico da doença ou de pólipos adenomatosos. Já aqueles relacionados com síndromes hereditárias herdam uma mutação genética específica. Mutações raras e altamente penetrantes em genes relacionados ao câncer juntamente com uma pequena a moderada influência de fatores de risco ambientais estão associadas às formas hereditárias de CCR<sup>3; 4; 36</sup>.

Estudos epidemiológicos têm destacado o papel da dieta e estilo de vida para o risco de desenvolver CCR. Geralmente, um maior consumo de frutas e vegetais, que são alimentos ricos em fibras, está associado com risco diminuído da doença. As fibras podem absorver ou diluir substâncias cancerígenas fecais, modular o tempo de trânsito no cólon, reduzir o pH do cólon ou aumentar a produção de ácidos graxos de cadeia curta<sup>37</sup>.

Por outro lado, a ingestão de carnes processadas e carne vermelha estão relacionadas com risco para o CCR. O elevado consumo de carne vermelha, principalmente preparadas em altas temperaturas, tem forte relação com a doença pela formação de aminas heterocíclicas e hidrocarbonos aromáticos policíclicos, ambos carcinogênicos<sup>38</sup>. Um estudo de meta-análise mostrou que o consumo diário de 100 gramas de carne processada eleva o risco em 25% para o câncer de cólon e 31% para o câncer de reto<sup>39</sup>. O ferro (heme) presente na carne vermelha pode induzir ao estresse oxidativo e aumentar a concentração fecal de compostos nitrosos. Estes compostos são agentes alcalinos capazes de reagir com o DNA dos tecidos alvos para alterar suas bases e pode, portanto, iniciar a carcinogênese<sup>40</sup>.

Estudos sobre estilo de vida mostram que atividade física regular está associada com redução do risco de CCR, enquanto obesidade e excesso de peso corporal aumentam as chances de adenomas colorretais, que são precursores da doença<sup>41</sup>. Em uma meta-análise de 52 estudos, indivíduos fisicamente ativos tiveram risco de 20% a 30% menor de câncer de cólon em comparação com indivíduos menos ativos<sup>42</sup>. Os mecanismos pelos quais a atividade física diminui o risco para o CCR ainda não são bem compreendidos, mas pode envolver reduções nos níveis de insulina e da inflamação sistêmica e aumento da motilidade do cólon<sup>37</sup>.

Além disso, o consumo de álcool e tabagismo foi associado com maior risco de desenvolver CCR. O álcool pode suprimir a vigilância imunológica de tumor, atrasar o reparo de DNA, alterar a composição dos ácidos biliares ou induzir as enzimas do citocromo P450 para ativar substâncias hepáticas cancerígenas. Já o tabaco libera uma gama de compostos cancerígenos, incluindo hidrocarbonetos aromáticos polinucleares, aminas heterocíclicas,

nitrosaminas e aminas aromáticas, que podem atingir a mucosa colorretal através do sistema circulatório<sup>37; 43</sup>.

Indivíduos portadores de doença inflamatória intestinal crônica, como retocolite ulcerativa (RCU) e doença de Crohn (DC), têm um risco aumentado de desenvolver câncer colorretal, risco este que aumenta com a extensão e duração da doença. O risco é de 5 a 11 vezes maior que a população em geral para a RCU e 20 vezes mais elevada para DC<sup>37; 44</sup>.

#### 2.2.4. PÓLIPOS E CÂNCER COLORRETAL

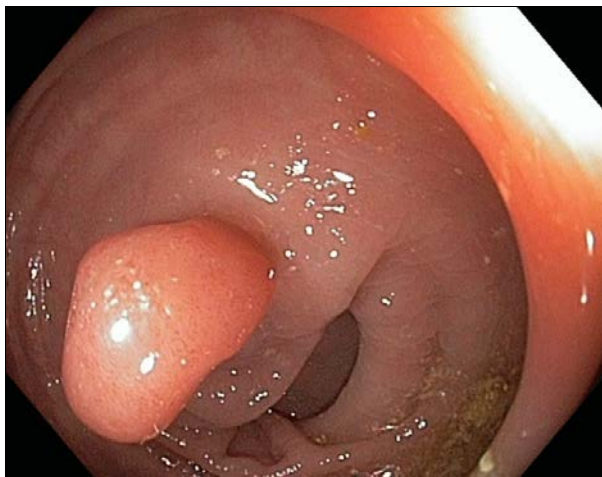
Os pólipos colorretais são uma projeção ou elevação na superfície da mucosa intestinal. São classificados em dois grandes grupos: neoplásicos e não-neoplásicos. Os pólipos neoplásicos estão representados por adenomas, lipomas e leiomiomas. No grupo dos pólipos não-neoplásicos estão os pólipos hamartomatosos, hiperplásicos/metaplásicos, inflamatórios/pseudopólipos e os pólipos linfóides benignos. Os adenomas apresentam grande importância clínica devido ao seu papel como precursor do CCR<sup>45</sup>.

Os pólipos adenomatosos (figura 3) são classificados histologicamente conforme sua vilosidade e tubularidade, e também de acordo com o seu grau de displasia, que pode ser de baixo ou alto grau<sup>46</sup>. O mais frequente é o adenoma tubular, que apresenta baixo risco de se tornar maligno, porém passa a ter risco quando aumenta de tamanho. Os adenomas vilosos correspondem 10% dos adenomas, apresentando maior risco de desenvolver displasias de alto grau e, portanto, maior risco de evolução para carcinoma invasivo. Os adenomas túbulo-vilosos são considerados de risco intermediário entre as lesões tubulares e vilosas, e correspondem 15% dos pólipos adenomatosos<sup>45; 46</sup>.

A incidência de transformação maligna nos adenomas é relacionada à extensão do componente viloso, ao grau de displasia e ao tamanho da lesão polipóide. Os adenomas com menos de 1,0 cm de tamanho, tem baixo risco de desenvolver a doença. No entanto, adenomas maiores que 2,0 cm apresentam grande risco de se transformar em lesão invasiva<sup>47; 48</sup>. A progressão de um adenoma para tumor maligno pode levar décadas<sup>49</sup>. A ocorrência do CCR

sem evidência de precusores adenomatosos sugere que algumas lesões displásicas podem degenerar em direção à malignidade sem passar por um estágio polipóide<sup>45</sup>.

A realização de polipectomia endoscópica permite a detecção precoce e a remoção de precusores malignos, o que pode reduzir a mortalidade e prevenir o desenvolvimento do câncer colorretal<sup>50</sup>.



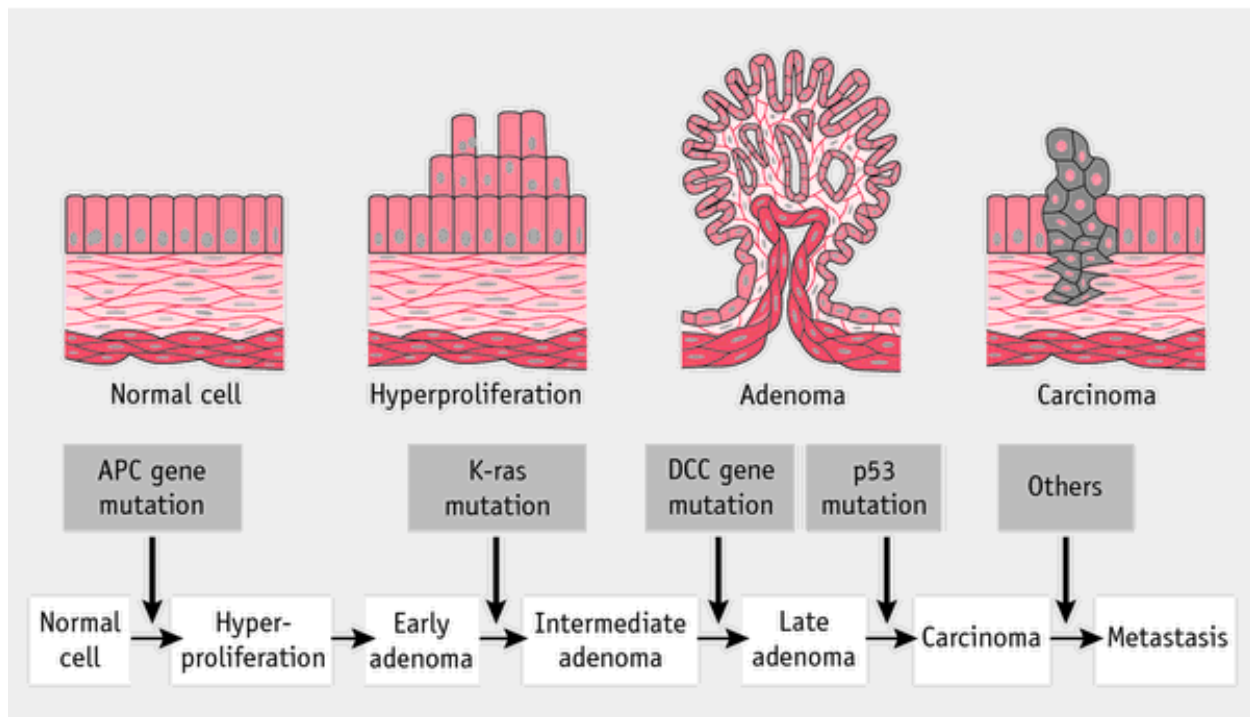
**Figura 3: Pólipo adenomatoso no cólon sigmóide, principal precursor do câncer colorretal<sup>51</sup>**

#### 2.2.5. CARCINOGENESE COLORRETAL

A carcinogênese colorretal se caracteriza pelo acúmulo de mutações e alterações epigenéticas em diversos genes supressores de tumor, oncogenes e genes associados ao reparo de erros de pareamento do DNA, resultando na transformação celular do epitélio colorretal<sup>36</sup>. Os defeitos moleculares são de dois tipos: alterações que conduzem a nova função ou aumento de oncogenes e alterações que levam a perda da função de genes supressores de tumores<sup>52</sup>.

A evolução molecular desse tumor está fundamentada no modelo adenoma-carcinoma, descrito por Fearon e Vogelstein (figura 4). O modelo enfatiza o papel central do pólipo adenomatoso como lesão precursora e propõe que mutações nos genes supressores de tumor e oncogenes ocorrem cumulativamente, em uma ordem específica. O primeiro evento é a

inativação do gene APC (*adenomatous polyposis coli*), o que leva a um crescimento celular anormal. A mutação do proto-oncogene KRAS (*kirsten rat Sarcoma viral oncogene homolog*) promove a evolução do adenoma. Na etapa seguinte ocorre a deleção do gene supressor de tumor DCC (*deleted in colorectal cancer*) e de outros genes localizados próximos a ele, no braço longo do cromossomo 18. A última etapa da progressão para carcinoma é a perda de uma região específica em 17p, onde se encontra o gene TP53<sup>53; 54</sup>.



**Figura 4: Sequência adenoma-carcinoma descrito por Fearon e Vogelstein<sup>55</sup>. O modelo enfatiza o papel central do pólipso adenomatoso como lesão precursora e propõe que mutações nos genes supressores de tumor e oncogenes ocorrem cumulativamente, em uma ordem específica.**

Após a descrição deste primeiro modelo, vários autores sugeriram a existência de outras vias de carcinogênese. Múltiplos eventos genéticos são necessários para progressão do tumor e a instabilidade genômica é reconhecida como uma função celular essencial que acompanha a aquisição destas mutações<sup>55</sup>. A instabilidade genômica ocorre quando a taxa de mutação ultrapassa a capacidade dos sistemas de reparação do ciclo celular<sup>56</sup>. Neste contexto, três

mecanismos principais contribuem para a carcinogênese colorretal: instabilidade cromossômica (CIN - *Chromosomal instability*), instabilidade de microssatélites (MSI - *Microsatellite instability*) e fenótipo metilador de ilhas CpG (CIMP - *CpG island methylator phenotype*)<sup>57</sup>.

A via de instabilidade cromossômica (CIN) está associada com a desregulação sequencial dos genes supressores de tumor e oncogenes, como APC, KRAS, DCC (*deleted in colorectal carcinoma*) e TP53<sup>58</sup>. É o tipo mais comum de instabilidade genômica sendo observada em 65-70% dos casos de CCR esporádicos. Caracteriza-se pelo acúmulo de anormalidades cromossômicas numéricas ou estruturais, resultando em aneuploidia, rearranjos cromossômicos e a frequente perda de heterozigosidade (LOH - *Loss of heterozygosity*), que é a principal causa da CIN<sup>59</sup>. LOH é definida como a perda de uma das duas cópias dos alelos de um gene<sup>57</sup>. Após a perda de material cromossômico de um alelo, o alelo restante pode ser afetado por uma mutação somática, deixando assim nenhum gene funcional; ou o alelo restante já pode conter uma mutação que está presente agora em homozigose e potencialmente mais expresso<sup>60</sup>. A lesão mais rapidamente identificável neste percurso é o foco de cripta aberrante, uma lesão microscópica da mucosa que precede o desenvolvimento de um pólipó<sup>61</sup>.

A via de instabilidade de microssatélites (MSI) se caracteriza por falha ou deficiência do sistema MMR (*mismatch repair*) de reparo de DNA através da hipermetilação ou mutação nos genes MLH1, MSH2, MSH6, e PMS2. A inativação destes genes resulta em acumulação de erros de replicação de DNA em sequências repetitivas, os microssatélites<sup>62</sup>. Há acúmulo de substituições de bases na sequência de DNA e/ou inserções-deleções, ocasionando perda ou ganho de unidades de repetições nestas regiões<sup>63</sup>. Os nucleotídeos de DNA são alterados por mutagênicos ambientais e erros espontâneos. MSI ocorre em cerca de 15-20% dos casos esporádicos de CCR<sup>58</sup>. Pode ser classificados em três categorias, dependendo do número de marcadores que mostram MSI. Considera-se alta instabilidade de microssatélites -MSI-H (*High*)- quando dois ou mais marcadores mostram instabilidade; baixa instabilidade -MSI-L (*Low*)- quando um único marcador apresenta instabilidade; e se nenhum dos marcadores apresentar instabilidade, o fenótipo é chamado de estabilidade de microssatélite MSS (*Microsatellite Stable*)<sup>56</sup>.



O fenótipo que causa metilação de ilhas CpG (*cytosine-phosphate-guanine*) acontece através da via instabilidade epigenética<sup>64</sup>. Ilhas CpG são regiões dentro do genoma ricas em dinucleotídeos CpG<sup>54</sup>. A metilação do DNA é uma modificação epigenética crítica para regulação e desenvolvimento normal do genoma<sup>65</sup>. Tanto a hipermetilação das ilhas CpG, localizadas nos promotores de genes de supressão tumoral, e a hipometilação global são eventos epigenéticos que acontecem no genoma, levando à oncogênese. Estudos recentes indicam que a hipometilação global do genoma pode levar à ativação de proto-oncogenes e da CIN, enquanto a hipermetilação regional leva à supressão de genes de controle do ciclo celular, bem como genes supressores de tumor e de reparo de DNA<sup>66</sup>.

#### 2.2.6. SINTOMAS, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

Os principais sintomas do câncer colorretal são: alteração nos hábitos intestinais, incluindo diarreia ou constipação ou mudança na consistência das fezes, em um período maior de quatro semanas; sangramento retal ou sangue nas fezes; desconforto abdominal persistente, como cólicas, gases ou dor; fraqueza ou fadiga; e perda de peso sem causa conhecida<sup>67</sup>. Pode manifestar-se também sob a apresentação de abdome agudo, com obstrução, perfuração ou hemorragia. Este quadro agudo é mais comum nos tumores do cólon esquerdo e reto<sup>45</sup>. Contudo, muitas pessoas não apresentam sintomas nos estágios iniciais da doença. Quando os sintomas aparecem, eles podem variar dependendo do tamanho e da localização do câncer no intestino. Com isso o rastreamento para a doença é de grande importância para maior chance de cura<sup>67</sup>.

O rastreamento do CCR é recomendado para todos os adultos com idade superior a 50 anos para detecção precoce da doença<sup>68</sup>. Os principais métodos incluem o exame físico com toque retal, pesquisa de sangue oculto nas fezes, retossigmoidoscopia, enema opaco e colonoscopia<sup>45</sup>. Estudos mostram que a colonoscopia e a sigmoidoscopia, seja para diagnóstico, rastreamento ou prevenção, está associado com redução da incidência e a mortalidade da doença<sup>69</sup>. A colonoscopia, por muitos anos, tem sido considerada o exame padrão para o

diagnóstico de patologias do cólon. É um exame endoscópico que permite a visualização do intestino grosso e também do íleo terminal. Tem alta sensibilidade e especificidade para detecção de lesões tumorais, adenomas pré-malignos e outras doenças do cólon<sup>70</sup>. A ressecção endoscópica das lesões precursoras permite a realização de polipectomias e biópsias, sendo possível avaliar o tipo histológico, o grau de displasia e as margens de ressecção a fim de quantificar seu potencial de malignização<sup>71</sup>.

Uma vez determinado o diagnóstico histopatológico, deve-se proceder ao estadiamento da doença<sup>45</sup>. Muitos fatores impactam no prognóstico do portador de CCR, mas o estágio do tumor no momento do diagnóstico é imprescindível. O estágio tumoral é geralmente definido pela classificação TNM (*tumor-node-metastasis*), estabelecido pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC). É o sistema de estadiamento mais usado e baseia-se na profundidade da invasão da parede do intestino, no grau de envolvimento do linfonodo regional, e na presença de metástase á distância<sup>72; 73</sup>. O sistema TNM (tabela 1) é uma ferramenta utilizada para estabelecer o prognóstico inicial do paciente e tomar decisões terapêuticas<sup>74</sup>.

**Tabela 1: Classificação TNM<sup>75</sup>**

**T (tumor primário)**

<b>TX</b>	O tumor primário não pode ser avaliado
<b>T0</b>	Não há evidência de tumor primário
<b>T1</b>	Tumor invade a submucosa
<b>T2</b>	Tumor invade a muscular própria
<b>T3</b>	Tumor cresceu através da muscular própria e nas camadas mais externas do cólon ou do reto
<b>T4a</b>	Tumor penetra na superfície do peritônio visceral
<b>T4b</b>	Tumor invade outros órgãos ou estruturas

**N (linfonodos regionais)**

<b>NX</b>	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
<b>N0</b>	Ausência de metástases em linfonodos regionais
<b>N1</b>	Metástase em 1-3 linfonodos regionais
<b>N1a</b>	Metástase em um linfonodo regional
<b>N2b</b>	Metástase em 2-3 linfonodos regionais
<b>N1c</b>	Depósito de tumor em áreas de gordura dos linfonodos
<b>N2</b>	Metástase em 4 ou mais linfonodos regionais

<b>N2a</b>	Metástase em 4-6 linfonodos regionais
<b>N2b</b>	Metástase em 7 ou mais linfonodos regionais
<b>M (metástases à distância)</b>	
<b>M0</b>	Ausência de metástases à distância
<b>M1</b>	Presença de metástase à distância
<b>M1a</b>	Metástase em um órgão ou local
<b>M2b</b>	Metástase em mais de um órgão / partes distantes do peritônio

A escolha do tratamento depende, principalmente, da localização do tumor e da extensão da doença. A cirurgia é a base do tratamento para o câncer colorretal, podendo ser feita em combinação com outros tratamentos como a quimioterapia e radioterapia adjuvantes ou neoadjuvantes<sup>45; 76</sup>. Pode ter caráter curativo, quando é realizada a ressecção do segmento afetado sem evidência de doença residual; ou paliativo, quando o tratamento visa alívio de algum sintoma, como dor, obstrução, sangramento, permanecendo indícios locais ou à distância de tumor residual. O risco de recidiva é considerável em pacientes que tenham comprometimento linfonodal e em alguns pacientes com tumores iniciais considerados de risco. A quimioterapia adjuvante é um tratamento sistêmico administrado após a remoção do tumor primário que objetiva diminuir os riscos da recidiva local<sup>45</sup>. A quimioterapia sistêmica neoadjuvante, que é realizada antes da cirurgia, é utilizada quando as condições de ressecabilidade são inexistentes no momento do diagnóstico<sup>77</sup>.

O câncer colorretal tem bom prognóstico quando diagnosticado em fase inicial, porém 25% dos pacientes já desenvolveram metástases no momento do diagnóstico e 50% de todos os pacientes com a doença irão desenvolver metástases ao longo do tempo, a medida que a doença progride<sup>78</sup>. Em pacientes com doença metastática avançada o tratamento é paliativo, visando prolongar a sobrevida e manter a qualidade de vida por maior tempo possível<sup>79</sup>.

A imunoterapia é outro tratamento que pode ser eficaz para pacientes com CCR ou para prevenção de recaída. É uma abordagem terapêutica projetada para acionar o sistema imune a responder contra antígenos tumorais específicos e atacar células malignamente transformadas<sup>80</sup>. Células da imunidade inata e adaptativa previnem ativamente o

desenvolvimento neoplásico num processo chamado vigilância imunológica do câncer. As células da imunidade inata, que incluem monócitos, macrófagos, células dendríticas e células *Natural Killer* (NK), liberam citocinas que lisam diretamente as células tumorais. As células da imunidade adaptativa, que incluem linfócitos T e B, têm respostas antígeno específicas e memória efetiva<sup>81</sup>.

Com o aperfeiçoamento da cirurgia e dos tratamentos com quimioterapia neoadjuvante, radioterapia e imunoterapia, os índices de recidiva reduziram com taxas de sobrevivência superior a 70%<sup>82</sup>.

### 2.3. CÂNCER COLORRETAL E O SISTEMA IMUNOLÓGICO

O conceito de vigilância imunológica no câncer prediz que o sistema imune pode reconhecer precursores tumorais e, em muitos casos, destruir estes precursores antes de se tornarem clinicamente evidentes. Os tumores desenvolvem uma série de diferentes estratégias para escapar da vigilância imunológica pelas células *Natural Killer* (NK)<sup>83</sup>.

As respostas imunes contra tumores colorretais podem ser detectadas na fase inicial do câncer, indicando que o sistema imune é capaz de reconhecer as células tumorais. No entanto o tumor produz moléculas que inibem a infiltração, reduzem a atividade ou alteram o fenótipo das células imunitárias. Isso resulta em uma resposta antitumoral menos eficaz, permitindo o crescimento do tumor<sup>84</sup>. A redução ou a perda total de HLA (*Human Leukocyte Antigen*) classe I das células e vários mecanismos moleculares diferentes podem ser responsáveis por este fenômeno<sup>85</sup>.

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 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<sup>86</sup>.

Já foi reconhecido que a progressão da doença em pacientes com câncer não é exclusivamente determinada pelas características do tumor, mas também pela resposta do hospedeiro. De fato, há evidências que respostas inflamatórias locais e sistêmicas desempenham um papel importante na progressão de uma variedade de tumores sólidos<sup>87</sup>.

O microambiente inflamatório pode influenciar em várias características do câncer. Evidências indicam que mais de 20% dos tumores estão ligados a inflamação crônica, desde o início do tumor e ao longo da progressão maligna. A doença de Crohn e a retocolite ulcerativa são duas formas principais de doença inflamatória intestinal que fornecem um risco elevado para o desenvolvimento do CCR<sup>88</sup>.

Em modelos de tumorigênese, as células NK demonstraram aumentar a sobrevivência e diminuir o número de células tumorais<sup>89</sup>. O reconhecimento da célula tumoral pela célula NK é baseado na sua capacidade única de identificar e atacar células que com níveis diminuídos ou ausentes de HLA classe I, normalmente expressos em células saudáveis<sup>90</sup>.

Os genes KIR foram estudados em diversas doenças diferentes. Vários estudos relataram a associação KIR/HLA ou genótipos KIR distintos para suscetibilidade ou proteção para infecções virais, autoimunidade ou doenças inflamatórias crônicas e distúrbios que afetam a gravidez. Além disso, vários estudos têm associado genótipos KIR/HLA com suscetibilidade a certos tipos de câncer (melanoma, câncer cervical, câncer de mama, linfoma de Hodgkin e leucemias)<sup>90; 91; 92; 93</sup>.

Estudos mostram que a perda da expressão do HLA de classe I é bastante comum no câncer colorretal e que estes pacientes mostram benefício de sobrevivência<sup>94</sup>. Gillgrass e colaboradores (2011) relataram que pacientes com tumores primários que demonstraram a perda da expressão do HLA de classe I têm baixo risco de desenvolver metástases à distância.

Portanto, é possível que o benefício de sobrevida seja devido ao fato de que as células tumorais metastáticas nestes pacientes são eficientemente eliminadas por células NK na circulação<sup>95</sup>.

#### 2.4. CÉLULAS NATURAL KILLER (NK)

As células NK foram identificadas em 1975 por Kiessling<sup>96</sup> como um subconjunto de células que são morfológicamente maiores do que os linfócitos T e B e contém grânulos citoplasmáticos distintos<sup>81; 97</sup>. O termo *natural killer* deriva do fato de que sua principal função é a morte da célula-alvo sem a necessidade de expansão clonal e diferenciação<sup>98</sup>.

As células NK fazem parte do sistema imune inato e são responsáveis pela vigilância imunológica contra células infectadas por vírus e bactérias, atacando também células transformadas ou tumorais. Vários aspectos fundamentais do desenvolvimento das células NK ocorrem na medula óssea, onde se diferenciam e depois entram na circulação<sup>99</sup>. Compreendem cerca de 10-15% dos linfócitos do sangue periférico e são definidas fenotipicamente como CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup>. Além do sangue, as células NK podem ser encontradas nos linfonodos, baço e tecidos periféricos. Diferem-se funcionalmente dos integrantes da imunidade adaptativa por reagirem de maneira rápida durante a invasão do organismo por vírus e bactérias<sup>100</sup>.

A maturação das células NK ocorre na medula óssea, a partir de progenitores CD34<sup>+</sup>, e, quando ativadas, podem produzir altos níveis de citocinas e quimiocinas que recrutam outras células de defesa do organismo para os sítios inflamatórios. No estágio inicial da maturação, ocorre a regulação destas células<sup>101</sup>. As primeiras evidências sugerem que a expressão de pelo menos um receptor inibidor, capaz de reconhecer moléculas de HLA (*Human Leukocyte Antigen*) de classe I próprias, durante o seu desenvolvimento, seria fundamental para a tolerância aos constituintes próprios e para a ação das células NK contra infecções e transformações malignas. Com isso as células NK amadurecem e tornam-se funcionalmente competentes ou “licenciadas”, enquanto as células NK que não possuem pelo menos uma interação funcional inibidora podem ser menos responsivas<sup>102;103</sup>. Este processo de

licenciamento pode contribuir para a heterogeneidade nos níveis de ativação das células NK, observada entre diferentes indivíduos e até mesmo entre diferentes subpopulações de células NK de um mesmo indivíduo<sup>104</sup>.

As células NK apresentam diferentes mecanismos que estão envolvidos na destruição das células tumorais<sup>105</sup>:

- Citotoxicidade mediada por perforinas e granzimas: a liberação dos grânulos citotóxicos com perforinas e granzimas é uma forma rápida e poderosa de matar a célula-alvo<sup>106</sup>.
- Receptores mediadores de apoptose: a morte da célula-alvo é induzida por apoptose via ligantes do fator de necrose tumoral (TNF), ligante Fas (interação Fas/FasL) e TRAIL (Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF)<sup>107; 108</sup>.
- Funções efetoras do Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ): após a ativação, as células NK secretam várias citocinas, como INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e interleucinas (IL)-10 ou IL-13<sup>109</sup>. A produção de INF- $\gamma$  e de outras citocinas pelas células NK atua na ativação dos macrófagos e de outras células apresentadoras de antígenos (APCs) e na ativação e diferenciação dos linfócitos T em células efetoras<sup>6; 110</sup>.

As principais citocinas do sistema imune inato que estimulam a função das células NK são IL-12, IL-15, IL-18. Cada uma destas citocinas aumenta a atividade citotóxica destas células, sendo a IL-12 e a IL-15 importantes fatores de crescimento para as células NK<sup>98</sup>. Apesar de não exercerem ação antígeno específica, as células NK também são importantes nas fases iniciais das respostas imunológicas adaptativas<sup>6; 110</sup>.

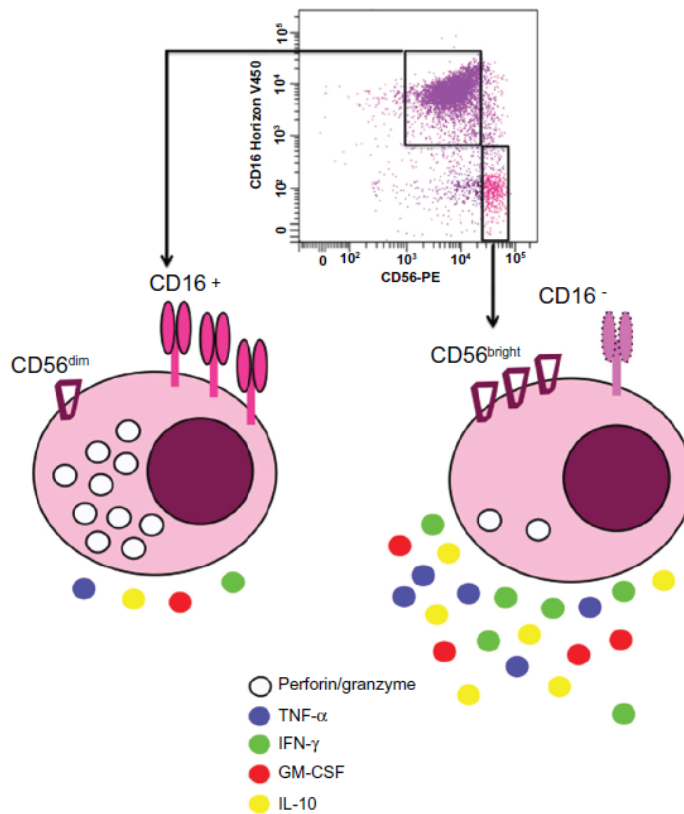
Em humanos, as células NK podem ser divididas em dois subconjuntos em função do nível de expressão do CD56, bem como a presença ou ausência de CD16 (figura 5)<sup>111; 112</sup>. Os dois marcadores são geralmente expressos reciprocamente nessas células e identificados por citometria de fluxo. Estes dois subconjuntos são referidos como CD56<sup>bright</sup> e CD56<sup>dim</sup> que

diferem em suas capacidades funcionais, sendo responsáveis pela produção de citocinas e pela citotoxicidade, respectivamente<sup>6; 113</sup>.

As células NK dos linfonodos e amígdalas, que correspondem a 10% das células NK circulantes, são CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> e têm carência de perforinas<sup>113</sup>. Expressam receptores de alta afinidade para a IL-2 (Interleucina-2), através do seu receptor (IL-2R), produzem principalmente citocinas após a ativação e têm baixo potencial citotóxico<sup>114</sup>.

No sangue periférico, em torno de 90% das células NK são CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> e expressam perforinas<sup>113</sup>. Possuem baixa afinidade para IL-2R e são altamente citotóxicas<sup>114</sup>. Estas células NK são recrutadas e acumulam-se no parênquima dos órgãos lesados, onde é ativada para matar a célula-alvo. Por força de expressão do CD16, eles também são eficientes mediadores de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC - *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*). O CD16 é um receptor de Fc de baixa afinidade para imunoglobulinas o que confere às células NK esta capacidade de lise da células-alvo quando essas estiverem sensibilizadas com anticorpos<sup>113</sup>.





**Figura 5: Subgrupos de células NK baseadas na expressão de CD56 e CD16<sup>105</sup> (adaptado).**

A atividade citolítica e a produção de citocinas pelas células NK são reguladas por receptores que ativam ou inibem a resposta destas células<sup>98</sup>. Os genes que codificam os receptores das células NK estão agrupados em dois cromossomos distintos. No cromossomo 12 estão localizados os genes CD94 e NKG2, que codificam receptores semelhantes a lectina tipo C<sup>115</sup>. No cromossomo 19 situa-se o complexo de receptores leucocitários (LCR - *Leukocyte Receptor Complex*) que codificam moléculas relacionadas à superfamília das imunoglobulinas: os receptores semelhantes à imunoglobulina (IgSF), os receptores semelhantes à lectina C e os receptores KIR (*Killer-cell immunoglobulin-like receptor*); todos podem contribuir com sinais inibidores e/ou ativadores<sup>7; 116</sup>. O maior grupo de receptores expressos na célula NK são os receptores KIR<sup>98</sup>, que reconhecem uma célula estranha através da ligação com as moléculas de HLA de classe I<sup>117</sup>.

As células NK interpretam a presença das moléculas de HLA de classe I, presente na maioria das células normais, como um marcador de células próprias (*self*)<sup>98</sup>. Na presença de sinais ativadores e inibidores a influência inibidora é predominante e a célula NK se encontra inativa, impedindo assim a morte de células normais. No entanto, em células infectadas ou tumorais a expressão HLA de classe I pode estar alterada, de modo que o sinal inibidor é perdido e as células NK são ativadas. Esse modelo de ativação é conhecido como “*missing-self*” (falta do próprio), pois as células NK agem quando não encontram as moléculas que conferem a identidade da célula própria<sup>117; 118</sup>. Dependendo do balanço entre sinais inibidores e ativadores, acontece ou não o ataque à célula alvo. Esse mecanismo pode ser observado na Figura 6.

Cada célula NK expressa, aleatoriamente, um conjunto diferente de receptores KIR ativadores e inibidores. Dessa forma, nem todas as células NK do organismo apresentam os mesmos receptores em sua membrana, podendo cada célula ser mais ou menos reativa a determinados patógenos ou células neoplásicas<sup>119</sup>.

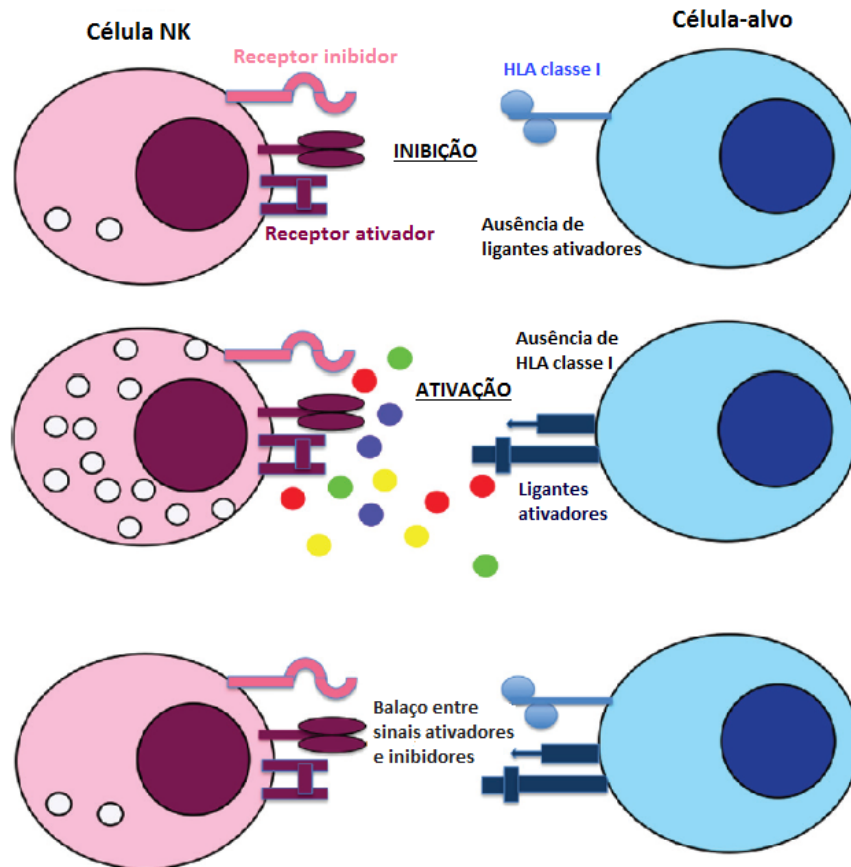


Figura 6: Inibição, ativação ou balanço de sinais entre as células NK e célula-alvo<sup>105</sup> (adaptado). Quando os sinais inibidores preponderam sobre os ativadores, a célula não é ativada. A ausência de HLA classe I permite que sinais ativadores levem ao ataque pela célula NK. De maneira semelhante, a resposta das células NK depende de um equilíbrio entre sinais ativadores e inibidores.

## 2.5. GENES E RECEPTORES KIR

Os receptores KIR são um grupo de moléculas reguladoras, representantes da família das imunoglobulinas, encontradas na superfície de células NK e em alguns linfócitos T (TNK)<sup>5; 98</sup>. Os genes KIR, que codificam estes receptores, estão localizados no braço longo do cromossomo 19 (19q13.4), sendo altamente polimórficos<sup>120; 121</sup>.

Os receptores KIR possuem 15 genes descobertos até o momento (KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR2DL4, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5 e KIR3DS1) e dois pseudogenes (KIR2DP1 e KIR3DP1). Destes, quatro genes KIR (KIR3DL3, KIR3DP1, KIR2DL4, KIR3DL2) estão sempre presentes e são considerados genes estruturais (*framework genes*)<sup>122; 123</sup>.

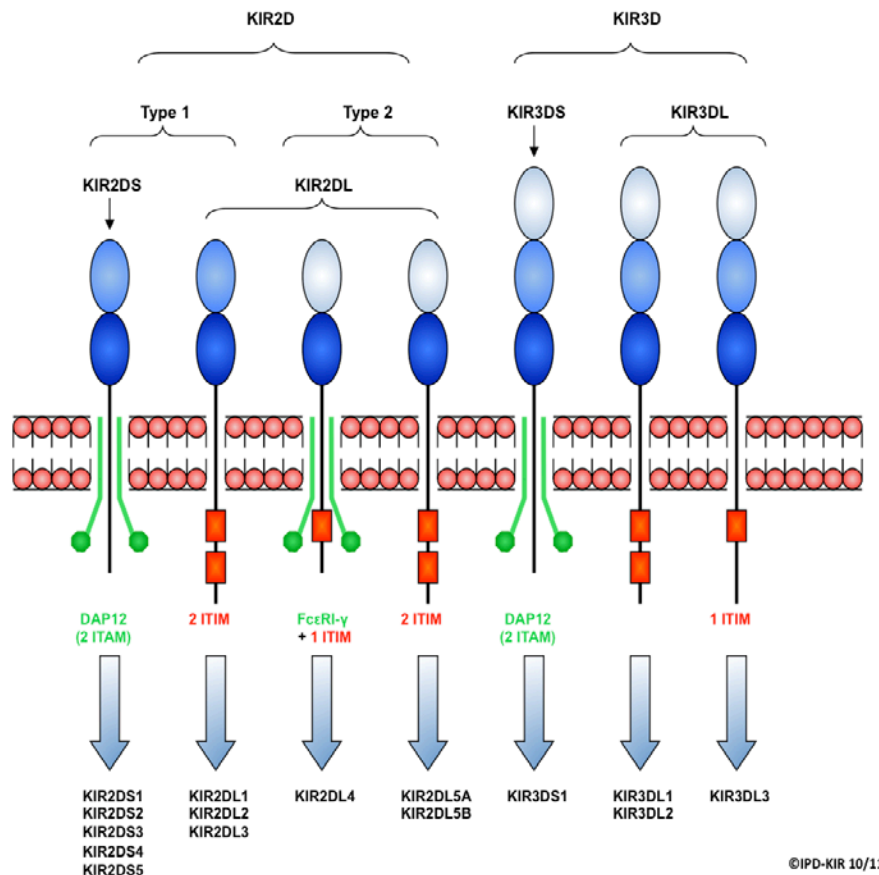
A nomenclatura dos genes KIR está baseada na estrutura da cauda citoplasmática do gene e no número de domínios extracelulares do tipo “imunoglobulina”. Os receptores inibitórios possuem cauda citoplasmática longa e, por isso, recebem a denominação da letra “L” (do inglês *long*). Já os receptores ativadores receberam a denominação da letra “S” (do inglês *short*) devido à cauda citoplasmática curta<sup>5; 124</sup>. Os domínios extracelulares são responsáveis pelo reconhecimento da célula alvo. Alguns possuem dois domínios de imunoglobulina (2D) e outros possuem três domínios de imunoglobulina (3D), os quais têm a tarefa de reconhecer os seus ligantes do sistema HLA.

Os genes KIR de cauda citoplasmática longa, com função inibidora, possuem motivos inibidores baseados em tirosina – ITIMs (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*); e os genes de cauda citoplasmática curta, com potencial ativador, apresentam motivos ativadores baseados em tirosina – ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activating motif*)<sup>125; 126</sup>. A palavra *motif* (motivo), pode ser interpretada como uma resposta intracelular desencadeada por uma sinalização extracelular<sup>127</sup>.

Quando os receptores inibidores das células NK identificam moléculas HLA de classe I das células alvo como próprias, desencadeiam a sinalização inibitória em virtude da presença dos ITIMs. A fosforilação dos ITIMs leva o recrutamento e ativação de fosfatases SHP-1 e 2 (Src-homology domain-bearing tyrosine phosphatase), o que causa a supressão dominante dos receptores de ativação<sup>128</sup>. O resultado é o bloqueio da atividade citolítica da célula NK e secreção de citocinas<sup>127</sup>.

Os receptores de ativação das células NK geram citotoxicidade e secretam citocinas. Para estes receptores faltam ITIMs, porém eles possuem um aminoácido modificado

positivamente (lisina) na região da transmembrana. Através desse aminoácido eles associam-se não covalentemente com um dímero de uma proteína adaptadora, a DAP-12, que libera o sinal ativador via ITAM<sup>129</sup>. Depois da interação entre o ligante e os receptores de ativação das células NK, os resíduos de tirosina dos ITAMs são fosforilados por cinases citoplasmáticas e recrutam outras proteínas cinases (ZAP-70/Syk), que interagem com os ITAMs fosforilados. Com isso o sinal ativador é transmitido para a célula NK matar a célula alvo e secretar citocinas, podendo destruir as células infectadas ou tumorais<sup>130</sup>. Os ITAMs são também encontrados em caudas citoplasmáticas de outros receptores de sinalização no sistema imune, incluindo os receptores de antígenos dos linfócitos T e B. A ação ativadora das NK também cria a possibilidade de haver estímulo à imunidade adaptativa, ativando outras células da resposta imune<sup>5</sup>.



**Figura 7: Características na estrutura dos genes KIR, baseadas no número de domínios extracelulares (2D e 3D) e nas caudas intracitoplasmática curtas (S) e longas (L)<sup>131</sup>.**

### 2.5.1. DIVERSIDADE HAPLOTÍPICA

A variação haplotípica encontrada no complexo KIR é devido ao número de genes que compõem o haplótipo, bem como o polimorfismo alélico em vários desses genes. Os haplótipos são um conjunto de genes mesmo cromossomo e a distribuição dos genes KIR no cromossomo foi estruturada em dois grupos: haplótipo A e B (Figura 8). A principal diferença entre esses grupos, com implicações funcionais no reconhecimento das NK, é o número de genes KIR ativadores<sup>132; 133</sup>.

O haplótipo A é composto por nove genes e tem como característica a dominância dos genes inibidores, existindo somente um gene ativador (2DS4). O gene KIR2DS4 possui um alelo nulo e, frequentemente, não é expresso. Cerca de 80% dos caucasianos têm essa supressão. Sendo assim, alguns indivíduos podem ser homozigotos para um haplótipo A no qual nenhum KIR ativador é expresso<sup>134; 135</sup>. Em contraste, o haplótipo B possui uma alta diversidade de genes, variando de sete a onze genes, entre os quais estão presentes outros genes KIR ativadores, além de KIR2DS4. Os genes estruturais (*frameworks*) estão presentes em ambos haplótipos. Os haplótipos A e B dos genes KIR são distribuídos em diversos genótipos distintos, podendo existir homozigose para o haplótipo A (genótipo AA) e a heterozigose ou homozigose para o haplótipo B (genótipo AB ou BB), esses últimos também chamados de genótipos Bx. As frequências dos haplótipos A e B podem variar entre as populações, possivelmente devido às diferenças raciais<sup>135; 136</sup>.

### A haplotype



### B haplotype



**Figura 8: Haplótipos A e B dos genes KIR. Os genes KIR inibidores estão em vermelho, enquanto os genes ativadores em verde. Os genes estruturais estão em cinza e em preto os pseudogenes. Nota-se que o haplótipo A possui somente um gene KIR ativador (2DS4)<sup>137</sup>.**

#### 2.5.2. LIGANTES DOS GENES KIR

A atividade da célula NK acontece através dos seus receptores KIR, que reconhecem as moléculas HLA de classe I<sup>138</sup>. O sistema HLA situa-se no cromossomo 6 e constitui o conjunto gênico mais polimórfico do genoma. Os genes HLA de classe I codificam as moléculas HLA-A, HLA-B e HLA-C e os de classe II as moléculas HLA-DR, DQ e DP. As proteínas HLA classe I estão presentes em todas as células nucleadas, e desempenham função na apresentação de antígenos endógenos para células TCD8<sup>+</sup> e no controle da atividade citotóxica das células NK<sup>139</sup>.

O maior repertório de ligantes KIR são de alelos que derivam do HLA-C, que são divididos em dois grupos (C1 e C2) devido um polimorfismo presente na posição 77 e 80 da molécula. O grupo C1 tem um resíduo de serina na posição 77 (Ser77) e aspargina na posição 80 (Asn80), e o grupo C2 tem a presença de um resíduo de aspargina na posição 77 (Asn77) e lisina na posição 80 (Lys80). O grupo C1 inclui os alelos HLA-Cw1, -Cw3, -Cw7, -Cw8, -Cw13, -Cw14 e o grupo C2 compreende os alelos HLA-Cw2, -Cw4, -Cw5, -Cw6, -Cw17, -Cw18<sup>140; 141</sup>. O loco HLA-B pode ser dividido em dois grupos: Bw4 e Bw6. O KIR3DL1 e KIR3DS1 reconhecem epítomos Bw4, que são codificadas tanto por HLA-A quanto por HLA-B, sendo que as moléculas Bw4(80I) são reconhecidas mais fortemente. Não se conhecem interações de alta afinidade com moléculas

Bw6<sup>142; 143</sup>. O KIR3DL2 liga-se ao HLA-A3 e A11<sup>144</sup>. O receptor KIR2DL4 liga-se com HLA-G, tipo não clássico de HLA, com pouco polimorfismo e expresso em células endoteliais do timo, de trofoblastos fetais e córnea. As células NK em repouso podem ser estimuladas a produzir citocinas e quimiocinas por HLA-G solúvel<sup>100; 145</sup>. A Tabela 2 mostra os receptores KIR com seus respectivos ligantes HLA.

**Tabela 2: Receptores KIR e seus ligantes específicos**

<b>KIR inibidor</b>	<b>Ligante HLA</b>
KIR2DL2 e KIR2DL3	HLA-C Grupo 1 (Cw 1, 3, 7, 8, 13,14)
KIR2DL1	HLA-C Grupo 2 (Cw 2, 4, 5, 6, 17,18)
KIR3DL1	Bw4 (B8, 27, 51, 53, 58, 13, 44, 52, 57)
KIR 3DL2	HLA-A (A3, 11)
KIR 2DL4	HLA-G
<b>KIR ativador</b>	<b>Ligante HLA</b>
KIR2DS2	HLA-C Grupo 1 (Cw 1, 3, 7, 8, 13,14)
KIR2DS1	HLA-C Grupo 2 (Cw 2, 4, 5, 6, 17,18)
KIR3DS1	Bw4 (B8, 27, 51, 53, 58, 13, 44, 52, 57)

Vários estudos genéticos sugerem um modelo em que a inibição das células NK por algumas combinações KIR/HLA é mais forte do que outras. Neste modelo, a inibição por KIR2DL1/HLA-C2 é mais forte, seguido de KIR2DL2/HLA-C1, e, finalmente, KIR2DL3/HLA-C1. Portanto, interações inibitórias mais fracas podem resultar em maior ativação das células NK e uma melhor proteção contra infecções por vírus ou uma maior autoimunidade<sup>146</sup>.



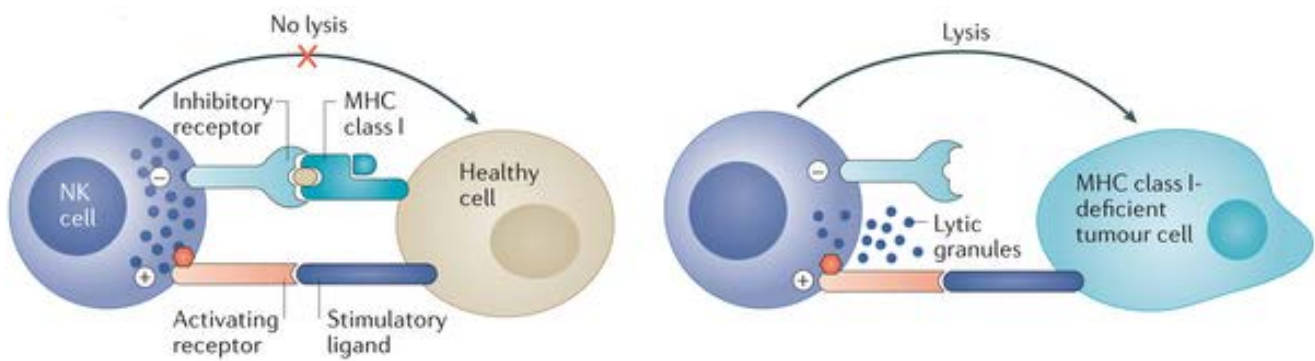
### 3. MARCO TEÓRICO

I

As células NK possuem habilidade de matar tumores ou células infectadas por vírus, através dos receptores KIR, reconhecendo a célula normal pela expressão do HLA de classe I.



Quando a expressão do HLA de classe I estiver diminuída como em uma célula tumoral, a célula NK é ativada levando a célula maligna à morte.



Nature Reviews | [Cancer](#)

II



Identificar a ausência e a presença dos receptores KIR pode ser de grande importância na patogênese do câncer colorretal, devido ao fato de diminuir ou aumentar atividade da célula NK.

#### **4. JUSTIFICATIVA**

As células NK e os genes KIR têm uma importante relação com o câncer, representando a primeira linha de defesa contra o desenvolvimento desta doença. No entanto seu papel não está bem esclarecido, havendo ainda resultados controversos na literatura quanto ao potencial das células NK e os receptores KIR no câncer colorretal.

As identificações de polimorfismos dos genes KIR no câncer colorretal poderiam nos dar uma melhor compreensão sobre o possível papel das células NK no crescimento tumoral. Além disso, auxiliar na identificação de grupos de risco para o desenvolvimento da doença e de subgrupos de pacientes com melhor ou pior prognósticos.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo Geral

Investigar o polimorfismo dos genes KIR e HLA classe I em um grupo de pacientes caucasoides da Região Sul do Brasil com câncer colorretal e compará-los com um grupo controle de indivíduos saudáveis.

### 5.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a frequência dos diversos polimorfismos dos genes KIR através do método PCR-SSO (*Sequence Specific Oligonucleotide*) em pacientes com câncer colorretal e grupo controle.
- Avaliar a frequência dos diversos polimorfismos dos genes HLA-C1, HLA-C2, HLA-A3, HLA-A11 e HLA-Bw4 através do método PCR-SSP (*Sequence Specific Primer*) em pacientes com câncer colorretal e grupo controle.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 SOCIETY, A. C. Colorectal Cancer Facts & Figures | American Cancer Society. 2016. Disponível em: < <http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/colorectal-cancer-facts-figures> >.
- 2 MIGLIORE, L. et al. Genetics, Cytogenetics, and Epigenetics of Colorectal Cancer. **J Biomed Biotechnol**, v. 2011, 2011. ISSN 1110-7243 (Print)1110-7251 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2011/792362> >.
- 3 NACCARATI, A. et al. Sporadic colorectal cancer and individual susceptibility: a review of the association studies investigating the role of DNA repair genetic polymorphisms. **Mutat Res**, v. 635, n. 2-3, p. 118-45, May-Jun 2007. ISSN 0027-5107 (Print)0027-5107. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.02.001> >.
- 4 ARMELAO, F.; DE PRETIS, G. Familial colorectal cancer: A review. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 28, p. 9292-8, Jul 28 2014. ISSN 1007-9327 (Print)2219-2840 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i28.9292> >.
- 5 VILCHES, C.; PARHAM, P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. **Annu Rev Immunol**, v. 20, p. 217-51, 2002. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861603> >.
- 6 CALIGIURI, M. A. Human natural killer cells. **Blood**, v. 112, n. 3, p. 461-9, Aug 2008. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18650461> >.
- 7 PARHAM, P. Killer cell immunoglobulin-like receptor diversity: balancing signals in the natural killer cell response. **Immunol Lett**, v. 92, n. 1-2, p. 11-3, Mar 2004. ISSN 0165-2478. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15081521> >.
- 8 LIU, W. R. et al. Genomic organization of the human leukocyte immunoglobulin-like receptors within the leukocyte receptor complex on chromosome 19q13.4. **Immunogenetics**, v. 51, n. 8-9, p. 659-69, Jul 2000. ISSN 0093-7711. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10941837> >.
- 9 JOBIM, M. et al. A study of the killer cell immunoglobulin-like receptor gene KIR2DS1 in a Caucasoid Brazilian population with psoriasis vulgaris. **Tissue Antigens**, v. 72, n. 4, p. 392-6, Oct 2008. ISSN 1399-0039. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18643961> >.
- 10 SUZUKI, Y. et al. Genetic polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptors are associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. **J Invest Dermatol**, v. 122, n. 5, p. 1133-6, May 2004. ISSN 0022-202X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15140215> >.
- 11 MARTIN, M. P. et al. Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles. **J Immunol**, v. 169, n. 6, p.

- 2818-22, Sep 2002. ISSN 0022-1767. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12218090>>.
- 12 WILLIAMS, F. et al. Activating killer cell immunoglobulin-like receptor gene KIR2DS1 is associated with psoriatic arthritis. **Hum Immunol**, v. 66, n. 7, p. 836-41, Jul 2005. ISSN 0198-8859. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16112031>>.
- 13 PELLETT, F. et al. KIRs and autoimmune disease: studies in systemic lupus erythematosus and scleroderma. **Tissue Antigens**, v. 69 Suppl 1, p. 106-8, Apr 2007. ISSN 0001-2815. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17445179>>.
- 14 ASKAR, M. et al. Lack of killer immunoglobulin-like receptor 2DS2 (KIR2DS2) and KIR2DL2 is associated with poor responses to therapy of recurrent hepatitis C virus in liver transplant recipients. **Liver Transpl**, v. 15, n. 11, p. 1557-63, Nov 2009. ISSN 1527-6473. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19877200>>.
- 15 MIDDLETON, D. et al. Analysis of KIR gene frequencies in HLA class I characterised bladder, colorectal and laryngeal tumours. **Tissue Antigens**, v. 69, n. 3, p. 220-6, Mar 2007. ISSN 0001-2815. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17493145>>.
- 16 BABOR, F.; FISCHER, J. C.; UHRBERG, M. The role of KIR genes and ligands in leukemia surveillance. **Front Immunol**, v. 4, 2013. ISSN 1664-3224 (Electronic). Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2013.00027>>.
- 17 JOBIM, M. et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity in a Caucasian population of southern Brazil. **Int J Immunogenet**, v. 37, n. 2, p. 83-9, Apr 2010. ISSN 1744-3121. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-313X.2009.00894.x>>.
- 18 \_\_\_\_\_. Association of killer cell immunoglobulin-like receptors and human leukocyte antigen-C genotypes in South Brazilian with type 1 diabetes. **Human Immunology**, v. 71, n. 8, p. 799-803, August 2010 2010. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2010.05.014>>.
- 19 SALIM, P. H. et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genes in systemic sclerosis. **Clin Exp Immunol**, v. 160, n. 3, p. 325-30, Jun 2010. ISSN 1365-2249. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20082621>>.
- 20 WILSON, T. J. et al. Study of killer immunoglobulin-like receptor genes and human leukocyte antigens class I ligands in a Caucasian Brazilian population with Crohn's disease and ulcerative colitis. **Hum Immunol**, v. 71, n. 3, p. 293-7, Mar 2010. ISSN 0198-8859. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2009.12.006>>.
- 21 VAIRO, F. et al. Human leukocyte antigens and Gaucher disease. **Blood Cells Mol Dis**, v. 50, n. 3, p. 202-5, Mar 2013. ISSN 1079-9796. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2012.10.008>>.
- 22 \_\_\_\_\_. KIR genes and HLA class I ligands in Gaucher disease. **Gene**, v. 516, n. 1, p. 53-7, Mar 1 2013. ISSN 0378-1119. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.12.014>>.

- 23 JOBIM, M. R. et al. Analysis of KIR gene frequencies and HLA class I genotypes in breast cancer and control group. **Hum Immunol**, v. 74, n. 9, p. 1130-3, Sep 2013. ISSN 0198-8859. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2013.06.021> >.
- 24 PORTELA, P. et al. Analysis of KIR gene frequencies and HLA class I genotypes in prostate cancer and control group. **Int J Immunogenet**, v. 39, n. 5, p. 423-8, Oct 2012. ISSN 1744-3121. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-313X.2012.01115.x> >.
- 25 AL OMAR, S. et al. Associations between genes for killer immunoglobulin-like receptors and their ligands in patients with solid tumors. **Hum Immunol**, v. 71, n. 10, p. 976-81, Oct 2010. ISSN 0198-8859. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2010.06.019> >.
- 26 KIM, H. J. et al. HLA-Cw polymorphism and killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene analysis in Korean colorectal cancer patients. **Int J Surg**, v. 12, n. 8, p. 815-20, 2014. ISSN 1743-9159. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijsu.2014.06.012> >.
- 27 AL OMAR, S. Y. et al. The Relationship Between Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptors and HLA-C Polymorphisms in Colorectal Cancer in a Saudi Population. **Genet Test Mol Biomarkers**, v. 19, n. 11, p. 617-22, Nov 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/gtmb.2015.0105> >.
- 28 IRVING, M. H.; CATCHPOLE, B. ABC of colorectal diseases. Anatomy and physiology of the colon, rectum, and anus. **Bmj**, v. 304, n. 6834, p. 1106-8, 1992. ISSN 0959-8138 (Print)0959-535x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 29 KHASHAB, M. A. et al. Colorectal anatomy in adults at computed tomography colonography: normal distribution and the effect of age, sex, and body mass index. **Endoscopy**, v. 41, n. 8, p. 674-8, Aug 2009. ISSN 0013-726x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1055/s-0029-1214899> >.
- 30 IACOPETTA, B. Are there two sides to colorectal cancer? **Int J Cancer**, v. 101, n. 5, p. 403-8, Oct 10 2002. ISSN 0020-7136 (Print)0020-7136. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.10635> >.
- 31 NAWA, T. et al. Differences between right- and left-sided colon cancer in patient characteristics, cancer morphology and histology. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 23, n. 3, p. 418-23, Mar 2008. ISSN 0815-9319. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1746.2007.04923.x> >.
- 32 GARBORG, K. Colorectal Cancer Screening. **Surg Clin North Am**, v. 95, n. 5, p. 979-89, Oct 2015. ISSN 0039-6109. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.suc.2015.05.007> >.
- 33 INCA. INCA - Instituto Nacional de Cancer - Estimativa 2016. 2016. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/> >.
- 34 EL ZOGHBI, M.; CUMMINGS, L. C. New era of colorectal cancer screening. **World J Gastrointest Endosc**, v. 8, n. 5, p. 252-8, Mar 10 2016. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4253/wjge.v8.i5.252> >.

- 35 FAVORITI, P. et al. Worldwide burden of colorectal cancer: a review. **Updates Surg**, v. 68, n. 1, p. 7-11, 2016. ISSN 2038-131x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s13304-016-0359-y> >.
- 36 CRAVO, M. et al. BAT-26 identifies sporadic colorectal cancers with mutator phenotype: a correlative study with clinico-pathological features and mutations in mismatch repair genes. **J Pathol**, v. 188, n. 3, p. 252-7, Jul 1999. ISSN 0022-3417 (Print)0022-3417. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9896\(199907\)188:3<252::aid-path354>3.0.co](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1096-9896(199907)188:3<252::aid-path354>3.0.co) >.
- 37 CHAN, A. T.; GIOVANNUCCI, E. L. Primary Prevention of Colorectal Cancer. **Gastroenterology**, v. 138, n. 6, p. 2029-2043 e10, Jun 2010. ISSN 0016-5085 (Print)1528-0012 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.057> >.
- 38 SONG, M.; GARRETT, W. S.; CHAN, A. T. Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention. **Gastroenterology**, v. 148, n. 6, p. 1244-60.e16, May 2015. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2014.12.035> >.
- 39 CHAN, D. S. et al. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e20456, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0020456> >.
- 40 CROSS, A. J.; SINHA, R. Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer. **Environ Mol Mutagen**, v. 44, n. 1, p. 44-55, 2004. ISSN 0893-6692 (Print)0893-6692. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/em.20030> >.
- 41 MESSINA, C. R.; LANE, D. S.; ANDERSON, J. C. Body mass index and screening for colorectal cancer: gender and attitudinal factors. **Cancer Epidemiol**, v. 36, n. 4, p. 400-8, Aug 2012. ISSN 1877-7821. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.canep.2012.02.002> >.
- 42 WOLIN, K. Y. et al. Physical activity and colon cancer prevention: a meta-analysis. **Br J Cancer**, v. 100, n. 4, p. 611-6, Feb 24 2009. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6604917> >.
- 43 TARRAGA LOPEZ, P. J.; ALBERO, J. S.; RODRIGUEZ-MONTES, J. A. Primary and secondary prevention of colorectal cancer. **Clin Med Insights Gastroenterol**, v. 7, p. 33-46, 2014. ISSN 1179-5522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4137/CGast.S14039> >.
- 44 JURJUS, A. et al. Inflammatory bowel disease, colorectal cancer and type 2 diabetes mellitus: The links. **BBA Clin**, v. 5, p. 16-24, Jun 2016. ISSN 2214-6474. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbacli.2015.11.002> >.
- 45 ROSITO, M. A. **Manual de Coloproctologia**. Porto Alegre: Editora Livre, 2005. 296
- 46 SILVA, J. S. et al. Colorectal adenomas: risk factors for high-grade dysplasia. **Rev bras. coloproctol.**, v. 29, n. 2, p. 209-215, 06/2009 2009. ISSN 0101-9880. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0101-98802009000200008&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0101-98802009000200008&lng=en&nrm=iso&tlng=pt) >.

- 47 BONNINGTON, S. N.; RUTTER, M. D. Surveillance of colonic polyps: Are we getting it right? **World J Gastroenterol**, v. 22, n. 6, p. 1925-34, Feb 14 2016. ISSN 1007-9327. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v22.i6.1925> >.
- 48 WONG, W. M. et al. Histogenesis of human colorectal adenomas and hyperplastic polyps: the role of cell proliferation and crypt fission. **Gut**, v. 50, n. 2, p. 212-7, Feb 2002. ISSN 0017-5749 (Print)0017-5749. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 49 STRUM, W. B. Colorectal Adenomas. **N Engl J Med**, v. 374, n. 11, p. 1065-75, Mar 17 2016. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1513581> >.
- 50 GALLEGOS-OROZCO, J. F.; GURUDU, S. R. Complex Colon Polypectomy. **Gastroenterol Hepatol (N Y)**, v. 6, n. 6, p. 375-82, Jun 2010. ISSN 1554-7914 (Print). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 51 DISORDERS, T. W. W. O. I. GASTROLAB. Finland, Europe, 2016. Disponível em: < <http://www.kolumbus.fi/hans/gastrolab/e021.htm> >.
- 52 FEARON, E. R. Molecular genetics of colorectal cancer. **Annu Rev Pathol**, v. 6, p. 479-507, 2011. ISSN 1553-4006. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130235> >.
- 53 FEARON, E. R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v. 61, n. 5, p. 759-67, Jun 1990. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2188735> >.
- 54 KANTHAN, R.; SENGER, J. L.; KANTHAN, S. C. Molecular events in primary and metastatic colorectal carcinoma: a review. **Patholog Res Int**, v. 2012, p. 597497, 2012. ISSN 2042-003x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2012/597497> >.
- 55 PINO, M. S.; CHUNG, D. C. The chromosomal instability pathway in colon cancer. **Gastroenterology**, v. 138, n. 6, p. 2059-72, Jun 2010. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.065> >.
- 56 PUERTA-GARCIA, E.; CANADAS-GARRE, M.; CALLEJA-HERNANDEZ, M. A. Molecular biomarkers in colorectal carcinoma. **Pharmacogenomics**, p. 1-33, Aug 3 2015. ISSN 1462-2416. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2217/pgs.15.63> >.
- 57 ARMAGHANY, T. et al. Genetic Alterations in Colorectal Cancer. In: (Ed.). **Gastrointest Cancer Res**, v.5, 2012. p.19-27. ISBN 1934-7820 (Print)1934-7987 (Electronic).
- 58 PANCIONE, M.; REMO, A.; COLANTUONI, V. Genetic and epigenetic events generate multiple pathways in colorectal cancer progression. **Patholog Res Int**, v. 2012, p. 509348, 2012. ISSN 2042-003x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2012/509348> >.
- 59 YAMAGISHI, H. et al. Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers. In: (Ed.). **Chin J Cancer**, v.35, 2016. ISBN 1000-467X (Print)1944-446X (Electronic).



- 60 ZAUBER, P.; MAROTTA, S.; SABBATH-SOLITARE, M. Copy number of the Adenomatous Polyposis Coli gene is not always neutral in sporadic colorectal cancers with loss of heterozygosity for the gene. **BMC Cancer**, v. 16, n. 1, p. 213, 2016. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-016-2243-z> >.
- 61 TAKAYAMA, T. et al. Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. **Gastroenterology**, v. 121, n. 3, p. 599-611, Sep 2001. ISSN 0016-5085 (Print)0016-5085. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 62 HAMPEL, H. et al. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 35, p. 5783-8, Dec 10 2008. ISSN 0732-183x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2008.17.5950> >.
- 63 ARNOLD, C. N. et al. Molecular pathogenesis of colorectal cancer: implications for molecular diagnosis. **Cancer**, v. 104, n. 10, p. 2035-47, Nov 15 2005. ISSN 0008-543X (Print)0008-543x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.21462> >.
- 64 LAO, V. V.; GRADY, W. M. Epigenetics and colorectal cancer. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 8, n. 12, p. 686-700, Dec 2011. ISSN 1759-5045. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2011.173> >.
- 65 CRIDER, K. S. et al. Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role. **Adv Nutr**, v. 3, n. 1, p. 21-38, Jan 2012. ISSN 2161-8313. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3945/an.111.000992> >.
- 66 MATSUZAKI, K. et al. The relationship between global methylation level, loss of heterozygosity, and microsatellite instability in sporadic colorectal cancer. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 24 Pt 1, p. 8564-9, Dec 15 2005. ISSN 1078-0432 (Print)1078-0432. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-05-0859> >.
- 67 STAFF, M. C. Symptoms and causes - Colon cancer - Mayo Clinic. 2016. Disponível em: < <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/colon-cancer/symptoms-causes/dxc-20188239> >.
- 68 COHEN, S. S. et al. Obesity and colorectal cancer screening among black and white adults. **Cancer Causes Control**, v. 23, n. 5, p. 709-16, May 2012. ISSN 0957-5243 (Print)1573-7225 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10552-012-9940-y> >.
- 69 LIN, O. S.; KOZAREK, R. A.; CHA, J. M. Impact of Sigmoidoscopy and Colonoscopy on Colorectal Cancer Incidence and Mortality: An Evidence-Based Review of Published Prospective and Retrospective Studies. **Intestinal Res**, v. 12, n. 4, p. 268-74, Oct 2014. ISSN 1598-9100 (Print)2288-1956 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.5217/ir.2014.12.4.268> >.
- 70 (UK), N. C. C. F. C. The Diagnosis and Management of Colorectal Cancer. 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> >.
- 71 TORRES NETO, J. D. R. et al. Epidemiological aspects of colorectal polyps and flat adenomas. **Rev bras. colo-proctol.**, v. 30, n. 4, p. 419-429, 12/2010 2010. ISSN 0101-9880. Disponível em: <

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0101-802010000400006&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0101-802010000400006&lng=en&nrm=iso&tlng=pt) >.

- 72 WOLPIN, B. M.; MAYER, R. J. Systemic Treatment of Colorectal Cancer. **Gastroenterology**, v. 134, n. 5, p. 1296-310, May 2008. ISSN 0016-5085 (Print)1528-0012 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2008.02.098> >.
- 73 UENO, H. et al. Optimal colorectal cancer staging criteria in TNM classification. **J Clin Oncol**, v. 30, n. 13, p. 1519-26, May 1 2012. ISSN 0732-183x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2011.39.4692> >.
- 74 GREENE, F. L. TNM: our language of cancer. **CA Cancer J Clin**, v. 54, n. 3, p. 129-30, May-Jun 2004. ISSN 0007-9235 (Print)0007-9235. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 75 EDGE, S. B.; COMPTON, C. C. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. **Ann Surg Oncol**, v. 17, n. 6, p. 1471-4, Jun 2010. ISSN 1068-9265. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1245/s10434-010-0985-4> >.
- 76 LABIANCA, R. et al. Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol**, v. 24 Suppl 6, p. vi64-72, Oct 2013. ISSN 0923-7534. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdt354> >.
- 77 BOLAND, P. M.; FAKIH, M. The emerging role of neoadjuvant chemotherapy for rectal cancer. **J Gastrointest Oncol**, v. 5, n. 5, p. 362-73, Oct 2014. ISSN 2078-6891 (Print)2078-6891. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2078-6891.2014.060> >.
- 78 LIM, H. J. et al. Impact of Irinotecan and Oxaliplatin on Overall Survival in Patients With Metastatic Colorectal Cancer: A Population-Based Study. In: (Ed.). **J Oncol Pract**, v.5, 2009. p.153-8. ISBN 1554-7477 (Print)1935-469X (Electronic).
- 79 EDWARDS, M. S. et al. A systematic review of treatment guidelines for metastatic colorectal cancer. **Colorectal Dis**, v. 14, n. 2, p. e31-47, Feb 2012. ISSN 1462-8910. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-1318.2011.02765.x> >.
- 80 KOIDO, S. et al. Immunotherapy for colorectal cancer. **World J Gastroenterol**, v. 19, n. 46, p. 8531-42, 2013. ISSN 1007-9327 (Print). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v19.i46.8531> >.
- 81 CHENG, M. et al. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 10, n. 3, p. 230-252, 2013-04-22 2013. ISSN 1672-7681. Disponível em: < <http://www.nature.com/cmi/journal/v10/n3/full/cmi201310a.html> >.
- 82 HUANG, C. et al. Clinical comparison of laparoscopy vs open surgery in a radical operation for rectal cancer: A retrospective case-control study. **World J Gastroenterol**, v. 21, n. 48, p. 13532-41, Dec 28 2015. ISSN 1007-9327 (Print)2219-2840 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v21.i48.13532> >.

- 83 ZITVOGEL, L.; TESNIERE, A.; KROEMER, G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 10, p. 715-27, Oct 2006. ISSN 1474-1733 (Print)1474-1733. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nri1936> >.
- 84 NORTON, S. E. et al. Immune cell interplay in colorectal cancer prognosis. **World J Gastrointest Oncol**, v. 7, n. 10, p. 221-32, Oct 15 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4251/wjgo.v7.i10.221> >.
- 85 IWAYAMA, Y. et al. Prognostic value of HLA class I expression in patients with colorectal cancer. In: (Ed.). **World J Surg Oncol**, v.13, 2015. ISBN 1477-7819 (Electronic).
- 86 FINN, O. J. Cancer immunology. **N Engl J Med**, v. 358, n. 25, p. 2704-15, Jun 19 2008. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra072739> >.
- 87 DESCHOOLMEESTER, V. et al. Tumor infiltrating lymphocytes: an intriguing player in the survival of colorectal cancer patients. **BMC Immunol**, v. 11, p. 19, 2010. ISSN 1471-2172. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2172-11-19> >.
- 88 HAGERLING, C.; CASBON, A. J.; WERB, Z. Balancing the innate immune system in tumor development. **Trends Cell Biol**, v. 25, n. 4, p. 214-20, Apr 2015. ISSN 0962-8924 (Print)1879-3088 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2014.11.001> >.
- 89 WALDHAUER, I.; STEINLE, A. NK cells and cancer immunosurveillance. **Oncogene**, v. 27, n. 45, p. 5932-5943, 2008-10-06 2008. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.nature.com/onc/journal/v27/n45/full/onc2008267a.html> >.
- 90 PURDY, A. K.; CAMPBELL, K. S. Natural killer cells and cancer: regulation by the killer cell Ig-like receptors (KIR). **Cancer Biol Ther**, v. 8, n. 23, p. 2211-20, Dec 2009. ISSN 1555-8576. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19923897> >.
- 91 OEVERMANN, L. et al. KIR B haplotype donors confer a reduced risk for relapse after haploidentical transplantation in children with ALL. In: (Ed.). **Blood**, v.124, 2014. p.2744-7. ISBN 0006-4971 (Print)1528-0020 (Electronic).
- 92 IMPOLA, U. et al. Donor Haplotype B of NK KIR Receptor Reduces the Relapse Risk in HLA-Identical Sibling Hematopoietic Stem Cell Transplantation of AML Patients. **Front Immunol**, v. 5, p. 405, 2014. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00405> >.
- 93 HOTEIT, R. et al. KIR genotype distribution among Lebanese patients with Hodgkin's lymphoma. **Meta Gene**, v. 4, p. 57-63, Jun 2015. ISSN 2214-5400. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.mgene.2015.02.004> >.
- 94 SANDEL, M. H. et al. Natural killer cells infiltrating colorectal cancer and MHC class I expression. **Mol Immunol**, v. 42, n. 4, p. 541-6, Feb 2005. ISSN 0161-5890 (Print)0161-5890. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2004.07.039> >.

- 95 GILLGRASS, A.; ASHKAR, A. Stimulating natural killer cells to protect against cancer: recent developments. **Expert Rev Clin Immunol**, v. 7, n. 3, p. 367-82, May 2011. ISSN 1744-666x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1586/eci.10.102> >.
- 96 KIESSLING, R.; KLEIN, E.; WIGZELL, H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. **Eur J Immunol**, v. 5, n. 2, p. 112-7, Feb 1975. ISSN 0014-2980 (Print)0014-2980. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/eji.1830050208> >.
- 97 HERBERMAN, R. B.; NUNN, M. E.; LAVRIN, D. H. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. **Int J Cancer**, v. 16, n. 2, p. 216-29, Aug 15 1975. ISSN 0020-7136 (Print)0020-7136. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 98 ABUL K. ABBAS, A. H. L., SHIV PILLAI. **Imunologia Celular e Molecular**. 7a edição. Elsevier, 2012.
- 99 DI SANTO, J. P.; VOSSHENRICH, C. A. Bone marrow versus thymic pathways of natural killer cell development. **Immunol Rev**, v. 214, p. 35-46, Dec 2006. ISSN 0105-2896 (Print)0105-2896. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.2006.00461.x> >.
- 100 JOBIM, M.; JOBIM, L. F. J. Natural killer cells and immune surveillance. **J. Pediatr. (Rio J.)**, v. 84, n. 4, 08/2008 2008. ISSN 0021-7557. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0021-75572008000500009&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0021-75572008000500009&lng=en&nrm=iso&tlng=pt) >.
- 101 FARAG, S. S. et al. Biology and clinical impact of human natural killer cells. **Int J Hematol**, v. 78, n. 1, p. 7-17, Jul 2003. ISSN 0925-5710 (Print)0925-5710. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 102 ANFOSSI, N. et al. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. **Immunity**, v. 25, n. 2, p. 331-42, Aug 2006. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16901727> >.
- 103 SUN, J. C.; LANIER, L. L. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8(+) T cells. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 10, p. 645-57, Oct 2011. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nri3044> >.
- 104 KIM, S. et al. HLA alleles determine differences in human natural killer cell responsiveness and potency. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 8, p. 3053-8, Feb 26 2008. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0712229105> >.
- 105 LANGERS, I. et al. Natural killer cells: role in local tumor growth and metastasis. In: (Ed.). **Biologics**, v.6, 2012. p.73-82. ISBN 1177-5475 (Print)1177-5491 (Electronic).
- 106 CLEMENT, M. V. et al. Involvement of granzyme B and perforin gene expression in the lytic potential of human natural killer cells. **Res Immunol**, v. 141, n. 6, p. 477-89, Jul-Aug 1990. ISSN 0923-2494 (Print)0923-2494. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

- 107 ZAMAI, L. et al. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. **J Exp Med**, v. 188, n. 12, p. 2375-80, Dec 21 1998. ISSN 0022-1007 (Print)0022-1007. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 108 ARASE, H.; ARASE, N.; SAITO, T. Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells. **J Exp Med**, v. 181, n. 3, p. 1235-8, Mar 1995. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7532682> >.
- 109 TRINCHIERI, G. Natural killer cells wear different hats: effector cells of innate resistance and regulatory cells of adaptive immunity and of hematopoiesis. **Semin Immunol**, v. 7, n. 2, p. 83-8, Apr 1995. ISSN 1044-5323 (Print)1044-5323. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1006/smim.1995.0012> >.
- 110 COOPER, M. A.; FEHNIGER, T. A.; CALIGIURI, M. A. The biology of human natural killer-cell subsets. **Trends Immunol**, v. 22, n. 11, p. 633-40, Nov 2001. ISSN 1471-4906 (Print)1471-4906. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 111 COOPER, M. A. et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. **Blood**, v. 97, n. 10, p. 3146-51, May 2001. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11342442> >.
- 112 KESKIN, D. B. et al. TGFbeta promotes conversion of CD16+ peripheral blood NK cells into CD16- NK cells with similarities to decidual NK cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 9, p. 3378-83, Feb 2007. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17360654> >.
- 113 VIVIER, E. et al. Functions of natural killer cells. **Nat Immunol**, v. 9, n. 5, p. 503-10, May 2008. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ni1582> >.
- 114 TAKAHASHI, E. et al. Induction of CD16+ CD56bright NK cells with antitumour cytotoxicity not only from CD16- CD56bright NK Cells but also from CD16- CD56dim NK cells. **Scand J Immunol**, v. 65, n. 2, p. 126-38, Feb 2007. ISSN 0300-9475. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17257217> >.
- 115 BAUER, S. et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. **Science**, v. 285, n. 5428, p. 727-9, Jul 1999. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10426993> >.
- 116 BROWN, D.; TROWSDALE, J.; ALLEN, R. The LILR family: modulators of innate and adaptive immune pathways in health and disease. **Tissue Antigens**, v. 64, n. 3, p. 215-25, Sep 2004. ISSN 0001-2815. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15304001> >.
- 117 BOYTON, R. J.; ALTMANN, D. M. Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptors and human leucocyte antigen class I in disease. **Clin Exp Immunol**, v. 149, n. 1, p. 1-8, Jul 2007. ISSN 0009-9104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17521317> >.
- 118 LANIER, L. L. NK cell recognition. **Annu Rev Immunol**, v. 23, p. 225-74, 2005. ISSN 0732-0582 (Print)0732-0582. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115526> >.

- 119 FREUD, A. G.; CALIGIURI, M. A. Human natural killer cell development. **Immunol Rev**, v. 214, p. 56-72, Dec 2006. ISSN 0105-2896 (Print)0105-2896. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.2006.00451.x> >.
- 120 BIASSONI, R. et al. Human natural killer cell receptors: insights into their molecular function and structure. **J Cell Mol Med**, v. 7, n. 4, p. 376-87, 2003 Oct-Dec 2003. ISSN 1582-1838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14754506> >.
- 121 MIDDLETON, D.; GONZALEZ, F. The extensive polymorphism of KIR genes. **Immunology**, v. 129, n. 1, p. 8-19, Jan 2010. ISSN 0019-2805 (Print)1365-2567 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03208.x> >.
- 122 SUN, P. D. Structure and function of natural-killer-cell receptors. **Immunol Res**, v. 27, n. 2-3, p. 539-48, 2003. ISSN 0257-277X (Print)0257-277x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1385/ir:27:2-3:539> >.
- 123 PARHAM, P. Influence of KIR diversity on human immunity. **Adv Exp Med Biol**, v. 560, p. 47-50, 2005. ISSN 0065-2598 (Print)0065-2598. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1007/0-387-24180-9\\_6](http://dx.doi.org/10.1007/0-387-24180-9_6) >.
- 124 MARSH, S. G. et al. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. **Immunogenetics**, v. 55, n. 4, p. 220-6, Jul 2003. ISSN 0093-7711 (Print)0093-7711. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00251-003-0571-z> >.
- 125 LONG, E. O. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. **Annu Rev Immunol**, v. 17, p. 875-904, 1999. ISSN 0732-0582 (Print)0732-0582. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.875> >.
- 126 ISAKOV, N. Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), a unique module linking antigen and Fc receptors to their signaling cascades. **J Leukoc Biol**, v. 61, n. 1, p. 6-16, Jan 1997. ISSN 0741-5400 (Print)0741-5400. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 127 CAMPBELL, K. S. et al. Tyrosine phosphorylation of a human killer inhibitory receptor recruits protein tyrosine phosphatase 1C. **J Exp Med**, v. 184, n. 1, p. 93-100, Jul 1996. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8691154> >.
- 128 BINSTADT, B. A. et al. Sequential involvement of Lck and SHP-1 with MHC-recognizing receptors on NK cells inhibits FcR-initiated tyrosine kinase activation. **Immunity**, v. 5, n. 6, p. 629-38, Dec 1996. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8986721> >.
- 129 LANIER, L. L. et al. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. **Nature**, v. 391, n. 6668, p. 703-7, Feb 12 1998. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/35642> >.
- 130 CAMPBELL, K. S.; HASEGAWA, J. Natural killer cell biology: an update and future directions. **J Allergy Clin Immunol**, v. 132, n. 3, p. 536-44, Sep 2013. ISSN 1097-6825. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23906377> >.



- 131 ROBINSON, J. et al. IPD—the Immuno Polymorphism Database. In: (Ed.). **Nucleic Acids Res**, v.38, 2010. p.D863-9. ISBN 0305-1048 (Print)1362-4962 (Electronic).
- 132 UHRBERG, M. The KIR gene family: life in the fast lane of evolution. **Eur J Immunol**, v. 35, n. 1, p. 10-5, Jan 2005. ISSN 0014-2980 (Print)0014-2980. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200425743> >.
- 133 HSU, K. C. et al. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. **Immunol Rev**, v. 190, p. 40-52, Dec 2002. ISSN 0105-2896. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12493005> >.
- 134 MAXWELL, L. D. et al. A common KIR2DS4 deletion variant in the human that predicts a soluble KIR molecule analogous to the KIR1D molecule observed in the rhesus monkey. **Tissue Antigens**, v. 60, n. 3, p. 254-8, Sep 2002. ISSN 0001-2815 (Print)0001-2815. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 135 RAJALINGAM, R. et al. Short KIR haplotypes in pygmy chimpanzee (Bonobo) resemble the conserved framework of diverse human KIR haplotypes. **J Exp Med**, v. 193, n. 1, p. 135-46, Jan 2001. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11136827> >.
- 136 UHRBERG, M.; PARHAM, P.; WERNET, P. Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. **Immunogenetics**, v. 54, n. 4, p. 221-9, Jul 2002. ISSN 0093-7711 (Print)0093-7711. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00251-002-0463-7> >.
- 137 LI, H. et al. Genetic control of variegated KIR gene expression: polymorphisms of the bi-directional KIR3DL1 promoter are associated with distinct frequencies of gene expression. **PLoS Genet**, v. 4, n. 11, p. e1000254, Nov 2008. ISSN 1553-7390. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000254> >.
- 138 STEWART, C. A. et al. Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 37, p. 13224-9, Sep 2005. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16141329> >.
- 139 LI, X. C.; RAGHAVAN, M. Structure and function of major histocompatibility complex class I antigens. **Curr Opin Organ Transplant**, v. 15, n. 4, p. 499-504, Aug 2010. ISSN 1087-2418. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/MOT.0b013e32833bfb33> >.
- 140 WINTER, C. C.; LONG, E. O. A single amino acid in the p58 killer cell inhibitory receptor controls the ability of natural killer cells to discriminate between the two groups of HLA-C allotypes. **J Immunol**, v. 158, n. 9, p. 4026-8, May 1997. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9126959> >.
- 141 BIASSONI, R. et al. Amino acid substitutions can influence the natural killer (NK)-mediated recognition of HLA-C molecules. Role of serine-77 and lysine-80 in the target cell protection from lysis mediated by "group 2" or "group 1" NK clones. **J Exp Med**, v. 182, n. 2, p. 605-9, Aug 1995. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7629517> >.

- 142 O'CONNOR, G. M. et al. Functional polymorphism of the KIR3DL1/S1 receptor on human NK cells. **J Immunol**, v. 178, n. 1, p. 235-41, Jan 2007. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17182560> >.
- 143 GUMPERZ, J. E. et al. The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor. **J Exp Med**, v. 181, n. 3, p. 1133-44, Mar 1995. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7532677> >.
- 144 KHAKOO, S. I.; CARRINGTON, M. KIR and disease: a model system or system of models? **Immunol Rev**, v. 214, p. 186-201, Dec 2006. ISSN 0105-2896 (Print)0105-2896. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.2006.00459.x> >.
- 145 PARHAM, P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 3, p. 201-14, Mar 2005. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15719024> >.
- 146 RAJAGOPALAN, S.; LONG, E. O. Understanding how combinations of HLA and KIR genes influence disease. **J Exp Med**, v. 201, n. 7, p. 1025-9, Apr 4 2005. ISSN 0022-1007 (Print)0022-1007. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20050499> >.



## **7. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS**

Artigo submetido na Revista *Human Immunology*.

## KIR genes and HLA class I ligands in colorectal cancer

Pâmela Portela<sup>a,b,\*</sup>, Joice Merzoni<sup>a</sup>, Juliana D. Lindenau<sup>c</sup>, Daniel C. Damin<sup>d</sup>, Timothy John Wilson<sup>a</sup>, Rafael Roesler<sup>b,e</sup>, Gilberto Schwartzmann<sup>b,e,f</sup>, Luiz Fernando Jobim<sup>a,f</sup>  
Mariana Jobim<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Department of Immunology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>b</sup> *Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>c</sup> *Department of Genetic, Institute of Biosciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>d</sup> *Division of Coloproctology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>e</sup> *Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>f</sup> *Department of Internal Medicine, School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil*

\* Corresponding author at: Department of Immunology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos 2350, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil.

*E-mail:* [pamesilva@hcpa.edu.br](mailto:pamesilva@hcpa.edu.br); [pportelas@gmail.com](mailto:pportelas@gmail.com) (P. Portela).

## ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) can occur anywhere in the colon or rectum and represents the third most common cancer in the world in both sexes. Natural killer cells (NK) are part of the innate immune system recognizing class I HLA molecules on target cells through their membrane receptors, called killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR). The aim of our study was to evaluate the association between the KIR genes and HLA ligands in patients with colorectal cancer and healthy controls. We examined the polymorphism of 16 KIR genes and their HLA ligands in 154 caucasoid CRC patients and 216 controls. When both groups were compared, no significant differences were found for HLA ligands and KIR genes after Bonferroni correction. However, the Bx group genotypes (heterozygous and homozygous for the haplotype B) were more frequent in controls, when compared with patients. These findings suggest that individuals with Bx genotypes could have some protection to colorectal cancer. The hypothesis is not related with the presence of a special KIR gene and HLA ligand related to the disease, but to the presence of several activating genes in the individuals with no better action of one in relation to other.

### *Keywords:*

Human leukocyte antigen

Natural killer cell

Killer cell immunoglobulin-like receptor

Colorectal cancer

## 1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer in both sexes worldwide [1,2]. An individual without family history and with more than of 50 years has the risk of 5-6% to develop CRC. This risk increases about 20% in people with a close relative diagnosed with the disease. In families with hereditary colorectal cancer syndromes, such as in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) and familial adenomatous polyposis (FAP) this risk increases to more than 80% [3]. Approximately 75% of CRCs are sporadic and occur in people without genetic predisposition or family history of CRC [4,5].

CRC develops through a multistep process in which genetic and epigenetic alterations accumulate in a sequential order [4]. The molecular evolution of the tumor could be based on the model proposed by Fearon and Vogelstein [6]. They described it as a stepwise normal-adenoma-cancer progression which considers adenomatous polyps as the principal pre-neoplastic lesions leading to CRC [7].

Many authors have suggested the existence of multiple pathways for carcinogenesis. Three main mechanisms contributing to carcinogenesis have been proposed: microsatellite instability (MSI), chromosomal instability (CIN) and CpG islands methylator phenotype (CIMP) [8]. Somatic mutations in APC, BRAF, KRAS, PIK3CA, TP53 have also been frequently observed in CRC [9].

Immune cell infiltration is a common feature of many human solid tumors. In colorectal cancer lymphocyte infiltration has been described and is more marked in

MSI-positive tumors [10]. Immune responses against colorectal tumors can be detected in early stage cancers, indicating that the immune system is capable of recognizing a tumor. However, the tumors produces molecules that inhibit immune cell infiltration, that reduce activity of immune cells, or change the phenotype of immune cells to a less effective anti-tumor function, ultimately allowing tumor outgrowth [11]. The reduction or even total loss of HLA (Human Leukocyte Antigen) class I expression is well-documented and several different molecular mechanisms can account for this phenomenon [12]. The downregulation of HLA expression is believed to be a mechanism whereby the tumor can evade the role of HLA molecules in presenting peptides to T cells in the adaptive immune system [13].

HLA class I molecules act as ligands for killer immunoglobulin-like receptors (KIR), which are present on natural killer (NK) cells and on a proportion of T lymphocytes [13]. NK cells comprise 10-15% of peripheral blood lymphocytes and are defined as CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> [14]. They are a component of the innate immune system and play a role in the defense against tumor transforming cells or certain viruses. NK-cell function is finely tuned by KIR receptors that transduce inhibitory or activating signals. Inhibitory KIR molecules bind to target cell HLA class I molecules and prevent the attack of NK [15,16]. When receptors KIR fail in binding to its ligands, activating signals are generated leading to the destruction of target cells [17].

The KIR genes form a multigene family as part of the leukocyte receptor complex (LRC) on the long arm of chromosome 19q13.4 [18]. Thus far, 15 KIR genes (2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL5A, 2DL5B 3DL1, 3DL2, 3DL3, 2DL4, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4,

2DS5, 2DS5 and 3DS1), and two pseudogenes (2DP1 and 3DP1) have been described [19,20]. Of these, four KIR genes (3DL3, 3DP1, 2DL4, 3DL2) are always present and are considered “framework” genes [21].

Two main groups of KIR haplotypes exist with different combination in types of KIR genes in human populations [22]. Group A haplotype is defined by the presence of the inhibitory genes KIR3DL3, KIR2DL3, KIR2DL1, KIR2DL4, KIR3DL1, KIR3DL2 and a single activating gene KIR2DS4. In contrast, group B haplotypes are more variable and characterized by the presence of more than one activating KIR gene [23,24].

The A and B KIR haplotypes were distributed into three distinct genotype groups: AA (homozygote), BB (homozygote), and AB (heterozygote). The AB and BB groups were previously referred together as KIR group Bx [25]. Presently this list consists of 573 different KIR genotypes found in 18,783 individuals from 155 populations [26].

Several studies have verified the KIR diversity in different populations. A study with Caucasian population of Southern Brazil showed that distribution KIR haplotype A (59%) was more frequent as compared to haplotype B (41%). Thirty-two genotypes were identified and the most common one was AA (genotype 1, which corresponds to the homozygous haplotype A) [27]. In recent study with Saudi population, was observed the occurrence of 55 different KIR genotypes. The homozygote AA referenced as genotype 1 also was the most frequent [28].

The ligands for KIR are the classical HLA class I molecules HLA-A, -B and -C [29]. Based on the dimorphism in the epitope at position 80, all HLA-C alleles can be divided into two groups: the C1 group carrying asparagine, and the C2 group carrying lysine at this position. The C1 group consists of HLA-Cw1, -Cw3, -Cw7, -Cw8, -Cw13, -Cw14.

The C2 group consists of HLA-Cw2, -Cw4, -Cw5, -Cw6, -Cw17, -Cw18. The receptors KIR2DL2, 2DL3 and 2DS2 bind HLA-C1 ligands, whereas KIR2DL1 and 2DS1 bind HLA-C2 ligands [30]. The inhibitory KIR3DL1 recognizes HLA-B Bw4 allotypes and KIR3DL2 binds HLA-A3 and HLA-A11 [31].

A wide array of studies have reported associations between distinct KIR/HLA compound genotypes with susceptibility or resistance to viral infections (Hepatitis C, HIV), autoimmune or chronic inflammatory diseases (scleroderma, psoriasis, diabetes), and conditions affecting the outcome of pregnancy (spontaneous abortion and pre-eclampsia) [32]. In terms of the solid tumors, there have been studies of colon cancer, bladder cancer, renal cancer, lung cancer, laryngeal cancer, prostate cancer, breast cancer and cervical cancer [13,29,33,34].

Some studies focusing on the relationship between colorectal cancer with the polymorphism of KIR genes have been described. So far, studies have provided contradictory results [2,13,34,35].

In the present study, we examined the frequencies of KIR receptors and HLA ligands in CRC patients and healthy controls. The aim was the identification of KIR genotypes and HLA ligands patterns that could be associated with disease susceptibility. To the best of our knowledge, this is the first study of KIR genes and HLA ligands in a Brazilian CRC caucasoid population.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Study population*

This study was performed using the peripheral blood of Brazilian caucasoid CRC patients and normal caucasoid control group from the Departments of Coloproctology of our University Hospital (Hospital de Clínicas de Porto Alegre). To analyze the combination of KIR genotypes and HLA ligands, 154 patients with CRC and 216 healthy controls without cancer history were studied. Gender, age and geography were matched between the groups. This study was approved by the Institutional Research Ethics Committee, and all patients signed an informed consent for participating in this study.

### *2.2. KIR typing*

Blood samples were collected into tubes containing EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid). DNA was extracted using a modified salting-out procedure [36]. The KIR genes were determined by polymerase chain reaction using sequence-specific oligonucleotide (PCR-SSO). The KIR SSO Genotyping Test applies Luminex technology (One-Lambda Inc, Canoga Park, CA, USA). The test was performed according to the manufacturer's instructions. The presence or absence of the following 16 KIR genes were identified: KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5,



KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR3DS1, KIR2DP1 and KIR3DP1.

### *2.3. HLA typing*

HLA-Cw analysis was performed using the PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP), as described by Jones et al. [37]. The results of the HLA-C typing were separated into two groups: HLA-C group 1 (C1), consisting of HLA-C 01, 03, 07 (01–06), 08, 12 (02, 03, 06), 14, 16 (01, 03, 04) and HLA-C group 2 (C2) consisting of HLA-C 02, 04, 05, 06, 0707, 12 (04, 05), 15, 1602, 17, 18. HLA-Bw4, HLA-A3 and HLA-A11 were also performed using PCR-SSP technique as described by Bunce et al. [38].

### *2.4. Statistical analysis*

Mean age was compared between the groups through T test, while gender were compared by Chi-Square test. The associations among KIR and their ligands with colorectal cancer were evaluated using odds ratios (OR) estimated by logistic binary regression. All markers with a  $P < 0.2$  in the univariate analyses were analyzed in a multivariate logistic regression, with age as covariates.  $P < 0.05$  was considered significant. Statistical analyses were performed using SPSS for Windows v18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The number of genes used was adjusted by the Bonferroni correction.

### 3. Results and discussion

NK cells have been considered important in protecting patients from the early development of cancer and its progression [39]. HLA class I molecules are recognized by NK cells, through KIR receptors, and have a central role in the anti-cancer immune surveillance [40,41]. Taking into account the varied expression of KIR genes in every NK cell, has been described that some NK cell clones are capable of lysing tumour cells [34].

We studied a total of 154 colorectal cancer patients. The location of the tumor was the rectum in 83 patients (53.9%), right-colon in 16 patients (10.4%) and left-colon in 55 patients (35.7%). The mean age of the patients was  $62.4 \pm 11.4$ , which was higher than that observed among the healthy subjects ( $58.9 \pm 9.6$ ). These means were statistically different ( $p=0.002$ ).

The control group was composed of 129 men (59.7%) and 87 women (40.3%) while the patient group was composed of 87 men (56.5%) and 67 women (43.5%). Sex was not statistically different among the groups ( $p=0.593$ ).

The distribution of KIR and HLA ligands frequencies for cases and controls is shown in Tables 1 and 2. In general, no significant differences in the frequencies of KIR genes and HLA ligands were observed among cases and controls. Table 3 display the different correlations evaluated between the different KIR genes and their respective HLA ligands, and likewise there are no significant differences.

We found significant results when analyzed KIR genotypes. The table 4 shows Bx group more frequent in controls when compared with patients (78.2% vs 64.3%; OR:

0.511; 95% CI: 0.319-0.815;  $p=0.005$ ). Considering that combinations of several activating genes are typically found in Bx group [42], we hypothesized that the KIR activating function could exhibit some protection effect for colorectal cancer.

A recent study with acute lymphoblastic leukemia, show that donors with KIR B haplotype confer a reduced risk for relapse after haploidentical transplantation in children [43]. Other study in adults with acute myeloid leukemia also showed that donors with KIR B haplotype have a lower occurrence of relapse in transplantation [44]. These results suggest the selection of donors with KIR B haplotype may be beneficial for patients, suggesting possible protection by NK cells.

The evolutionary peculiarities of the KIR gene family, the high degree of genetic polymorphism and the crucial function of KIR in immunity stimulated the search for implications of their variability. The frequencies of individual KIR genes and haplotypes differ among populations, possibly due to the influence of different forms of natural selection and of demographic contingencies [45].

The diversity in gene content of KIR haplotypes and the extensive polymorphism of HLA and KIR genes make it possible for an individual to express KIR genes for which there are no HLA ligands and vice versa, which thus determines extremely variable immunogenetic profiles among individuals [46].

Studies have shown that loss of HLA class I expression is quite common in colorectal cancer and that these patients show a survival benefit [47]. Furthermore, another study found that patients with primary tumors showing loss of HLA class I expression developed fewer distant metastases. Therefore, it is possible that the

survival benefit is due to the fact that metastasis tumor cells in these patients are efficiently cleared by NK cells in the circulation [48].

In several human cancers, including colorectal and gastric cancer, the presence of intratumoral NK cells is a positive clinical factor. Many tumor cell lines derived from human tumors are susceptible to NK cell killing, and a recent study suggests that NK cells are even capable of killing melanoma cells that have cancer stem cell characteristics [49].

In this study, we analyzed the role of KIR genes and their HLA ligands C1 and C2 groups, HLA-A3, HLA-A11 and HLA-Bw4 in patients with colorectal cancer and controls. However, our results did not remain significant after the Bonferroni correction for multiple comparisons. It's important to note, that the literature shows some studies with conflicting results.

In a recent study in Korean population, the colorectal cancer group (N=241) was divided into a colon cancer and a rectal cancer groups and compared to the control group (N=159). In the colon cancer group, the frequency of KIR2DS5 ( $p < 0.02$ , OR=1.91) was higher than in the control group. In the rectal cancer group, the frequency of KIR2DS5 ( $p < 0.03$ , OR=1.88) was also higher than in the control group. The frequencies of KIR3DL1 ( $p < 0.05$ , OR=0.26), KIR2DS2 ( $p < 0.01$ , OR=0.35) and KIR2DS4 ( $p < 0.05$ , OR=0.26) were significantly lower than in the control group. These results suggest that KIR3DL1, KIR2DS2, and KIR2DS4 has protective effects and KIR2DS5 has risk for disease [2]. However, this study did not apply correction for multiple comparisons, which may affect the results.

Other study with Saudi population examined a total of 52 patients with different stages of malignant CRC as well as 70 healthy controls. They demonstrated that activating KIR genes are significantly more prevalent in the CRC patient group. The highest difference was observed for KIR3DS1 ( $p < 0.00001$ , OR=16.25), KIR2DS1 ( $p < 0.0001$ , OR=8.6) and KIR2DS5 ( $p < 0.0001$ , OR=4.5), suggesting risk for disease [35]. Although the odds ratio is higher, the study used a small sample and did not apply correction for multiple comparisons, which could affect the results.

In addition to the studies described, there are other studies that not found significant associations with CRC and KIR genes. A report of 2007, in a group of patients with laryngeal, bladder and colorectal cancers, showed a significant difference in the frequency of the KIR genes, KIR3DL1 and KIR2DS4 in patients with bladder tumour, before correction for the number of comparisons made, but found no significant differences in any KIR gene frequency in patients with colorectal and laryngeal tumour [13]. Also, Omar et al. found no statistically significant difference in KIR genes between groups of various solid tumor patients (non-small-cell lung cancer, small cell lung cancer, colon, and kidney cancer patients) compared with control subjects [34].

In conclusion, the results of our study indicate that there are no specific and significant differences in the frequency of KIR genes and HLA class I ligands among patients with colorectal cancer and healthy controls after Bonferroni correction.

Previous studies with colorectal cancer found significant associations between KIR/HLA genes. However, no correction for multiple comparisons was applied in these studies, despite a large number of comparisons performed. Probably the associations

observed in these studies did not remain significant after correction, as observed in our study.

We found a significant association between Bx group genotypes in the control group, suggesting that the presence of more activating KIR genes in Bx group, could have some value in the protection for colorectal cancer. Our results point to the hypothesis that NK action against cells from CRC and probably to other pathologies could not be related to a specific and significant association between some KIR/HLA ligands and the diseases, but with the simple presence of a broad spectrum of several activating genes and receptors in the NK cell membranes. The NK cells are important tools against several diseases and it could be a mistake to believe in a principle that we must find a single or few KIR genes/receptors significantly related to them. Further studies to confirm this observation are necessary.

## **Disclosures**

The authors state no conflict of interest.

## **Acknowledgments**

This study was supported by Department of Immunology, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Brazil. G.S. and R.R. are supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the South American Office for Anticancer Drug Development (SOAD; Porto Alegre, Brazil).

## References

- [1] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, Cancer statistics, 2015, *CA Cancer J. Clin.* 65 (2015) 5-29.
- [2] H.J. Kim et al., HLA-Cw polymorphism and killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene analysis in Korean colorectal cancer patients, *Int. J. Surg.* 12 (2014) 815-20.
- [3] A.K. Rustgi, The genetics of hereditary colon cancer, *Genes Dev.* 21 (2007) 2525-38.
- [4] M. Pancione, A. Remo, V. Colantuoni, Genetic and epigenetic events generate multiple pathways in colorectal cancer progression, *Patholog. Res. Int.* (2012).
- [5] H. Yamagishi, et al., Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancer, *Chin. J. Cancer* (2016) 35:4.
- [6] E.R. Fearon, B. Vogelstein, A genetic model for colorectal tumorigenesis, *Cell.* 61 (1990) 759-67.
- [7] Y. Okugawa, W.M. Grady, A. Goel, Epigenetic Alterations in Colorectal Cancer: Emerging Biomarkers, *Gastroenterology* 149 (2015) 1204-1225.
- [8] J.M. Kocarnik, S. Shiovitz, A.I. Phipps, Molecular phenotypes of colorectal cancer and potential clinical applications, *Gastroenterol. Rep.* 3 (2015) 269–276.
- [9] T. Hinoue, et al., Genome-scale analysis of aberrant DNA methylation in colorectal cancer, *Genome Res.* 22 (2012) 271-82.
- [10] v. Deschoolmeester, et al., Tumor infiltrating lymphocytes: an intriguing player in the survival of colorectal cancer patients, *BMC Immunol.* (2010) 11:19.
- [11] S.E. Norton et al., Immune cell interplay in colorectal cancer prognosis, *World J. Gastrointest. Oncol.* 7 (2015) 221-32.
- [12] P. Dalerba, et al., Immunology and immunotherapy of colorectal cancer, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 46 (2003) 33-57.
- [13] D. Middleton, et al., Analysis of KIR gene frequencies in HLA class I characterised bladder, colorectal and laryngeal tumours, *Tissue Antigens* 69 (2007) 220-6.
- [14] M. Cheng, et al., NK cell-based immunotherapy for malignant diseases, *Cellular & Molecular Immunology* 10 (2013) 230-252.
- [15] R. J. Boyton, D.M. Altmann, Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptors and human leucocyte antigen class I in disease, *Clin. Exp. Immunol.* 149 (2007) 1-8.
- [16] G. Pittari, et al., Revving up Natural Killer Cells and Cytokine-Induced Killer Cells Against Hematological Malignancies, *Front. Immunol.* 6 (2015) 230.
- [17] C.A. Stewart, et al., Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (2005) 13224-9.
- [18] S.I. Khakoo, M. Carrington, KIR and disease: a model system or system of models?, *Immunol. Rev.* 214 (2006) 186-201.
- [19] R. Biassoni, et al., The human leukocyte antigen (HLA)-C-specific "activatory" or "inhibitory" natural killer cell receptors display highly homologous extracellular domains but differ in their transmembrane and intracytoplasmic portions, *J. Exp. Med.* 183 (1996) 645-50.

- [20] P. Parham, Influence of KIR diversity on human immunity, *Adv. Exp. Med. Biol.* 560 (2005) 47-50.
- [21] R. Rajalingam, et al., Short KIR haplotypes in pygmy chimpanzee (Bonobo) resemble the conserved framework of diverse human KIR haplotypes, *J. Exp. Med.* 193 (2001) 135-46.
- [22] M. Uhrberg, The KIR gene family: life in the fast lane of evolution, *Eur. J. Immunol.* 35 (2005) 10-5.
- [23] M. Uhrberg, et al., Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes, *Immunity* 7 (1997) 753-63.
- [24] K.C. Hsu, et al., The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism, *Immunol. Rev.* 190 (2002) 40-52.
- [25] K.L. McQueen, et al., Donor-recipient combinations of group A and B KIR haplotypes and HLA class I ligand affect the outcome of HLA-matched, sibling donor hematopoietic cell transplantation, *Hum. Immunol.* 68 (2007) 309-23.
- [26] F.F. Gonzalez-Galarza, et al., Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations, *Nucleic. Acids. Res.* 43 (2015) 784-8.
- [27] M. Jobim, et al., Killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity in a Caucasian population of southern Brazil, *Int. J. Immunogenet.* 37 (2010) 83-9.
- [28] S.Y.A. Omar, et al., Genotypic diversity of the Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR) and their HLA class I Ligands in a Saudi population, *Genet. Mol. Biol.* 39 (2016) 14-23.
- [29] M.R. Jobim, et al., Analysis of KIR gene frequencies and HLA class I genotypes in breast cancer and control group, *Hum. Immunol.* 74 (2013) 1130-3.
- [30] C.C. Winter, E.O. Long, A single amino acid in the p58 killer cell inhibitory receptor controls the ability of natural killer cells to discriminate between the two groups of HLA-C allotypes, *J. Immunol.* 158 (1997) 4026-8.
- [31] G.M. O'Connor, et al., Functional polymorphism of the KIR3DL1/S1 receptor on human NK cells, *J. Immunol.* 178 (2007) 235-41.
- [32] A.K. Purdy, K.S. Campbell, Natural killer cells and cancer: regulation by the killer cell Ig-like receptors (KIR), *Cancer Biol. Ther.* 8 (2009) 2211-20.
- [33] P. Portela, et al., Analysis of KIR gene frequencies and HLA class I genotypes in prostate cancer and control group, *Int. J. Immunogenet.* 39 (2012) 423-8.
- [34] S. Al Omar, et al., Associations between genes for killer immunoglobulin-like receptors and their ligands in patients with solid tumors, *Hum. Immunol.* 71 (2010) 976-81.
- [35] S.Y. Al Omar, et al., The Relationship Between Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptors and HLA-C Polymorphisms in Colorectal Cancer in a Saudi Population, *Genet. Test. Mol. Biomarkers* 19 (2015) 617-22.
- [36] S.A. Miller, D.D. Dykes, H.F. Polesky, A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 1215.
- [37] D.C. Jones, et al., Killer Ig-like receptor (KIR) genotype and HLA ligand combinations in ulcerative colitis susceptibility, *Genes Immun.* 7 (2006). 576-82.



- [38] M. Bunce, et al., Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP), *Tissue Antigens* 46 (1995) 355-67.
- [39] Y. Xu, et al., Decrease in natural killer cell associated gene expression as a major characteristic of the immune status in the bloodstream of colorectal cancer patients, *Cancer Biol. Ther.* 11 (2011) 188-95.
- [40] A. Townsend, H. Bodmer, Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes, *Annu. Rev. Immunol.* 7 (1989) 601-24.
- [41] Y. Iwayama, et al., Prognostic value of HLA class I expression in patients with colorectal cancer, *World J. Surg. Oncol.* (2015) 13:36.
- [42] D. Middleton, F. Gonzelez, The extensive polymorphism of KIR genes, *Immunology* 129 (2010) 8-19.
- [43] L. Oevermann, et al., KIR B haplotype donors confer a reduced risk for relapse after haploidentical transplantation in children with ALL, *Blood* 124 (2014) 2744-7.
- [44] U. Impola, et al., Donor Haplotype B of NK KIR Receptor Reduces the Relapse Risk in HLA-Identical Sibling Hematopoietic Stem Cell Transplantation of AML Patients, *Front. Immunol.* 5 (2014) 405.
- [45] D.G. Augusto, et al., KIR gene content in amerindians indicates influence of demographic factors, *PLoS One* 8 (2013) e56755.
- [46] P. Parham, MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival, *Nat. Rev. Immunol.* 5 (2005) 201-14.
- [47] M.H. Sandel, et al., Natural killer cells infiltrating colorectal cancer and MHC class I expression, *Mol. Immunol.* 42 (2005) 541-6.
- [48] A.G. Menon, et al., p53 and HLA class-I expression are not down-regulated in colorectal cancer liver metastases, *Clin. Exp. Metastasis* 21 (2004) 79-85.
- [49] A. Gillgrass, A. Ashkar, Stimulating natural killer cells to protect against cancer: recent developments, *Expert Rev. Clin. Immunol.* 7 (2011) 367-82.

**Table 1** Genetic association between KIR gene and colorectal cancer.

KIR Gene	Controls N (%)	Patients N (%)	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)*	P-value*	P-value**
2DL1	207 (95.8)	148 (96.1)	1.072 (0.379-3.260)	0.896			
2DL2	119 (55.1)	72 (46.8)	0.716 (0.472-1.083)	0.113	0.722 (0.474-1.099)	0.128	0.640
2DL3	187 (86.6)	140 (90.9)	1.551 (0.803-3.125)	0.194	1.442 (0.738-2.931)	0.288	0.999
2DL4	216 (100.0)	154 (100.0)					
2DL5	127 (58.8)	75 (48.7)	0.665 (0.438-1.008)	0.055	0.684 (0.448-1.042)	0.077	0.385
3DL1	204 (94.4)	138 (89.6)	0.507 (0.228-1.100)	0.086	0.537 (0.238-1.182)	0.122	0.610
3DL2	216 (100.0)	154 (100.0)					
3DL3	216 (100.0)	154 (100.0)					
2DS1	92 (42.6)	62 (40.3)	0.908 (0.596-1.381)	0.653			
2DS2	112 (51.9)	71 (46.1)	0.794 (0.524-1.201)	0.276			
2DS3	70 (32.4)	41 (26.6)	0.757 (0.477-1.191)	0.230			
2DS4	207 (95.8)	138 (89.6)	0.375 (0.155-0.856)	<b>0.020</b>	0.409 (0.167-0.948)	<b>0.037</b>	0.185
2DS5	87 (40.3)	56 (36.4)	0.847 (0.552-1.296)	0.445			
2DP1	216 (100.0)	154 (100.0)					
3DS1	93 (43.1)	62 (40.3)	0.891 (0.585-1.355)	0.591			
3DP1	216 (100.0)	154 (100.0)					

The sample was composed by 216 controls and 154 patients.

The ORs were obtained through logistic regression. CI means confidence interval.

\* adjusted by age.

\*\* corrected by Bonferroni.

In bold, P-values that reached statistical significance (at the 0.05 level).

**Table 2** Association analyzes between KIR ligands and colorectal cancer.

KIR Ligand	Controls N (%)	Patients N (%)	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)*	P-value*	P-value**
A3	49 (21.3)	23 (14.9)	0.649 (0.369-1.114)	0.118	0.585 (0.330-1.014)	0.056	0.224
A11	21 (9.7)	12 (7.8)	0.785 (0.364-1.624)	0.518			
Bw4	141 (65.3)	97 (63.0)	0.905 (0.589-1.395)	0.650			
C1	162 (75.0)	132 (85.7)	2.000 (1.172-3.511)	<b>0.011</b>	1.929 (1.123-3.404)	<b>0.017</b>	0.068
C2	159 (73.6)	107 (69.5)	0.816 (0.517-1.292)	0.385			
C1/C1	57 (26.4)	47 (30.5)	2.024 (1.088-3.839)	<b>0.028</b>	1.908 (1.017-3.645)	<b>0.047</b>	0.188
C1/C2	105 (48.6)	85 (55.2)	1.987 (1.133-3.574)	<b>0.019</b>	1.940 (1.099-3.510)	<b>0.025</b>	0.100
C2/C2	54 (25.0)	22 (14.3)	1				

The sample was composed by 216 controls and 154 patients

The ORs were obtained through logistic regression. CI means confidence interval.

\* adjusted by age.

\*\* corrected by Bonferroni.

In bold, P-values that reached statistical significance (at the 0.05 level).

**Table 3** Association analyzes for inhibitory KIR gene in the presence and absence of their ligands.

	Controls N (%)	Patients N (%)	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)*	P-value*	P-value**
2DL1+ C2+	151 (72.9)	103 (69.6)	0.869 (0.558-1.358)	0.537			
2DL1+ C2/C2	51 (24.6)	20 (13.5)	0.483 (0.269-0.838)	<b>0.009</b>	0.498 (0.276-0.870)	<b>0.014</b>	0.070
2DL2+ C1+	90 (75.6)	60 (83.3)	0.894 (0.585-1.361)	0.601			
2DL2+ C1/C1	32 (26.9)	20 (27.8)	0.858 (0.464-1.555)	0.617			
2DL2+ C1/C2	58 (48.7)	40 (55.6)	0.956 (0.595-1.525)	0.850			
2DL3+ C1+	142 (75.9)	121 (86.4)	1.911 (1.194-3.105)	<b>0.007</b>	1.820 (1.130-2.973)	<b>0.014</b>	0.070
2DL3+ C1/C1	47 (25.1)	44 (31.4)	1.438 (0.892-2.317)	0.135	1.347 (0.829-2.186)	0.228	0.999
2DL3+ C1/C2	95 (50.8)	77 (55.0)	1.274 (0.842-1.930)	0.253			
3DL1+ Bw4+	133 (65.2)	83 (60.1)	0.730 (0.479-1.109)	0.140			
3DL1+ Bw4-	71 (34.8)	55 (39.9)	1.135 (0.733-1.752)	0.570			

C1 group: HLA-Cw 01, 03, 07 (01-06), 08, 12 (02, 03, 06), 14, 16 (01, 03, 04)

C2 group: HLA-Cw 02, 04, 05, 06, 0707, 12 (04, 05), 15, 1602, 17, 18

Bw4: HLA-B 08, 13, 27, 44, 51, 52, 53, 57, 58

\* adjusted by age.

\*\* corrected by Bonferroni.

In bold, P-values that reached statistical significance (at the 0.05 level).

**Table 4** Association analyzes between KIR haplotypes and colorectal cancer.

KIR Haplotype	Control N (%)	Patients N (%)	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)*	P-value*
AA	47 (21.8)	55 (35.7)	1			
Bx	169 (78.2)	99 (64.3)	0.501 (0.315-0.793)	<b>0.003</b>	0.511 (0.319-0.815)	<b>0.005</b>

Bx group indicates AB or BB haplotypes

\* adjusted by age.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As células natural killer (NK) fazem parte da imunidade inata e possuem a habilidade de destruir tumores ou células infectadas com vírus ou bactérias. Elas têm sido alvo de diversos estudos sobre sua atividade no combate ao crescimento tumoral. Sua função efetora se dá através da indução da morte por apoptose da célula alvo<sup>141</sup>.

Os genes KIR, que codificam os receptores das células NK, formam um grupo altamente polimórfico. Esta família de receptores é fundamental na regulação da tolerância imunológica. Os seus níveis de expressão influenciam marcadamente na produção de sinais para a supressão ou ativação das células NK<sup>108</sup>.

As células NK têm sido consideradas importantes na vigilância imunológica contra os tumores e sua progressão. Quando os receptores KIR reconhecem as moléculas HLA próprias (*self*) na membrana das células alvo existirá a inibição da NK. No caso da célula alvo tumoral perder a expressão do HLA, haverá a ativação da NK com destruição do tumor<sup>132</sup>.

Diversos estudos têm demonstrado que a associação KIR/HLA pode ser positiva na destruição de tumores sólidos, assim como em leucemias. A identificação de associações pode gerar novas modalidades terapêuticas contra o câncer, lembrando que já existem anticorpos monoclonais contra os receptores KIR.

Em nosso estudo, genes KIR e alelos do sistema HLA de classe I foram analisados em 154 pacientes caucasóides com câncer colorretal e 216 controles saudáveis. Foram utilizadas as técnicas de PCR-SSO e PCR-SSP, após a extração do DNA.

Avaliando os haplótipos KIR-A e B encontramos resultados significativos para o genótipo Bx que inclui o AB e BB. Esse genótipo foi mais frequente nos controles quando comparados com os pacientes ( $p=0.005$ ; OR: 0.511), conferindo possível proteção para a doença. Isso pode ser explicado devido aos inúmeros genótipos com vários receptores ativadores, muito superior aos encontrados nos genótipos AA.

Considerando que as várias combinações de genes ativadores estão especialmente no genótipo Bx, acreditamos que a função ativadora dos genes KIR pode exibir efeito protetor, sugerindo que as células NK desempenham um papel importante na defesa contra o câncer colorretal.

Alguns estudos de neoplasias hematológicas, como leucemia linfoblástica aguda e leucemia mielóide aguda, identificaram que doadores que possuem o haplótipo B, com seus respectivos genótipos Bx, conferem baixo risco de recaída após transplante de medula óssea. Estes estudos sugerem que a seleção dos doadores com haplótipo B pode ser benéfica para os pacientes, pois existe maior possibilidade de proteção pelas células NK ativadoras<sup>142; 143</sup>.

Em nosso estudo, também analisamos a frequência dos genes KIR e dos ligantes HLA (HLA-C1, HLA-C2, HLA-Bw4, HLA-A3 e HLA-A11). Os resultados indicam que não existem diferenças específicas e significativas na frequência desses genes entre os pacientes com câncer colorretal e controles saudáveis após a correção de Bonferroni.

Resultados contrários ou com associações específicas de genes KIR/HLA e CCR existem na literatura, entretanto os poucos artigos não corrigiram os resultados, permitindo que a associação ao acaso possa ter acontecido quando são analisados um grande número de genes.

Podemos considerar a hipótese de não existir associação de um ou poucos genes KIR com a doença, mas de um amplo espectro de vários receptores KIR ativadores na membrana da célula NK, sem que exista preponderância de um sobre os outros.

O interessante é que a literatura procura sempre a existência de um gene KIR e seu ligante HLA em associação significativa com determinada doença. Por esse modelo agora proposto, o importante é o conjunto de múltiplos genes KIR ativadores, existentes preponderantemente no genótipo Bx, como responsáveis pela vigilância imunológica contra as células tumorais, independente ou não da existência de associação significativa específica de determinado gene KIR com a doença.

## 9. ANEXOS

### 9.1. CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

**Projeto:** 120382

**Data da Versão do Projeto:**

**Pesquisadores:**

LUIZ FERNANDO JOB JOBIM

DANIEL DE CARVALHO DAMIN

MARIANA DE SAMPAIO LEITE JOBIM WILSON

PÂMELA PORTELA

RAFAEL ROESLER

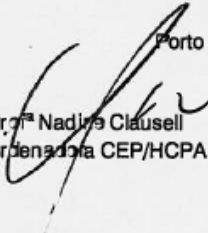
GILBERTO SCHWARTSMANN

**Título:** Análise de polimorfismos dos genes KIR e HLA classe I em pacientes com Câncer Colorretal

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.  
Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 30 de novembro de 2012.

  
Prof. Nadine Clausell  
Coordenadora CEP/HCPA



## 9.2. PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS

Projeto: ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DOS GENES KIR E HLA CLASSE I EM PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL.

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

( ) CONTROLES      ( ) CASOS

Número do paciente: \_\_\_\_\_      Número do prontuário: \_\_\_\_\_

Raça: \_\_\_\_\_      Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Local do tumor: \_\_\_\_\_

Observações:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

### Tipagem HLA

HLA-C1: ( ) Positivo ( ) Negativo

HLA-C2: ( ) Positivo ( ) Negativo

HLA-Bw4: ( ) Positivo ( ) Negativo

HLA-A3: ( ) Positivo ( ) Negativo

HLA-A11: ( ) Positivo ( ) Negativo

Tipagem KIR:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

### 9.3. TERMO DE CONSENTIMENTO DOS PACIENTES

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO CASOS**

**PROJETO:** ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DOS GENES KIR E SEUS LIGANTES HLA CLASSE I EM PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL.

**NOME:**  
**NÚMERO DO PRONTUÁRIO:**

**FONE**  
**DATA:**

#### **INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA E OBJETIVO:**

O câncer colorretal abrange tumores que acometem um segmento do intestino grosso (o cólon) e o reto. Pode ser curável se detectado precocemente, quando ainda não se espalhou para outros órgãos. Grande parte desses tumores se inicia a partir de pólipos, lesões benignas que podem crescer na parede interna do intestino grosso.

Este estudo está sendo realizado com o objetivo de investigar as origens genéticas dessa doença e porque ela acontece em pacientes com câncer colorretal. Os resultados serão comparados com pessoas saudáveis.

**MÉTODO:** Será feita uma coleta de sangue e a amostra será levada para o Laboratório de Imunologia, no próprio hospital, onde será feito o exame (a tipagem dos genes de cada indivíduo).

**FUNCIONAMENTO DA PESQUISA:** Basta coletar o sangue. Todas as informações sobre a pesquisa estarão disponíveis. Os participantes podem aceitar, assim como se recusar a participar do estudo. Também podem descontinuar a pesquisa a qualquer momento, sem prejuízo ou penalidade do seu atendimento na instituição. Os participantes não recebem qualquer valor em dinheiro, mas terão a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade.

**CONFIDENCIALIDADE:** O nome do participante não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois será identificado com um número.

**RISCOS E DESCONFORTOS:** O único desconforto é a coleta de sangue que pode ficar uma mancha arroxeadada no local da coleta.

**BENEFÍCIOS:** Colaborar para o avanço e progresso do conhecimento genético sobre o câncer colorretal.

**COMPREENSÃO E AUTORIZAÇÃO**

Eu, \_\_\_\_\_ pelo presente termo de compromisso compreendi para que serve o estudo e qual procedimento a que serei submetido. O termo que li, esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu atendimento e tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo.

Eu CONCORDO em fazer parte do estudo voluntariamente. Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nome Legível

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Pesquisador responsável: Dr Luiz Fernando Jobim

Pesquisadora executora: Pâmela Portela

Em caso de dúvida favor ligar para o fone (51) 3359-8020

Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Rua Ramiro Barcelos 2350-  
Serviço de Imunologia - 2º andar

#### 9.4. TERMO DE CONSENTIMENTO DO GRUPO CONTROLE (DOADORES DE PLAQUETAS)

Doadores voluntários de plaquetas provenientes do projeto nº 12-0447.

##### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado Senhor (a) \_\_\_\_\_

O (a) Senhor(a) esta sendo convidado a participar da pesquisa: " Genotipagem do sistema de antígenos plaquetários humanos (HPA) em uma população sul-brasileira". Esta pesquisa estudará as plaquetas, que são células presentes na corrente circulatória e que tem a função de parar o sangramento. Para cumprir esta função, estas células se aglomeram na lesão através do contato célula a célula. Este contato é feito através de marcadores presentes na superfície das plaquetas e estes podem ser diferentes entre as populações. O objetivo desta pesquisa é identificar estes marcadores através de um teste laboratorial. Esta pesquisa poderá ajudar os receptores de plaquetas.

Estamos solicitando a sua permissão para análise do seu sangue. E para isto será necessário fazermos uma coleta de sangue. Iremos fazer estudos do DNA (são substâncias que contém todas as informações sobre a formação do corpo humano) e vamos analisar os resultados obtidos.

O (a) Sr (a) poderá ser incluído em um banco de dados contendo o registro de doadores de plaquetas, que será utilizado para selecionar doadores para um receptor de plaquetas específico.

O paciente tem a total liberdade de não querer entrar no estudo, ou de sair do mesmo quando quiser, sem que isso traga prejuízos no seu cuidado. Não há formas de ressarcimento ou de indenização decorrentes da participação na pesquisa. Você tem o direito de solicitar informações e esclarecer dúvidas sobre a pesquisa que venha a participar. A sua identidade será mantida em sigilo. Os resultados do estudo serão sempre apresentados como o retrato de um grupo e não de uma pessoa. A sua participação neste estudo é muito importante e voluntária. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é realizado em duas (2) vias, sendo que, uma delas ficará com o(a) participante (no caso o(a) Senhor(a)) ou seu representante legal e a outra via será arquivada com o pesquisador responsável Professor Dr. Luiz Fernando Jobim. Caso haja a necessidade de maiores explicações, o(a) Senhor(a) poderá telefonar para 3359-8020 (Serviço de Imunologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre) Contato: Pesquisadora executora: Joice Merzoni. Caso o (a) participante da pesquisa não puder decidir ou assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por algum motivo como o (a) mesmo sendo menor de idade ou possuir alguma condição que o incapacite de tal decisão, é necessária a decisão e assinatura de um representante legal.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pode conter palavras que você não entenda. Peça ao pesquisador(a) que explique as palavras ou informações não compreendidas completamente.

Esse documento se encontra em duas vias de igual conteúdo e valor.

Eu, \_\_\_\_\_, (responsável legal ou participante da pesquisa) abaixo assinado(a), ciente dos termos acima descritos, permito a coleta do sangue para a pesquisa: " Genotipagem do sistema de antígenos plaquetários humanos (HPA) em uma população sul-brasileira".

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante ou representante legal

Nome do pesquisador (a): \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador (a)

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201 \_\_\_\_.