

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ESTUDO DO POLIMORFISMO DOS GENES KIR E HLA EM
PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA E GRUPO CONTROLE**

Maria Regina de Sampaio Leite Jobim

Porto Alegre, abril de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ESTUDO DO POLIMORFISMO DOS GENES KIR E HLA EM
PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA E GRUPO CONTROLE**

Maria Regina de Sampaio Leite Jobim

Orientador: Prof. Dr. Gilberto
Schwartzmann

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências
Médicas, UFRGS, como requisito para
obtenção do título de Doutor.

Porto Alegre, abril de 2014

Ao meu marido, Luiz Fernando, pelo incentivo e carinho.

Aos meus filhos Mariana e Eduardo pela cumplicidade.

Aos netos Gabriel e Thomas por ser minha alegria.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Gilberto Schwartzmann, pela acolhida como orientador e estímulo na realização desta pesquisa.

Ao meu marido Luiz Fernando Jobim, que possibilitou a concretização deste trabalho no Serviço de Imunologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

A minha filha Mariana Wilson, que me incentivou durante todas as etapas do processo do doutorado, como mentora da pesquisa em KIR nesta instituição.

As colegas Pâmela Portela e Patrícia Salim, por todo o auxílio e colaboração no desenvolvimento teórico e prático deste trabalho.

A todos os colegas do Serviço de Imunologia, pela disponibilidade e compreensão.

Aos meus irmãos e familiares, pelo amor, amizade e companheirismo.

O trabalho teve o apoio das agências: Conselho Nacional Científico e Tecnológico (CNPq), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE- HCPA).

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”.
(Simone de Beauvoir)

RESUMO

O presente estudo tem como objetivo investigar a frequência dos diversos polimorfismos dos genes KIR (*Killer Immunoglobulin-like Receptors*) e HLA C1 e C2 em um grupo de pacientes com câncer de mama e comparar com um grupo controle de indivíduos saudáveis. As células natural killer (NK) são linfócitos que diferem das células T e B e que fazem parte da imunidade natural, reconhecendo as moléculas HLA (*Antígenos Leucocitários Humanos*) de classe I em células infectadas por vírus ou em células tumorais, através de seus receptores de membrana. Os principais receptores das células NK são conhecidos como receptores KIR, sendo codificados por genes localizados no cromossomo 19q13.4 e classificados em grupos funcionais supressores e ativadores. Neste estudo, analisamos 15 genes KIR e alelos do sistema HLA de classe I em 230 pacientes caucasóides e em 278 controles, usando a técnica de PCR com *primers* específicos (PCR-SSO e PCR-SSP). Nossos resultados demonstraram uma frequência maior do genótipo supressor 2DL2 ($P < 0,001$) em pacientes com câncer de mama, quando comparados ao grupo controle. Os genes HLA-C2 e HLA-BW4 não apresentaram diferenças significantes entre os grupos. Contudo, o gene HLA-C1 foi observado em maior frequência nos pacientes com câncer de mama. Considerando que estes achados sugerem uma potencial associação entre o sistema de genes KIR, HLA classe I e o câncer de mama, estudos adicionais sobre este tema são necessários.

PALAVRAS-CHAVE: antígeno leucocitário humano, células natural killer, genes KIR, receptores KIR, ligantes KIR, câncer de mama.

ABSTRACT

We investigated the frequency of various KIR (*Killer Immunoglobulin-like Receptors*) and HLA C1 and C2 gene polymorphisms in a group of patients with breast cancer and healthy controls. Natural Killer (NK) cells are lymphocytes that differ from T and B cells and are part of the innate immune system, recognizing class I Human Leukocyte Antigens (HLA) molecules on target cells (virus-infected as well as cancer cells), through specific cell surface receptors. KIR comprises the main class of NK receptors, being encoded by genes located in chromosome 19q13.4. They possess both suppressor and activating functional groups. Fifteen KIR genes and class I HLA alleles obtained from 230 Caucasians patients, as well as 278 controls were studied, using PCR techniques with specific primers (PCR-SSO and PCR-SSP). Our results showed a higher frequency of suppressor genotype 2DL2 ($P < 0,001$) in patients with breast cancer as compared to controls. No significant difference between HLA-C2 and HLA-BW4 alleles were observed between the study groups. Notably, a higher frequency of HLA-C1 gene was noted in patients with breast cancer. Our results suggest a potential association between KIR genes, HLA class I and breast cancer, deserving further investigation.

Keywords: Human leukocyte antigen; natural killer cell; Killer cell immunoglobulin-like receptor; breast cancer

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. CLASSIFICAÇÃO DO CÂNCER POR SUBTIPOS MOLECULARES.....	22
FIGURA 2. ENSAIO DE EXPRESSÃO DE 70 GENES NO CÂNCER DE MAMA.....	23
FIGURA 3. ENSAIO DE EXPRESSÃO DE 50 GENES NO CÂNCER DE MAMA.....	24
FIGURA 4. AGRUPAMENTOS DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS DO CÂNCER DE MAMA.....	25
FIGURA 5. INIBIÇÃO E ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS NKS.....	31
FIGURA 6. CITÓLISE PELAS NKS.....	32
FIGURA 7. ATIVAÇÃO DAS NKS POR CÉLULAS TUMORAIS (ADCC).....	34
FIGURA 8. INTERAÇÃO DAS NKS COM LIGANTES DO HLA, C1 E C2.....	36
FIGURA 9. ORGANIZAÇÃO DO CROMOSSOMO 19 HUMANO E GENES KIR.....	38
FIGURA 10. ATIVIDADE DE INIBIÇÃO E ATIVAÇÃO DAS NKs.....	39
FIGURA 11. ESTRUTURA DOS RECEPTORES KIR.....	40
FIGURA 12. HAPLÓTIPOS KIR.....	41
FIGURA 13. DIVERSIDADE DE RECEPTORES NA SUPERFÍCIE DAS NKS.....	44
FIGURA 14. RECEPTORES KIR E SEUS LIGANTES ESPECÍFICOS.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BC: *Breast cancer*- câncer de mama

ADCC: *Antibody Dependent Cell Mediated Citotoxicity* – Citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos

HLA: *Human Leukocyte Antigen* - Antígenos Leucocitários Humanos

IL: *Interleukin* - Interleucina

INF: Interferon

KIR: *Killer Immunoglobulin-Like Receptor* – Receptor do tipo Imunoglobulina da Célula

NK: *Natural Killer Cells* - Células Matadoras Naturais

ITAM: *Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*- imunorreceptores ativadores baseados em tirosina

ITIM: *Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*- imunorreceptores inibidores baseados em tirosina

NKT: *Natural Killer T Cells* - Células Matadoras Naturais tipo célula T

Fc: Fragmento Cristalizável das Imunoglobulinas

PCR: *Polimerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia da Polimerase

TCR: *T cell receptor* - Receptor de célula T

Th: *Linfócito T helper* – Linfócito T auxiliar

TNF: *Tumor Necrosis Factor* - Fator de Necrose Tumoral

SNPs: *Single nucleotide polymorphis*- Polimorfismo de nucleotídeo único

SSP: *Sequence Specific Primers* - Sequência Específica de Primers

SSO: *Sequence Specific Oligonucleotide* – Sequência Específica
Oligonucleotídeos

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	12
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
1.1 O CÂNCER DE MAMA.....	15
1.1.2 BASES GENÉTICAS E ASPECTOS DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	16
1.1.3 FISIOPATOLOGIA.....	18
1.1.4 COMPORTAMENTO CLÍNICO E O MANEJO DA DOENÇA.....	19
1.2 CÂNCER DE MAMA E O SISTEMA IMUNOLÓGICO.....	27
1.3 CÉLULAS NATURAL KILLER.....	30
1.4 GENES E RECEPTORES KIR.....	35
1.4.1 DIVERSIDADE HAPLOTÍPICA.....	40
1.4.2 LIGANTES DOS RECEPTORES DAS CÉLULAS NK.....	42
2 OBJETIVOS.....	46
2.1 OBJETIVO GERAL.....	46
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
3 REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	47
4 JUSTIFICATIVA.....	65
5 ARTIGO CIENTÍFICO (PUBLICADO NA REVISTA <i>HUMAN IMMUNOLOGY</i>).....	66
<i>Analysis of KIR gene frequencies and HLA class I genotypes in breast cancer and control group</i>	66
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	81
I – PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS.....	84
II – TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO.....	85
III – TERMO DE CONSENTIMENTO – REDOME.....	88

INTRODUÇÃO

As células *Natural Killer* (NK) são linfócitos provenientes da medula óssea, que não possuem as mesmas características dos linfócitos T e B. Essas células são capazes de mediar a resposta imune inata, contra células infectadas por vírus e células tumorais, levando-as à destruição. 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^{1;2}.

As células NK reconhecem as moléculas HLA (*Human Leucocyte Antigen* ou Antígeno Leucocitário Humano) de classe I, presentes nas células-alvo, por intermédio de uma família de receptores de superfície responsáveis por atividade citolítica. Os receptores KIR (*Killer Immunoglobulin-Like Receptor*) integram essa família e estão localizados na superfície das células NK e de alguns linfócitos T³.

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 célula NK é regulada 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 destruída⁴.

Assim, a regulação da expressão de HLA de classe I parece monitorar a autotolerância ou a imunidade antitumoral. As células NK e os linfócitos T quando expressam os receptores das células NK (NKR) podem destruir as células tumorais e liberar citocinas, incluindo IL-2, IL-15 e IL-18⁵.

As células NK também podem desempenhar citotoxicidade ao reconhecer e induzir a morte das células-alvo revestidas com anticorpos. Para que isso aconteça, a célula NK liga-se pela molécula CD16, que é um receptor para a porção Fc dos anticorpos e causa a citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (*Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity; ADCC*). É característica dessas células, a expressão de CD16 e CD56, e a ausência de CD3 e CD4.

Dois subtipos distintos de células NK podem ser identificados, baseando-se na densidade de expressão de superfície de CD56, sendo que mais de 90% das células NK pertencem ao subtipo CD56^{dim}, cuja principal função é a citotoxicidade natural por liberação de perforinas. O segundo subtipo, CD56^{bright}, possui alta densidade e é raro no sangue ($\pm 10\%$), sendo responsável pela produção de citocinas. Aproximadamente metade das células NK expressam CD8⁶.

Os genes KIR que codificam esses receptores estão localizados no cromossomo 19q13.4, junto com todos os outros genes do complexo de receptores leucocitários⁷. A família KIR é altamente polimórfica e o seu funcionamento regula a função da célula NK e interfere na fisiopatologia de várias doenças, entre elas a psoríase vulgar^{8; 9}, artrite psoriática^{10; 11} a esclerose sistêmica¹², lúpus eritematoso sistêmico¹³, hepatite C¹⁴ e neoplasias sólidas e hematológicas¹⁵.

Em nosso laboratório, tivemos a oportunidade de estudar a diversidade dos genes KIR em uma população de indivíduos de origem caucasiana da região Sul do Brasil¹⁶, bem como a sua distribuição e prevalência em pacientes com diabetes mérito do tipo I¹⁷, esclerose sistêmica¹⁸, artrite reumatóide¹⁹, doença inflamatória do intestino²⁰ e Doença de Gaucher²¹, em relação a controles saudáveis.

Estudos anteriores avaliaram a frequência de genes KIR em pacientes com câncer de bexiga, colorretal e laringe¹⁵. Uma frequência aumentada de genes KIR3DL1 e KIR2DS4 em pacientes com câncer de bexiga foi observada. Na Doença de Hodgkin, observou-se a presença de genes KIR com função ativadora e um papel protetor para o surgimento da doença²².

Recentemente, nosso grupo avaliou a associação entre genes KIR e alelos HLA em 200 pacientes com diagnóstico de câncer de próstata e 185 controles saudáveis, utilizando a técnica de PCR-SSP. Os resultados não confirmaram diferenças significativas na prevalência de genes KIR e alelos HLA entre pacientes e controles²³.

Em um estudo-piloto, utilizando-se células NK obtidas de dois doadores, observou-se que a presença de genes KIR com ação inibitória não influenciou na ocorrência de ADCC em células de câncer de mama com diferentes níveis de

expressão de HER-2²⁴.

Mais recentemente, a prevalência de genes KIR foi estudada em 33 pacientes com câncer de mama e 77 controles normais. Neste estudo, foi observado um papel do gene ativador KIR2DS1 no desenvolvimento desta neoplasia, enquanto o gene 2DL1 e os alelos 2DS4 003/4/6/7 parecem exercer um papel protetor na doença²⁵.

De acordo com dados recentes do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais comum no mundo e o mais frequente nas mulheres, correspondendo, no Brasil, a 22% dos casos novos de câncer a cada ano²⁶. Tendo em vista a importância epidemiológica do câncer de mama no mundo e no Brasil e a experiência acumulada por nosso grupo de pesquisa nos últimos anos no estudo dos genes KIR, consideramos oportuno o estudo da associação dos genes KIR e HLA de classe I no câncer de mama. 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).

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 O CÂNCER DE MAMA

1.1.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E FATORES DE RISCO

Câncer de mama é a neoplasia maligna mais frequente em mulheres, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. Nesses últimos, sua incidência vem aumentando devido à elevação na expectativa de vida e ao avanço do processo de urbanização, que promovem um estilo de vida cujo paradigma é o modelo ocidental²⁷. Em 2012, 1.7 milhões de mulheres tiveram diagnóstico de câncer de mama; cerca de 6.3 milhões já viviam com a doença, que havia sido diagnosticada nos cinco anos anteriores. Câncer de mama corresponde a um quarto dos casos de câncer na mulher; é a causa mais comum de morte por câncer no sexo feminino, com mais de 500 mil óbitos anuais²⁷.

A detecção precoce, fundamental para o controle da doença, tem na mamografia, até o presente, o único método de triagem com eficácia estabelecida no câncer de mama. Esta estratégia é custo-efetiva, sobretudo em países com boa infra-estrutura de saúde, nos quais os programas organizados de triagem podem ser mantidos ao longo do tempo. Em geral, a mamografia de triagem é recomendada para mulheres a partir dos 50 anos, porém nos países que apresentam maior prevalência da doença e que usufruem de melhores condições econômicas, esse exame é preconizado a partir dos 40 anos de idade^{28; 29}.

Dados oficiais sobre a mortalidade por câncer de mama no Brasil, publicados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), relativos ao ano de 2011, revelaram a ocorrência de 13.345 mortes pela doença (13.225 em mulheres e 120 em homens), mostrando grandes diferenças regionais no que se refere às taxas de incidência do câncer de mama. Na Região Norte, por exemplo, observam-se as menores taxas de incidência do país, com uma projeção, para o ano de 2014, entre 10 a 27 novos casos por 100.000 mulheres. Em contraste, na Região Sul, área com maior incidência de câncer de mama, estima-se uma taxa entre 57 e 96 novos casos por

100.000 mulheres, para o mesmo período. Quanto ao Rio Grande do Sul, a estimativa é de 87 novos casos por 100.000 mulheres, neste mesmo ano²⁶.

Vários fatores podem aumentar o risco de surgimento do câncer de mama como sexo, idade, sobrepeso, menarca precoce, gravidez tardia, história familiar, predisposições genéticas, bem como reposição hormonal, uso de contraceptivos, exposição à carcinógenos e álcool^{30; 31; 32; 33; 34; 35}.

1.1.2 BASES GENÉTICAS E ASPECTOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

O câncer ocorre pelo acúmulo de mutações em genes críticos para o controle da proliferação, diferenciação e morte celular e/ou em genes críticos para o reparo a danos no DNA. Na maioria dos casos, trata-se de alterações genéticas adquiridas ao longo da vida; estão presentes em apenas algumas células somáticas e são denominadas mutações somáticas, não são herdadas. Já as mutações germinativas, bem menos frequentes, são herdadas de um ou ambos os progenitores e aumentam de modo significativo o risco de câncer de mama, sobretudo se, no transcorrer do tempo, houver mutações somáticas adicionais em outros genes críticos^{35; 36; 37; 38}.

Pequeno percentual dos casos de câncer de mama está relacionado a grupos familiares, situação em que a doença pode ser considerada hereditária devido à presença de mutações herdadas através das células germinativas. Sua manifestação tende a ser então mais precoce, se comparada aos casos não hereditários, e tem maior propensão à bilateralidade^{35; 37; 38}. Estima-se que 5-10% do total de casos de câncer de mama sejam hereditários. Devido à ancestralidade comum ao longo de muitas gerações, alterações genéticas específicas, associadas à doença, são mais frequentes em certos grupos étnicos ou geográficos, como indivíduos de origem judaica Ashkenazi da Europa central ou oriental e indivíduos de origem norueguesa, islândica ou holandesa^{38;39;40;41;42}.

Além das alterações genéticas específicas, fatores individuais e decorrentes do meio ambiente são identificados como tendo influência no risco do surgimento do câncer de mama. Estes fatores incluem idade, sexo, etnia, história prévia de câncer de mama, certas alterações no tecido mamário e fatores hormonais. A presença de casos de câncer de mama em familiares diretos constitui-se em importante fator de

risco, sobretudo se a doença tiver ocorrido em idade mais precoce^{31; 33; 43; 44}. Por exemplo, o risco de uma mulher apresentar câncer de mama duplica se houver um membro da família, em primeiro grau, afetado pela doença^{31; 35; 43; 44}. Existem, ao mesmo tempo, disparidades nas taxas de mortalidade por câncer de mama, que variam conforme o perfil socioeconômico e a etnia.

Mutações nos genes BRCA1, BRCA2, CDH1, STK11 e TP53 aumentam o risco de câncer de mama. Outros genes, tais como AR, ATM, BARD1, BRIP1, CHEK2, DIRAS3, ERBB2, NBN, PALB2, RAD50, and RAD51 tem sido associados ao câncer de mama^{45; 46; 47}.

Os genes BRCA1 e BRCA2 têm clara relação com o câncer de mama hereditário, de modo que mulheres portadoras de mutações germinativas nestes genes apresentam alto risco de desenvolver não apenas câncer de mama, mas também outros tipos de tumores como o câncer de ovário. Homens com mutação em BRCA1 são mais frequentemente acometidos por câncer de mama e por outros tipos de câncer como o de próstata. Além disto, mutações em BRCA1 são também associadas a um maior risco de câncer de pâncreas. Mutações no gene BRCA2 têm influência no desenvolvimento do câncer de mama em homens, no desenvolvimento do câncer de próstata, de pâncreas e do melanoma maligno, entre outros^{35; 38; 40; 42}.

As mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 são herdadas em padrão autossômico dominante, assim, a presença de uma cópia do gene alterado em cada célula mamária já é suficiente para aumentar o risco da doença. Contudo, a presença da mutação confere somente maior risco, isto é, não assegura o desenvolvimento da doença, uma vez que nem todos os indivíduos portadores da mutação virão a ter câncer de mama^{31; 37; 38; 40}.

O gene BRCA1, bem como os genes RAD51 e BARD1, constituem-se genes supressores responsáveis pela reparação do DNA, quando o mesmo estiver danificado, e pela manutenção da informação genética celular. Mutações nesses genes podem ser causadas pela radiação natural, pela exposição a carcinogênicos ambientais ou químicos e também podem ocorrer durante a divisão celular^{45; 46; 47}.

Alterações herdadas em vários outros genes, tais como CDH1, STK11 e TP53

são associadas a um maior risco de câncer de mama. Mutações nestes genes estão associadas ao surgimento de síndromes com risco aumentado para o surgimento de vários tipos de câncer e neoplasias benignas ao longo da vida^{45; 47}.

Mutações nos genes ATM, AR, BARD1, BRIP1, CHEK2, NBN, PALB2, RAD50 e RAD51 também são associados a um maior risco de câncer de mama. Dentre estes, os genes ATM e CHEK2 exibem evidências mais robustas desta associação^{45; 46; 47; 48}.

O gene TP53 tem sido extensamente estudado por ter a função de supervisionar a integridade de todos os genes. Mutações em TP53 podem comprometer o ciclo celular na fase G1/S, levando a uma instabilidade no genoma^{49; 50; 51}.

Algumas mutações somáticas são também associadas ao câncer de mama, como, por exemplo, as que ocorrem no gene ERBB2 (ou Her-2/neu) e nos genes DIRAS3 e TP53. Mais recentemente, foi também observada a associação de SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) em cinco novos genes de susceptibilidade ao câncer de mama: TNRC9, FGFR2, MAP3K1, H19 e LSP1^{49; 51; 52; 53; 54}.

1.1.3 FISIOPATOLOGIA

Como foi anteriormente mencionado, o câncer de mama é uma doença de base genética complexa, que envolve defeitos genéticos herdados em células germinativas e também defeitos somáticos que se acumulam ao longo da vida a partir de anormalidades adquiridas no meio ambiente. São exemplos as mutações que ocorrem nos genes HER-2/neu, p53, BRCA1 e BRCA2 e nos genes que codificam fatores envolvidos em vias de sinalização através de receptores de estrógeno e progesterona^{35; 37; 43; 55}. Estas anormalidades genéticas se traduzem por modificações qualitativas e quantitativas na produção de proteínas codificadas a partir de mensagens contidas em genes supressores de tumores, oncogenes, genes com funções de reparo aos danos nos ácidos nucleicos, genes responsáveis pelo controle do ciclo celular, genes responsáveis pela síntese de fatores de crescimento ou seus receptores, genes responsáveis pela síntese de fatores de sinalização intracelular, genes reguladores de funções epigenéticas e outros^{56; 57}. Com isto, há

um acúmulo progressivo de alterações funcionais que levam à perversão dos mecanismos normais de controle da proliferação, diferenciação e apoptose, ativando mecanismos angiogênicos, pervertendo o metabolismo normal e os sistemas de vigilância imunológica^{56; 57; 58}. Em consequência, o processo de proliferação e diferenciação celular deixa de obedecer aos mecanismos normais de regulação, passando a depender de vias de estimulação autócrina e/ou parácrina, que conferem autonomia de crescimento ao tumor. Ao mesmo tempo, o ambiente de instabilidade genética decorrente da ineficiência nos mecanismos de reparo leva ao surgimento de uma crescente heterogeneidade celular no tumor, gerando clones celulares que albergam novas mutações^{44; 56; 57}. A cada divisão celular, estes clones adquirem sucessivas vantagens adaptativas, com ganhos de função, tornando-se aptos para invadir os tecidos vizinhos e se disseminar à distância por meio do sistema linfático e corrente sanguínea. Sem tratamento, o câncer de mama progride tanto de forma loco-regional como à distância, tornando-se via de regra fatal, no mais das vezes por envolvimento metastático em órgãos vitais^{56; 57; 58}.

A estimulação através da ligação do estrógeno a receptores específicos expressos na membrana celular de células de câncer de mama funciona como um dos mais importantes fatores de crescimento na doença. Após essa ligação, a formação do complexo estrógeno-receptor torna-se responsável pela transdução de sinais intracelulares até o núcleo da célula, com subsequente mudança na expressão de genes associados com a proliferação celular^{33; 35}. A partir disso, é possível se observar maior incidência de câncer de mama em mulheres nulíparas, uma vez que a ausência de gestação promove uma exposição exagerada do epitélio mamário ao estrógeno durante o ciclo menstrual, sem que haja estímulos de diferenciação celular por efeito de hormônios da gestação, como a progesterona^{31; 32; 33; 35}.

1.1.4 COMPORTAMENTO CLÍNICO E O MANEJO DA DOENÇA

Do ponto de vista clínico, o câncer de mama é uma doença altamente heterogênea que pode ser diagnosticada em diferentes estádios: I e II (iniciais), III e IV (avançados)^{59; 60}. Resumidamente, o estágio I inclui pacientes com doença restrita à mama; no estágio II, a doença envolve a mama e os linfonodos axilares homolaterais. Pacientes com estágio III apresentam a doença avançada

localmente na região da mama e axila homolateral, aqueles com estágio IV mostram já evidências de metástases em órgãos à distância. Os principais sítios de envolvimento à distância são linfonodos, ossos, pulmões, fígado, pele e sistema nervoso central^{59; 60; 61; 62}.

Classicamente, o tratamento do câncer da mama em seus estágios iniciais (I e II) envolve a remoção do tumor primário e dos linfonodos axilares homolaterais. Nas últimas décadas, tem sido possível reduzir-se drasticamente a agressividade das técnicas cirúrgicas no manejo da doença. A cirurgia conservadora é hoje a regra, uma vez que a mutilação decorrente das remoções cirúrgicas extensas não mostrou vantagem de sobrevida em ensaios clínicos prospectivos e randomizados, quando comparada com a cirurgia conservadora seguida de irradiação da mama e região axilar homolateral^{59; 61; 63; 64}. Da mesma forma, a remoção dos linfonodos axilares, antes parte integral do tratamento loco-regional da doença, ficou reservada apenas para casos em que haja confirmação histopatológica de envolvimento linfonodal, ou seja, tornou-se possível (uma vez que esta estratégia pode ser acompanhada de significativa morbidade local), identificar pacientes que podem prescindir dessa abordagem cirúrgica, com base na negatividade da pesquisa do linfonodo sentinela^{65; 66; 67; 68}.

Uma vez decidido o manejo loco-regional da doença, o grande desafio terapêutico passa a ser a identificação de quais indivíduos devem ou não receber tratamentos complementares para reduzir o risco do surgimento de metástases à distância^{60; 61; 69; 70}. Tratamentos hormonais, quimioterápicos e com terapias-alvo têm sido incorporados com sucesso imediatamente após o tratamento loco-regional, nos chamados tratamentos adjuvantes, e nos tratamentos sistêmicos prévios ao manejo, chamados tratamentos neo-adjuvantes^{71; 72; 73}. Estas estratégias têm mostrado ganhos inequívocos de sobrevida em ensaios clínicos prospectivos e randomizados incluindo pacientes com estágio II, bem como naqueles considerados estágios I de alto-risco. Os tratamentos neo-adjuvantes, em particular, podem oferecer, além da vantagem do início do tratamento sistêmico mais precoce, a oportunidade de avaliar o efeito do tratamento medicamentoso no tumor primário, oferecendo um “teste terapêutico individual”^{72; 73}. Dentre as alterações moleculares mais utilizadas para avaliar a agressividade do câncer de mama e influenciar na escolha terapêutica,

incluem-se a medida dos receptores hormonais (estrógeno e progesterona) e a presença de hiperexpressão de receptores de HER-2 no tecido tumoral^{74; 75; 76; 77; 78; 79}.

Na última década, vários avanços na biologia molecular permitiram que se pudesse avaliar o comportamento biológico do câncer de mama com maior profundidade. Destacam-se, neste sentido, as técnicas de análise concomitante de múltiplos genes ou produtos de genes considerados relevantes para o comportamento biológico do câncer de mama^{80; 81; 82; 83}.

A classificação da doença, historicamente fundamentada em características histopatológicas e apoiada na expressão de receptores hormonais e, mais recentemente, na expressão de HER-2, passou a incorporar informações obtidas a partir de painéis incluindo a expressão de múltiplos genes relacionados à doença e às propriedades associadas à malignidade, como invasão, proliferação, apoptose, angiogênese e outras^{80; 84; 85; 86}.

Com isto, tem sido possível reclassificar o câncer de mama em seis subtipos moleculares intrínsecos: luminal A, luminal B, HER2-enriquecido, tipo-basal, tipo mama normal e pobre em claudina (Figura 1). Esta classificação parece refletir com mais precisão os diferentes subtipos prognósticos da doença e, no futuro, poderá orientar melhor as decisões terapêuticas^{80; 81; 87; 88}.

Subtipos Moleculares Intrínsecos de Câncer de Mama

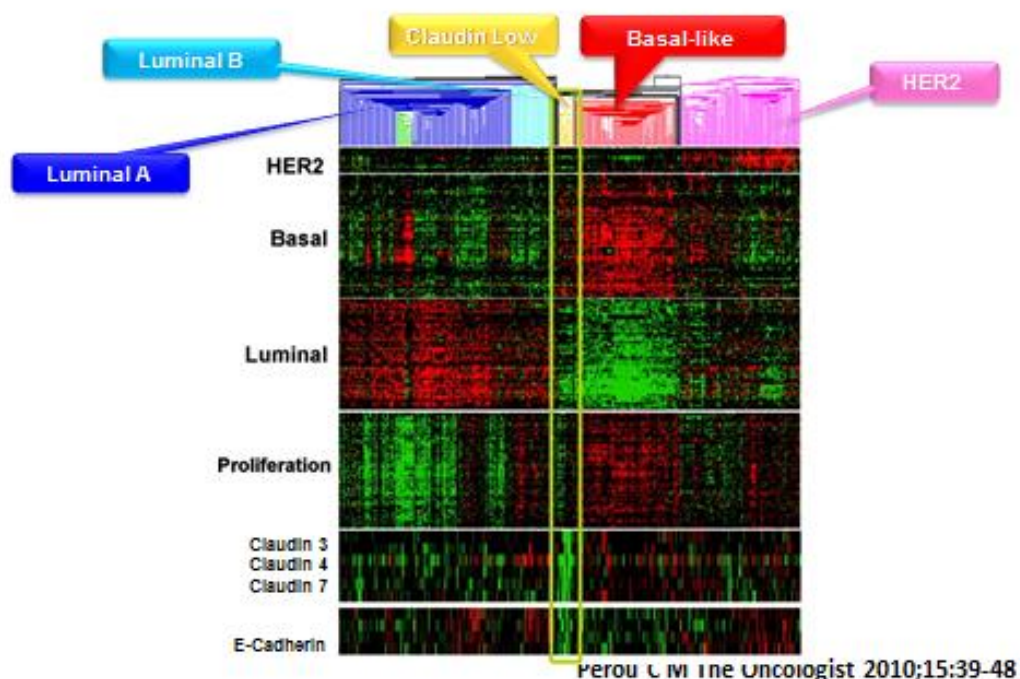


FIGURA 1. Classificação por subtipos moleculares intrínsecos no câncer de mama⁸¹.

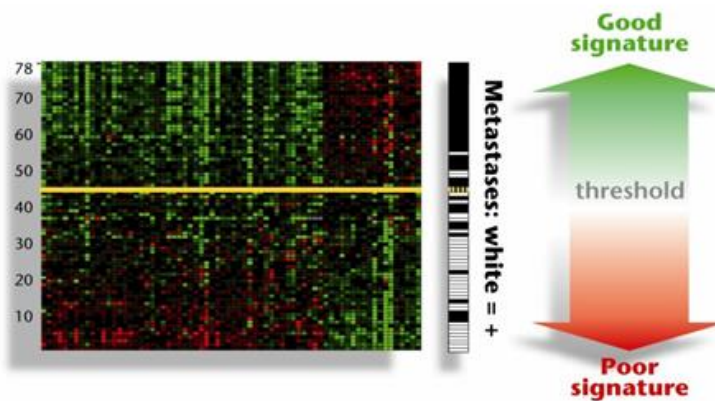
No presente, as decisões quanto ao uso, ou não, de tratamentos sistêmicos adjuvantes ao tratamento loco-regional com cirurgia e radioterapia são baseadas no desempenho clínico, no estadiamento da doença e nas informações quanto à expressão de receptores de estrógeno, progesterona e HER-2 e, além disso, obviamente, no desejo do paciente^{89; 90}. Testes laboratoriais estimativos da capacidade proliferativa do tumor, como o Ki-67, podem ser também utilizados⁸⁸. Outros instrumentos como o “adjuvant *online*”, que utiliza projeções derivadas de estudos de características gerais de pacientes, a partir de bancos de dados, foram também validados em séries de indivíduos tratados com câncer de mama^{87; 91; 92; 93}.

Painéis incluindo a avaliação da expressão relativa de grupos de genes associados ao câncer de mama têm sido disponibilizados comercialmente, sendo também úteis na decisão clínica, como é o caso do Oncotype DX, MammaPrint e PAM50^{81; 91; 92}. Estes testes podem oferecer informações prognósticas sobre a doença, no que se

refere à probabilidade de uma maior ou menor sobrevida global ou sobrevida livre de recidiva (Figuras 3 e 4).

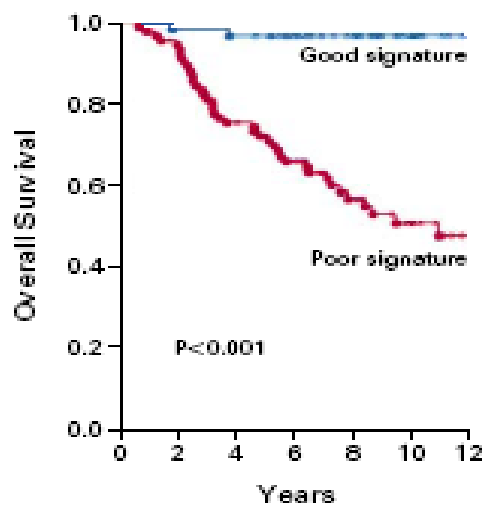
2A)

MammaPrint:
Ensaio de Expressão de 70 Genes no Câncer de Mama



Adaptado de: Buyse. JNCI 2006;98:1183; van't Veer. Nature 2002;415:530.

2B)



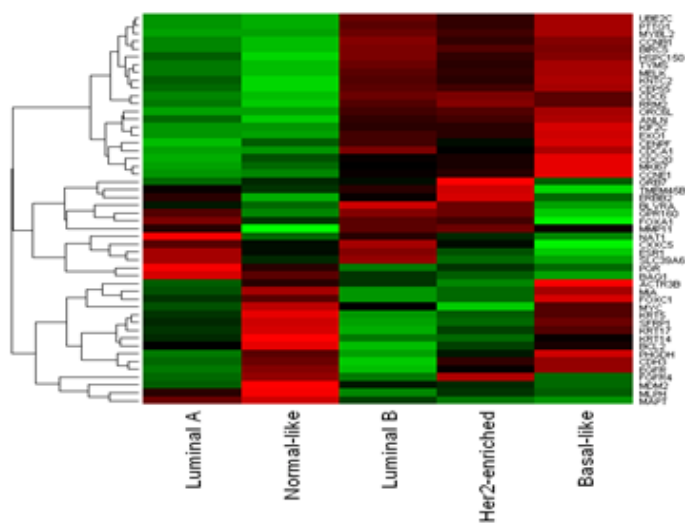
NO. AT RISK

Good signature	60	59	58	48	35	24	12
Poor signature	91	86	66	60	33	21	10

FIGURAS 2A E 2B. Ensaio de expressão de 70 genes no câncer de mama (MammaPrint), sugerindo uma associação entre o padrão de “assinatura” molecular e o desfecho de Sobrevida Global⁹¹.

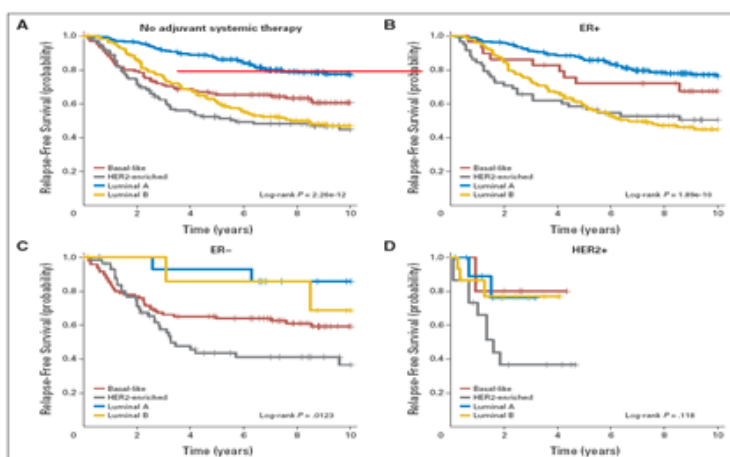
3A)

**PAM50:
Ensaio de Expressão de 50 Genes no Câncer de Mama**



3B)

**PAM50:
Sobrevida Livre de Recidiva de Pacientes com Câncer de Mama de acordo com Desempenho no Painel de 50 genes**



Adaptado de: Parker JS et al. J Clin Oncol, 2009; 27:1160

FIGURAS 3A E 3B. Ensaio de expressão de 50 genes no câncer de mama (MammaPrint), sugerindo uma associação com o desfecho de Sobrevida Livre de Recidiva⁸⁷.

De fato, o campo da pesquisa em biologia molecular do câncer de mama é vastíssimo e está em constante transformação. A identificação de alterações

moleculares em amostras obtidas do tumor de um indivíduo permite hoje que se formule hipóteses quanto à presença de ativação de vias de sinalização no tumor, tornando, desse modo, possível que sejam realizadas interferências terapêuticas mais seletivas. São exemplos os estudos recentes sobre vias de sinalização através de receptores para HER2, estrógeno, bem como IGF1R, PI3K/AKT, mTOR, AMPK e vias angiogênicas (Figura 4)⁹².

Cancer Genome Atlas Network: Análise Funcional de Conjuntos de Anormalidades Gênicas em Câncer de Mama

Genoma, exoma, RNA e análise proteica em tumores primários

Alterações genéticas e conversões fenotípicas em subtipos intrínsecos

Alteração Genética	Luminal A	Luminal B	Basal-like	HER2
TP53 mut	12	32	84	75
PIK3CA mut	49	32	7	42
PTEN mut/loss	13	24	35	19
Cyclin D1 amp	29	58	9	38
Número de cópias	Diploidia	Aneuploidia	Aneuploidia	Aneuploidia
Metilação do DNA	-	Hiper	Hipo	-

Adaptado de: Cancer Genome Atlas Network. *Nature* 2012;490:61-70.

FIGURA 4. Agrupamentos de alterações genéticas de acordo com os subtipos moleculares do câncer de mama⁹².

Em geral, tumores com alta expressão de receptores hormonais possuem comportamento indolente, com predomínio de metástases em tecidos moles e esqueleto. Nestes casos, os pacientes são manejados preferencialmente com tratamentos de supressão da ação estrogênica^{71; 72; 73}. Por outro lado, os tumores com hiperexpressão de HER-2 exibem comportamento mais agressivo,

maior prevalência de metástases nas vísceras e no sistema nervoso central. Estes tumores são hoje passíveis de abordagens terapêuticas mais seletivas, com uso de anticorpos monoclonais anti-HER-2 ou inibidores das famílias de quinases responsáveis pela sinalização intracelular a partir destes receptores de membrana^{69; 78; 79; 91}. Os tumores classificados como triplo-negativos (ausência de expressão de receptores de estrógeno e progesterona e HER-2 negativos) são, via de regra, mais agressivos, altamente metastáticos e moderadamente sensíveis à quimioterapia^{78; 79; 93; 94}.

Em pacientes que apresentam a doença no estágio III, observa-se que, além da agressiva disseminação loco-regional da doença, há grande probabilidade da presença de metástases ocultas à distância. Por esta razão, aplicam-se várias modalidades de tratamento como cirurgia, radioterapia e tratamentos medicamentosos (quimioterapia, hormonioterapia e terapias-alvo)^{92; 95; 96; 97; 98}. Quanto ao estágio IV, não existe hoje perspectiva de tratamento curativo, porém, é fundamental que se faça o controle dos sintomas da doença e a preservação da qualidade de vida do paciente, o que pode ser obtido por períodos muitas vezes prolongados, com o uso de tratamentos hormonais, quimioterápicos, terapias-alvo, radioterapia e controle da dor, e prevenção de fraturas com o uso de bisfosfonatos^{69; 70; 79; 87; 90; 99; 100; 101; 102}.

1.2 CÂNCER DE MAMA E O SISTEMA IMUNOLÓGICO

O câncer de mama não tem sido considerado um tumor imunogênico como é o caso de outras neoplasias como o melanoma maligno ou o câncer de rim, que têm sido alvos de tratamentos imunológicos de relativo sucesso com interleucina 2, anticorpos anti PD-1 e anti-PD-L1¹⁰³. Contudo, nas classificações mais recentes do câncer de mama, utilizando-se a expressão diferencial de múltiplos genes, por meio de técnicas de microarranjos de DNA, há evidências de que certos tipos de câncer de mama revelam um elevado nível de expressão de genes ativadores de vias de ativação imunológica^{104; 105; 106}.

O padrão de sinalização por citocinas parece ser distinto em pacientes cujos tumores provocam uma forte resposta de linfócitos T citotóxicos de tipo T helper (Th1). Estes pacientes apresentam um prognóstico melhor, quando comparado ao padrão exibido em portadores de tumores com respostas de tipo T *helper* 2 (Th2) ou que provocam maior influxo de macrófagos dependentes de estimulação via fator de estimulação de colônias 1 (CSF-1)¹⁰⁷. Além disto, células com maior influxo de linfócitos infiltrantes em tumor (TIL) tendem a oferecer melhor resposta a tratamentos neoadjuvantes com quimioterapia, se comparadas às células de tumores menos imunogênicos¹⁰⁸.

Estas observações sugerem a existência de propriedades intrínsecas em certos tipos de câncer de mama, que provocam resposta de linfócitos T citotóxicos com efeito sinérgico com a quimioterapia. Outros tumores, por sua vez, podem interferir em vias de sinalização inflamatória, favorecendo o processo de metástase¹⁰⁹.

Ainda que o efeito terapêutico da quimioterapia seja usualmente atribuído a danos no DNA ou interferências no mecanismo de divisão celular, muitas destas drogas utilizadas nos tratamentos convencionais do câncer de mama podem produzir alterações imunológicas no microambiente tumoral. Dados mais recentes sugerem que estes efeitos podem impactar no resultado do tratamento^{109; 110; 111}. Antraciclinas e complexos de platina podem induzir uma resposta imune através da secreção de interleucina 1 e receptores *Toll* 4 (TLR4) em células dendríticas. Além disto, células tumorais danificadas pelo tratamento podem expressar calreticulina em

sua superfície, servindo de sinal para a fagocitose por células dendríticas que podem processar antígenos tumorais para posterior apresentação ao sistema imunológico¹⁰³. O uso neoadjuvante de taxanos no câncer de mama localmente avançado parece aumentar os níveis de TIL no tumor¹⁰³. Em pacientes com câncer de mama avançado, o docetaxel pode aumentar os níveis de citocinas associadas ao Th1, tais como a interleucina 2, os interferons e o TNF-alfa, com redução de TNF-beta¹⁰⁴. Os agentes alquilantes, como a ciclofosfamida, quando administrados em doses baixas, podem causar depleção de células T imunossupressoras, promovendo anergia a antígenos associados a tumores. A dose e esquema de administração de agentes quimioterápicos pode também maximizar o efeito de vacinas e tratamentos imunoterápicos^{105; 106; 112}. Trastuzumabe, um anticorpo anti-HER2 com extenso uso clínico em pacientes com câncer de mama, não apenas produz uma inibição da sinalização por este receptor, mas também ativa vias de citotoxicidade dependentes de anticorpo (ADCC), destruindo células malignas que hiper expressam HER2 através da ativação de células NK. Analisando-se polimorfismos em genes para receptores de imunoglobulina G de pacientes HER2-positivos tratados com taxanos e trastuzumabe, a importância do efeito terapêutico via ADCC pode ser demonstrada^{113; 114; 115}.

Do mesmo modo, o tratamento radioterápico pode provocar respostas imunogênicas em pacientes com câncer de mama. Certas formas de fracionamento de dose de radiação pode induzir a ativação do MCH classe I, a secreção de ligantes de quimiocinas (CXCL16) e provocar a apresentação de epítomos tumorais^{115; 116}. A combinação de radiação e agonistas de antígenos leucocitário citotóxicos 4 (CTLA-4) pode induzir uma potente resposta imunológica, inclusive com redução do volume tumoral fora do campo de irradiação^{117; 118}.

O desenvolvimento de tratamentos adjuvantes através de vacinas, com o intuito de eliminar micrometástases, é outra área de potencial desenvolvimento. Células dendríticas capazes de reconhecer receptores tipo HER2 têm sido utilizadas em pacientes portadores de carcinoma ductal *in situ* (DCIS), havendo evidências de atividade antitumoral. Estes achados sugerem que a imunoterapia pode ser útil para a erradicação do câncer de mama nos estádios mais precoces da doença^{119; 120}.

Em um estudo piloto com a vacina poxvirus MUC-1/CEA/TRICOM, 1 de 12 pacientes com câncer de mama obteve *complete* como resposta¹²¹. Neste caso, o paciente apresentava baixo “volume” de doença, o que parece ter sido determinante para o sucesso da estratégia. O uso de vacinas, por sua vez, pode diminuir a velocidade de progressão tumoral ou até aumentar a sensibilidade a outros tratamentos subsequentes. Este efeito foi observado em um ensaio de Fase II com a vacina Ad-p53, que produziu melhor resposta em pacientes tratados com paclitaxel¹²².

Outra via de sinalização envolve o fator de estimulação de colônias 1 (CSF-1), com seu papel de atrair macrófagos associados ao tumor e sua capacidade de influir no processo de metástases. O bloqueio produzido pela administração de CSF-1 também teve efeito sinérgico à citotoxicidade do paclitaxel, o que levou ao ensaio de Fases I-II com o inibidor de CSF-1, denominado PLX3397, em pacientes com câncer de mama metastático^{108; 109}. Outros estudos têm focado em vias de sinalização com PD-1/PD-L1 e CTLA-4, receptores do ligante Toll em câncer de mama. O desafio entretanto será encontrar um contexto e esquemas de administração destes agentes que sejam adequados, isto é, que otimizem seus efeitos antitumorais, minimizando, ao mesmo tempo, os riscos de efeitos autoimunes indesejáveis, especialmente no contexto dos tratamentos adjuvantes^{123; 124; 125}.

1.3 CÉLULAS NATURAL KILLER

As células *Natural Killer* (NK) são células efetoras da resposta imune inata ou natural, representando cerca de 10-16% dos linfócitos do sangue periférico²; são provenientes da medula óssea e não dependem do timo para sua maturação. Foram inicialmente consideradas como um “artefato experimental”, nos métodos de identificação da citotoxicidade das células T; posteriormente, foram distinguidas das outras células linfóides por serem maiores, com um citoplasma granular distinto dos linfócitos T e B, bem como por não apresentarem receptores de célula T (TCR) e imunoglobulinas na membrana. Essas células apresentam o marcador CD56+ e/ou CD16+^{1;2}, os quais se tornaram marcadores de sua presença *in vitro*. O CD16 é um receptor de Fc de baixa afinidade para imunoglobulinas o que confere às células NK uma outra função: capacidade de lise da células-alvo quando essas estiverem sensibilizadas com anticorpos (ADCC).

Essas células são responsáveis pela vigilância imunológica contra células infectadas por vírus e bactérias, atacando células transformadas ou tumorais. Além do sangue, podem ser encontradas nos linfonodos, baço e tecidos periféricos. As células NK tornaram-se objeto de intensa investigação desde que foram identificadas em 1975^{126; 127}. Esse sistema inato, por ser de grande importância na barreira precoce contra o câncer e agentes infecciosos, vem sendo atualmente testado como forma de terapia antitumoral.

Existem genes KIR que toleram a presença do próprio (*self*) HLA de classe I, os receptores KIR inibidores; com isso, as células normais do organismo humano estão protegidas pelas células NK e seus receptores inibidores. No entanto, as mesmas células podem destruir células alteradas, infectadas ou tumorais por intermédio dos receptores ativadores que não suportam a falta ou a insuficiência das moléculas HLA de classe I na superfície celular, destruindo as células alvo¹²⁸.

As células eliminadas pelas NK expressam insuficientemente as moléculas HLA de classe I, sendo que alguns autores as definem como células que perderam a expressão do próprio ou *missing self*¹²⁹. Assim, células que perdem suas características imunogenéticas, são atacadas pelas NK por intermédio de seus

receptores de membrana KIR (*Killer Immunoglobulin-like Receptors*). O sistema genético que controla a expressão dessas moléculas está localizado no cromossomo 19 e é conhecido como genes KIR.

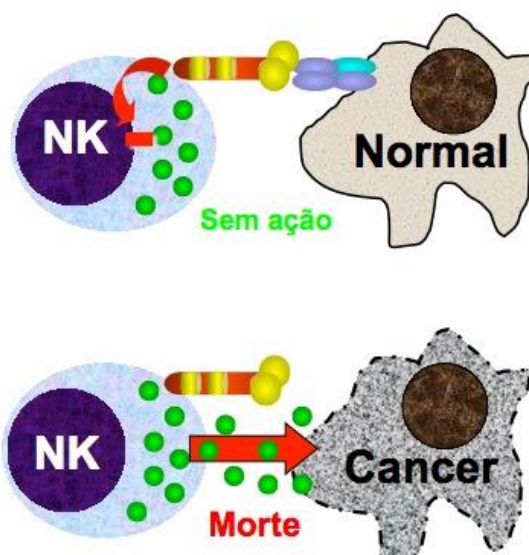


FIGURA 5. Inibição (tolerância) da célula NK frente a uma célula normal que apresenta antígenos HLA próprios em sua membrana. Na parte inferior observa-se a ativação (destruição da célula alvo e produção de citocinas) pela célula NK devido à percepção da falta ou expressão insuficiente de moléculas HLA em uma célula alvo tumoral.

A atividade funcional das células NK depende do equilíbrio entre sinais de receptores de ativação e de inibição na superfície da célula, em diversas situações, como nas doenças infecciosas, autoimunidade, transplantes e câncer^{129; 130}. Sua maturação ocorre na medula óssea, a partir das células progenitoras CD34+, e, quando ativadas, podem produzir altos níveis de citocinas como a IL-15 e quimiocinas. No estágio inicial da maturação, estas células imaturas não expressam receptores inibidores, embora expressem receptores ativadores e uma eficiente atividade citolítica¹³¹.

As células NK originalmente conhecidas pela citotoxicidade, também são fonte importante de citocinas e quimiocinas. A ativação por citocinas, principalmente IL-2, através do receptor de IL-2 (IL2-R) e da cadeia β e o IFN- δ , aumenta sua atividade citotóxica e a capacidade de proliferação celular. A IL-15, que é produzida principalmente por macrófagos, tem um papel importante na ativação celular, aumentando a resposta contra vírus¹³². Essas células tem a capacidade de

provocar um ataque direto às células-alvo e de interagir com as células dendríticas em tecidos periféricos inflamados^{1;2}. Utilizam mecanismos indutores de apoptose, como produção de perforinas e granzinas¹³², bem como a indução de apoptose através de sinalização via membros da família de receptores de necrose tumoral do TNF (fator de necrose tumoral) induzida pela interação Fas/FasL¹³³. Muitas células tumorais não expressam Fas (receptor que se liga a FasL), mas as células NK podem diretamente induzir a expressão de Fas em células tumorais através da secreção de TNF.

Pode ocorrer também o ataque indireto às células-alvo, conforme as características da resposta imune adaptativa¹³⁴.

Citólise pelas NK

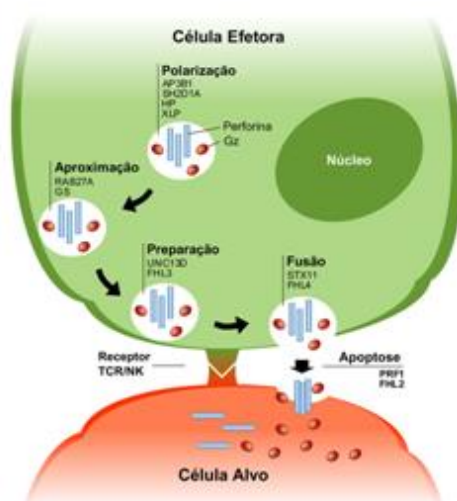


FIGURA 6. Atividade citolítica da célula NK em relação à célula alvo. Produção de perforinas com fusão de membranas e apoptose.

As células NK dividem-se em dois grandes subconjuntos em função do nível de expressão de superfície do CD56¹³⁵ e do CD16^{136; 137}. Os dois marcadores são geralmente expressos reciprocamente nessas células e identificados por citometria de fluxo. Os dois subconjuntos de células NK, são as CD56^{bright} predominantes em tecidos linfóides secundários como os linfonodos, amígdalas e placas de Peyer,

enquanto as NK CD56^{dim}, células maduras, predominantes (90%) no sangue periférico e provenientes das células tronco da medula óssea CD34⁺. As células NK CD56^{bright} do sangue periférico são provavelmente a origem das células CD56^{dim}, pois são as primeiras que aparecem após o transplante de medula óssea^{138; 139}.

É internacionalmente aceito que as células NK CD56^{bright} são a fonte principal de produção de citocinas, enquanto que as CD56^{dim} são responsáveis pela atividade citolítica e importantes no que se refere à morte celular e ao recrutamento de outras células de defesa, estimulando a imunidade natural e a imunidade adaptativa¹⁴⁰. A atividade citolítica e a produção de citocinas pelas células NK estão reguladas pela ativação ou inibição de receptores na superfície da célula¹⁴¹. 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 à lectina (CD94/NKG2A, ligante do HLA-E com função inibidora; e NKG2D, ligante do MICA com função ativadora) e com domínios do tipo imunoglobulina (*Killer Immunoglobulin-like Receptor* – KIR)^{141; 142}. No cromossomo 19, na região 19q13.4 situa-se o *Leukocyte Receptor Complex* (LCR) que compreende mais de 25 genes a partir de inúmeras duplicações pertencentes à superfamília das imunoglobulinas: os receptores semelhantes à imunoglobulina (IgSF), os receptores semelhantes à lectina C e os receptores KIR; todos podem contribuir com sinais inibidores e/ou ativadores¹⁴³. Os receptores de leucócitos com domínio tipo imunoglobulina (*Leukocyte Ig-like Receptors* – LILR) são também expressos em células B e T, não sendo específicos das células NK⁴. Neste trabalho, a atenção está voltada para genes e receptores KIR das células NK.

O melhor entendimento recente sobre as funções das NK favorece expectativas em relação ao uso como forma de terapia antitumoral.

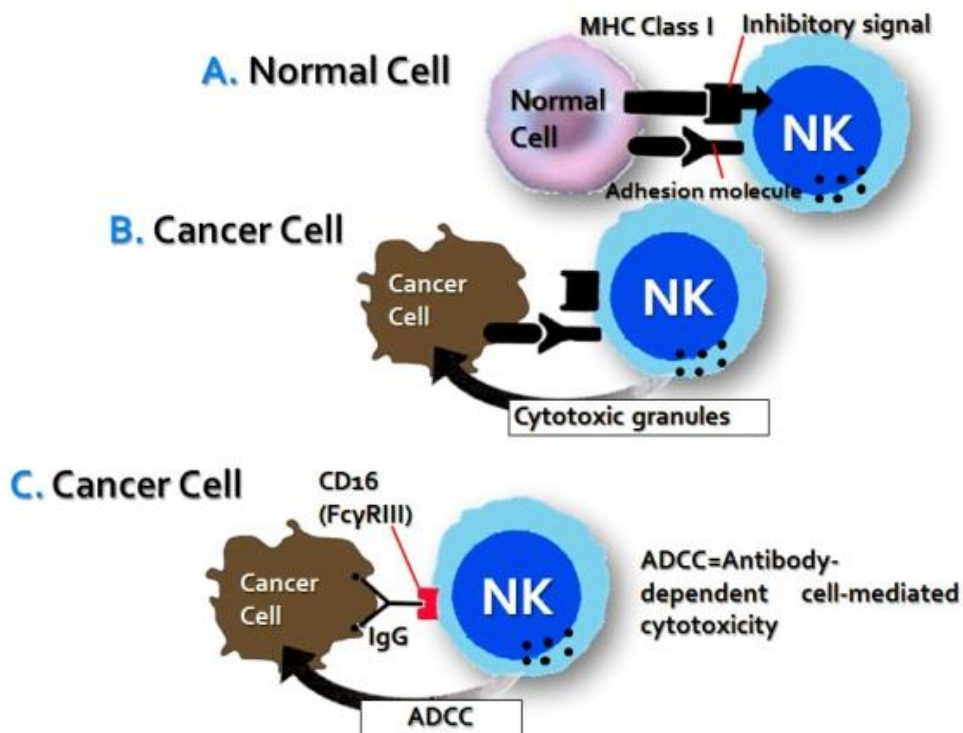


FIGURA 7. A. Atividade inibitória da célula NK em relação a uma célula normal, vê-se o receptor inibidor identificando a molécula HLA de classe I autóloga. B. Célula NK ativada, destruindo por citotoxicidade uma célula tumoral porque essa não apresenta o ligante HLA-Cw respectivo. C. Célula NK destruindo célula tumoral por intermédio do receptor CD16 que identifica anticorpos IgG na membrana da célula alvo (ADCC ou citotoxicidade celular dependente de anticorpos).

1.4 GENES E RECEPTORES KIR

As células NK circulam no sangue em um estado praticamente ativado, preparadas para entrar no tecido infectado quando os macrófagos soarem o alarme. Para mantê-las nesse estado, existe um sistema de receptores que liberam sinais de ativação ou de inibição¹⁴⁴. Os genes que representam os receptores KIR variam de tamanho entre 4 a 6 Kb e podem conter de 4 a 9 exons¹⁴⁵. Eles codificam glicoproteínas localizadas no cromossomo 19q13.4, na região do complexo de receptores leucocitários (LCR)^{146; 147}. Os receptores KIR possuem 17 genes descobertos até o momento sendo divididos em grupos baseados na sua estrutura proteica extra e intracelular¹⁴⁶. Esses receptores da superfície celular apresentam-se semelhantes às imunoglobulinas com dois ou três domínios extracelulares (2D e 3D) usados para ligarem-se a determinantes polimórficos do sistema HLA-A, B e C e aos não clássicos (HLA-E e HLA-G)^{146; 147}.

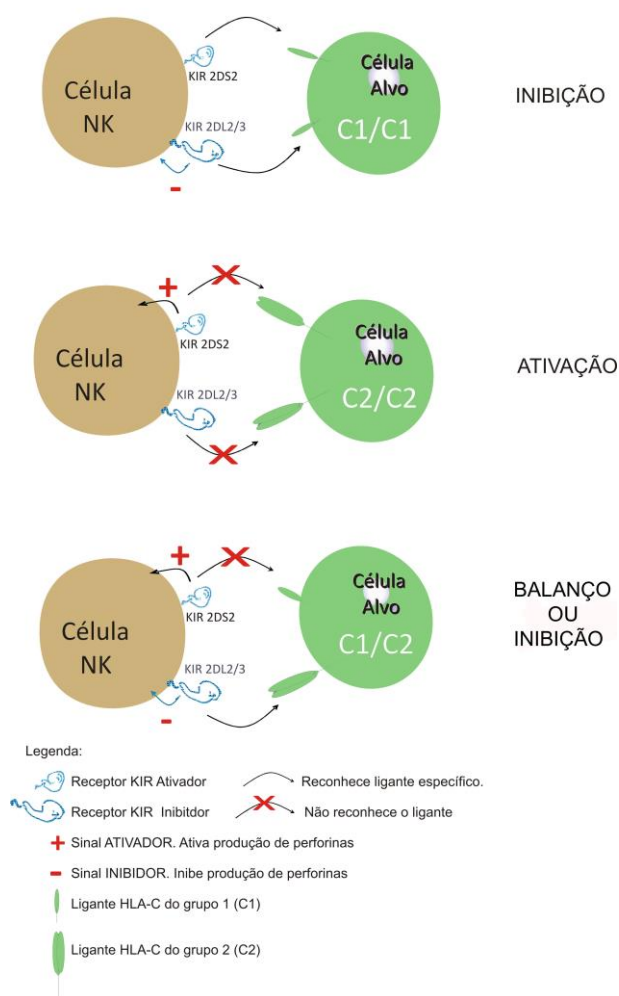


FIGURA 8. Inibição, ativação e balanço ou inibição das células NK por meio do reconhecimento de seus receptores com os ligantes respectivos.

As células NK tornam-se responsáveis pela tolerância em relação a outras células quando seus receptores KIR inibidores identificam moléculas HLA de classe I das células alvo como próprias¹⁴⁸ e desencadeiam sinalização inibitória por intermédio da fosforilação por tirosina kinases de suas sequências intracitoplasmáticas de ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*) ou imunoreceptores inibidores baseados em tirosina¹⁴⁹. Essa fosforilação leva ao recrutamento preferencial de domínios contendo as fosfatases SHP-1 e 2 que levam à supressão dominante dos receptores de ativação¹⁴⁹. A palavra *motif* (motivo), pode ser interpretada como uma resposta intracelular desencadeada por uma sinalização extracelular. Sendo assim, mesmo com a presença de receptores ativadores, o sinal inibidor é traduzido por tolerância, com ausência de citotoxicidade e produção de

citocinas pelas células NK quando a célula alvo for normal¹⁵⁰. Quando as células alvo são infectadas com vírus ou transformadas em tumores, esse ambiente de tolerância é abalado, especialmente pela pouca ou nenhuma expressão de moléculas HLA de classe I. Essa pouca expressão é conhecida como parte do mecanismo de “escape” das células tumorais no enfrentamento com a imunidade adaptativa (linfócitos T e B)¹⁵¹.

As NK são ativadas para citotoxicidade e produção de citocinas, devido exatamente ao mecanismo de escape das células alteradas em relação a nossa imunidade. No caso de ativação não existem moléculas de ITIM, mas, alternativamente existem resíduos transmembrana carregados positivamente, que facilitam a associação física com proteínas acessórias DAP12 que liberam o sinal ativador via ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*-imunorreceptores ativadores baseados em tirosina)¹⁵²; existe também a fosforilação por kinases e recrutamento de ZAP-70, entre outros. Alternativamente, o receptor NKG2D associa-se com a proteína acessória DAP10 para promover ativação via recrutamento da fosfatidil-inositol 3-kinase (PI3K) e Grb2.50. Por meio desse mecanismo complexo, a NK é ativada para a citotoxicidade e liberação de citocinas, podendo destruir as células infectadas ou tumorais. A ação ativadora das NK também cria a possibilidade de haver estímulo à imunidade adaptativa, ativando outras células da resposta imune³.

Receptores KIR são resultado da expressão de um sistema genético bastante polimórfico e estão divididos em grupos funcionais inibidores e ativadores. Os receptores com sinal intracelular inibitório possuem uma cauda intracitoplasmática longa, tendo recebido, por isso, a letra “L” (do inglês *long*) em sua denominação; eles evitam a lise da célula alvo. A denominação da letra “S” (do inglês *short*) foi atribuída aos receptores com cauda curta, eles possuem um sinal intracelular ativador e causam a lise da célula alvo³. Oito receptores KIR são inibidores (2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL5A, 2DL5B, 3DL1, 3DL2 e 3DL3), sete são ativadores (2DL4, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5 e 3DS1) incluindo dois pseudogenes (KIR2DP1 e KIR3DP1). Os genes KIR apresentam grande similaridade molecular entre si e são derivados de um gene ancestral por uma série de duplicações, recombinações e mutações. A estrutura básica dos genes KIR é a de

uma unidade de nove exons que representa o gene ancestral. A única exceção a essa regra é o KIRD2L4, um receptor de ativação que estimula a produção de citocinas, mas sem a função de citotoxicidade¹⁵³.

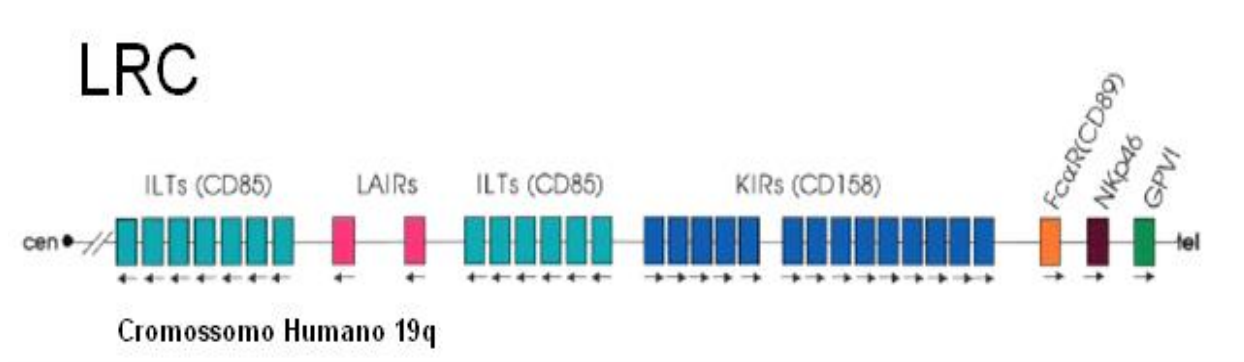


FIGURA 9. Organização do cromossomo 19 e os genes KIR.

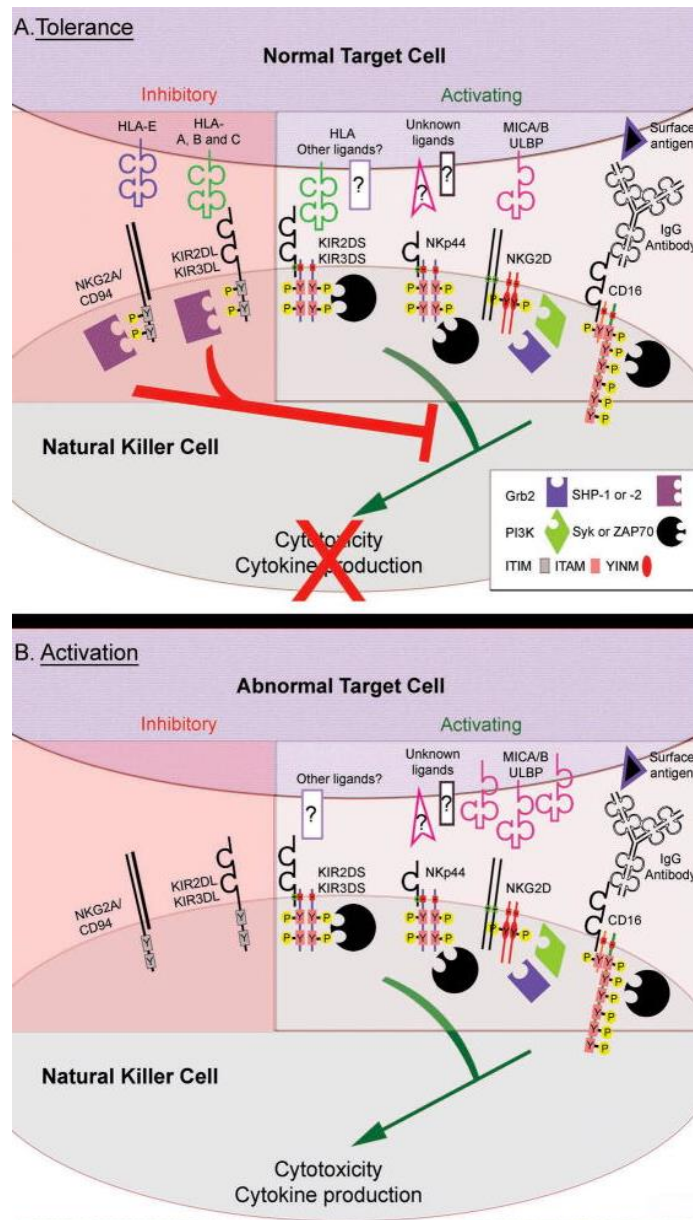


FIGURA 10. Atividade intracitoplasmática relacionada com a inibição e ativação das NKs. Essa atividade é controlada pelo balanço de receptores de ativação e de inibição. Quando a NK encontra uma célula com expressão adequada de antígenos HLA existe tolerância e quando encontrar uma célula tumoral, sem expressão HLA, acontecerá a ativação e destruição do alvo por citotoxicidade e produção de linfocinas. A ativação acontece através da membrana por associação com moléculas acessórias que recrutam moléculas ativadoras sinalizadoras (SyK, ZAP 70, PI3K ou Grb2) que realizam a fosforilação dos motivos citoplasmáticos (ITAM ou imunorreceptor ativador baseado em tirosina) que fazem a mediação dos sinais de ativação. Os receptores inibidores apresentam resíduos de tirosina que ficam fosforilados (ITIM ou imunorreceptor inibidor baseado em tirosina). Essa fosforilação leva ao recrutamento de domínios SH2 e que contêm fosfatases SHP-1 e ou

SHP2 e que predominantemente suprimem o próximo evento de fosforilação, bloqueando o sinal ativador.

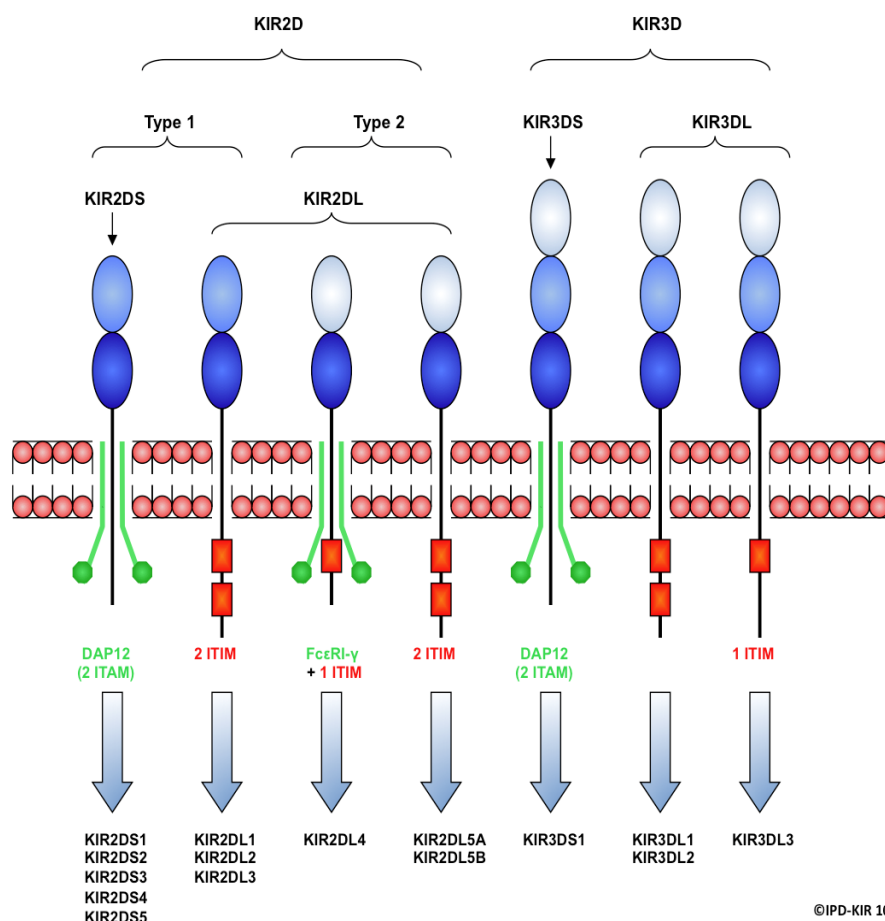


Figura 11. Diferenças na estrutura dos genes KIR, baseadas no número de domínios extracelulares (2D e 3D) e nas caudas intracitoplasmática: curtas (S) que representam os receptores ativadores (ex. KIR2DS1), e nas longas (L) presentes nos receptores inibidores.

1.4.1 DIVERSIDADE HAPLOTÍPICA

Os genes KIR são agrupados na região do cromossomo 19q13.4 do complexo de receptores leucocitários (LCR)¹⁴⁵. Apesar da variação no polimorfismo alélico e de conteúdo, a maioria dos haplótipos KIR pertencem a um dos dois grandes grupos denominados A e B^{154; 155} sendo que a frequência dos haplótipos varia entre as populações. A diferença mais relevante entre esses grupos A e B, com implicações funcionais no reconhecimento das NK, é o número de genes KIR ativadores¹⁵⁶. O haplótipo A tem como característica possuir os genes de receptores

de inibição (2DL1, 2DL3, 2DL4, 3DL1, 3DL2 e 3DL3). O único receptor estimulatório é o KIR2DS4 que é não funcional em muitos indivíduos, além disso, seus produtos não são expressos na membrana celular. No haplótipo B, existem inúmeras combinações de 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS5, 3DS1 e 2DS4, portanto o haplótipo B possui mais genes ativadores, sendo definido pela presença do KIR2DL2 e ausência do KIR3DL1 e KIR2DL3. Os genes estruturais 3DL3, 3DP1, 2DL4, 3DL2 estão presentes em ambos haplótipos, são chamados de genes estruturais ou de “moldura” (*framework*). Em alguns haplótipos, é possível observar-se a falta de algum gene “moldura”¹⁵⁷.

Estudos sugerem que a reatividade da célula NK contra outras células do organismo não acontece em situação normal. Dessa maneira, as células NK que não expressam receptores inibitórios que reconheceriam HLA próprios são pouco responsivas e relativamente tolerantes com as células autólogas. A expressão KIR é restrita às células NK e a algumas células T, conhecidas como NKT.

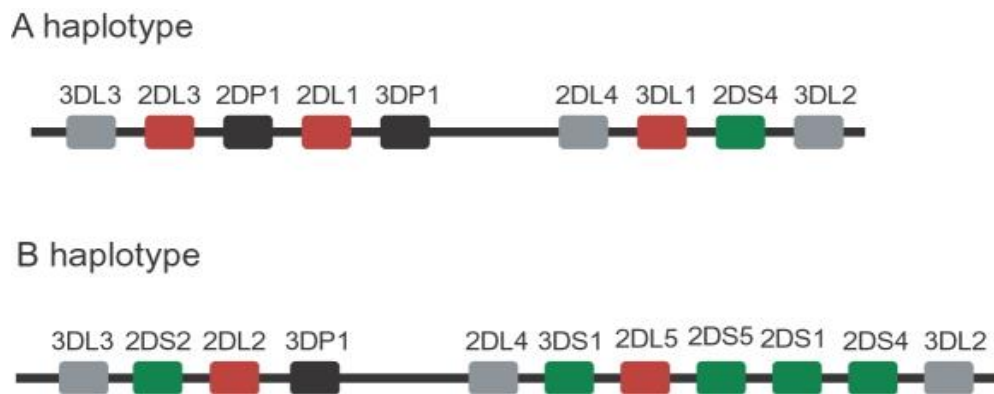


FIGURA 12. O sistema KIR está dividido em diversos haplótipos e que conferem um polimorfismo de interesse na resposta anti-tumoral. Os haplótipos A e B são os mais comuns, sendo que o primeiro só apresenta um gene ativador KIR2DS4 (verde). Os genes em cinza são os genes inibidores e os em preto os genes moldura, encontrados na maioria das pessoas.

1.4.2 LIGANTES DOS RECEPTORES DAS CÉLULAS NK

A atividade da célula NK acontece através dos seus receptores KIR. Eles reconhecem uma célula anormal através de seus receptores de ativação e de seus ligantes, os antígenos leucocitários humanos (*Human Leukocyte Antigen*) HLA de classe I¹⁵⁸. O receptor KIR liga-se no topo da α -hélice e nas regiões expostas dos peptídeos HLA¹⁵⁵; a especificidade dessa interação é definida por um polimorfismo do HLA-Cw na posição 77 e 80¹⁵⁷ e um polimorfismo correspondente na posição 44 do receptor KIR¹⁵⁸. O polimorfismo nos aminoácidos do HLA-Cw define 2 alótipos distintos sorologicamente: O grupo 1 (C1) tem um resíduo de serina na posição 77 (Ser77) e asparagina na posição 80 (Asn80), enquanto o grupo 2 (C2) tem a presença de um resíduo de asparagina na posição 77 (Asn77) e lisina na posição 80 (Lys80)¹⁵⁹. O grupo C1 compreende as especificidades HLA Cw1, 3, 7, 8, enquanto o C2 representa o HLA Cw2, 4, 5, 6 (Tabela 1); esses dois grupos diferenciaram-se durante a evolução¹⁶⁰. Na primeira fase da evolução humana formou-se o HLA-C cuja origem é mais recente que a do HLA A e HLA-B, servindo de uma forma mais especializada como ligante do KIR nas células NK, sendo os do grupo C1 os primeiros ligantes¹⁶¹. Na segunda fase ocorreu uma mutação do Asn80 para Lys80 na molécula de HLA do grupo C1, produzindo o primeiro ligante do grupo C2¹⁶². A Lys80 é, portanto, uma característica específica do HLA-C, enquanto a Asn está também presente no HLA-B e em outras moléculas do HLA classe I.

Os receptores KIR, por sua vez, diferenciam-se em dois grupos de ligantes. O primeiro grupo possui resíduo de lisina na posição 44 do domínio D1, e corresponde aos receptores KIR2DS2, KIR2DL2 e KIR2DL3¹⁴⁴; esses reconhecem o C1 do HLA-Cw. O segundo grupo (KIR2DS1 e KIR2DL1) possui uma metionina nessa posição, reconhecendo o C2^{163; 164} (Figura 2). O KIR2DL1/2/3, como um grupo, pode inibir a lise de qualquer célula alvo expressando qualquer HLA-C.

O loco HLA-B pode ser dividido em dois grupos: Bw4 e Bw6. O KIR3DL1 interage com moléculas HLA-B quando sorologicamente forem Bw4, sendo que, se essas apresentarem isoleucina (Ile) na posição 80, acontece a maior inibição de lise mediada pela célula NK^{165; 166}. Não se conhecem interações de alta afinidade moléculas Bw6. O KIR3DL2 liga-se ao HLA-A3 e A11¹⁶⁴. A molécula 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. O KIR2DL4 é um gene estrutural ou de “moldura” presente em quase todos os indivíduos, entretanto não se expressa em cerca de 50% das pessoas, o que sugere que esse gene pode estar sujeito a algum tipo de seleção¹⁶⁷.

TABELA 1. Receptores KIR e seus ligantes específicos

Receptor KIR	Ligante específico
KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DS2	Grupo 1 (HLA Cw1, 3, 7, 8)
KIR2DL1 e KIR2DS1	Grupo 2 (HLA Cw2, 4, 5, 6)
KIR3DL2	HLA-A 03, A11
KIR2DL4	HLA-G

Os receptores KIR podem mediar a “educação” das células NK. Existe um potencial para a geração de células NK auto-reativas devido a duas razões. A primeira é em função de o KIR e seus ligantes serem herdados independentemente e a segunda é que a expressão dos receptores ativadores e inibidores numa célula NK individual parece ser um processo randômico. De fato, existem células NK circulantes que não têm KIR inibidores para seu próprio reconhecimento e podem mediar a autoimunidade¹⁶⁸. Ao invés destas células serem clonalmente deletadas, elas podem permanecer hiporesponsivas através de um processo de “licença” durante o desenvolvimento^{169; 170}.

Embora um completo entendimento da função das NK não seja conhecido, a resposta dessas células é adquirida de uma maneira finamente regulada pelas interações KIR-KIR ligantes durante o desenvolvimento. Como exemplo, no caso de as células NK possuírem dois KIRs inibidores específicos para seu HLA, elas terão sinais de inibição mais potentes quando identificarem suas próprias células^{169; 170; 171; 172; 173; 174}.

Entretanto, elas também possuirão uma maior ativação e citotoxicidade quando detectarem células com falhas na expressão HLA, como acontece nas infecções virais e nas células transformadas por tumores, se as comparamos com células portadoras de apenas um ou nenhum KIR inibidor^{169; 174; 175; 176; 177; 178; 179; 180}. Trata-se de um processo dinâmico, no qual a célula NK tem “licença para matar” em um ambiente onde o HLA é funcionalmente, ou mesmo, patologicamente, mal representado^{169; 174; 181; 182; 183; 184}.

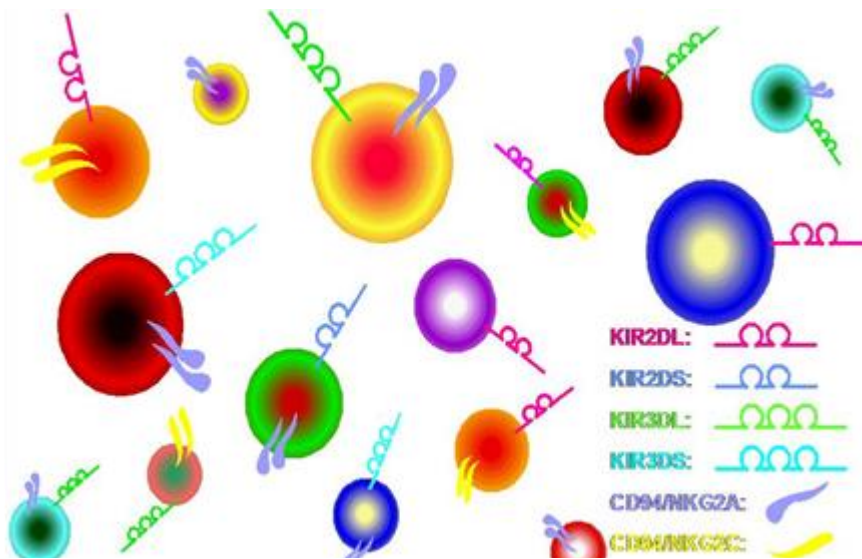


FIGURA 13. Diversidade de células NK permitindo o reconhecimento das células normais ou alteradas, pelos inúmeros receptores ativadores e inibidores e sua relação com as moléculas ligantes (HLA).

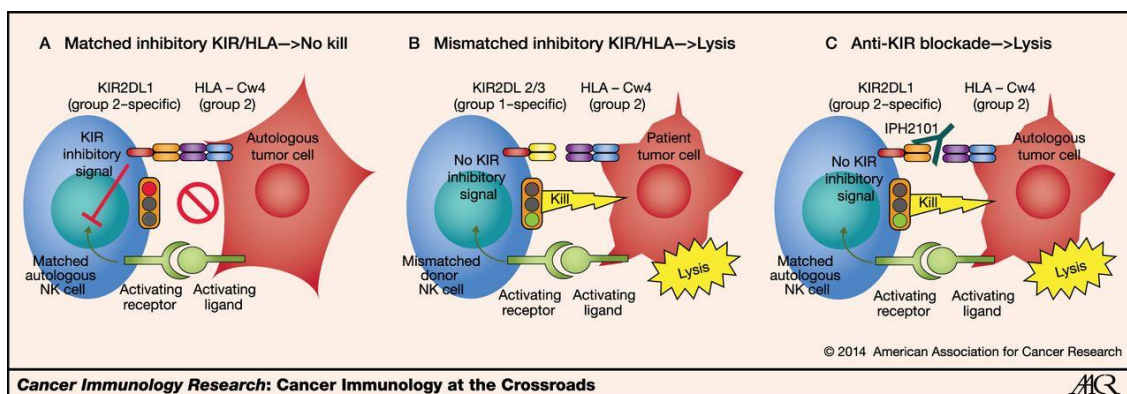


FIGURA 14. A) Modelo de inibição da célula NK quando identifica o ligante HLA do mesmo grupo 2 do HLA-C expresso pela célula tumoral autóloga; B) ativação com destruição da célula tumoral por incompatibilidade do receptor KIR (grupo específico C1) com o ligante HLA (grupo C2); C) destruição da célula tumoral pelo bloqueio com anticorpo monoclonal IPH2101 do receptor de inibição, permitindo os receptores de ativação agirem, lisando a célula maligna.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

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

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a frequência dos diversos polimorfismos dos genes KIR através do método PCR-SSO e PCR-SSP em pacientes com câncer de mama e grupo controle.
- Avaliar a frequência dos diversos polimorfismos dos genes HLA C1 e C2 através do método PCR-SSO e PCR-SSP em pacientes com câncer de mama e grupo controle.

3 REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

- ¹ HAMERMAN, J. A.; OGASAWARA, K.; LANIER, L. L. NK cells in innate immunity. **Curr Opin Immunol**, v. 17, n. 1, p. 29-35, Feb 2005. ISSN 0952-7915. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15653307> >.
- ² 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> >.
- ³ 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> >.
- ⁴ 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> >.
- ⁵ PERUSSIA, B. The Cytokine Profile of Resting and Activated NK Cells. **Methods**, v. 9, n. 2, p. 370-8, Apr 1996. ISSN 1095-9130. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8812690> >.
- ⁶ SEAMAN, W. E. Natural killer cells and natural killer T cells. **Arthritis Rheum**, v. 43, n. 6, p. 1204-17, Jun 2000. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10857779> >.
- ⁷ 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> >.
- ⁸ JOBIM, M. et al. A study of the killer cell immunoglobulin-like receptor gene KIR2DS1 in a Caucosoid 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> >.
- ⁹ 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> >.
- ¹⁰ 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> >.

- 11 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> >.
- 12 MOMOT, T. et al. Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with scleroderma. **Arthritis Rheum**, v. 50, n. 5, p. 1561-5, May 2004. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15146426> >.
- 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 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> >.
- 17 _____. Association of killer cell immunoglobulin-like receptors and human leukocyte antigen-C genotypes in South Brazilian with type 1 diabetes. **Hum Immunol**, v. 71, n. 8, p. 799-803, Aug 2010. ISSN 1879-1166. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20580654> >.
- 18 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> >.
- 19 _____. Autoimmune rheumatic diseases and their association with killer immunoglobulin-like receptor genes. **Rev Bras Reumatol**, v. 51, n. 4, p. 351-6, 362-4, 2011 Jul-Aug 2011. ISSN 1809-4570. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21779711> >.
- 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. 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> >.
- 22 BESSON, C. et al. Association of killer cell immunoglobulin-like receptor genes with Hodgkin's lymphoma in a familial study. **PLoS One**, v. 2, n. 5, p. e406, 2007. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17476328> >.
- 23 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> >.
- 24 STEIN, M. N. et al. Antibody-dependent cell cytotoxicity to breast cancer targets despite inhibitory KIR signaling. **Anticancer Res**, v. 26, n. 3A, p. 1759-63, 2006 May-Jun 2006. ISSN 0250-7005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16827104> >.
- 25 OZTURK, O. G.; GUN, F. D.; POLAT, G. Killer cell immunoglobulin-like receptor genes in patients with breast cancer. **Med Oncol**, v. 29, n. 2, p. 511-5, Jun 2012. ISSN 1559-131X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21479698> >.
- 26 INCA, I. N. D. C. Câncer de Mama. 2014. Acesso em: Fevereiro de 2014.
- 27 SOCIETY, A. C. Breast Cancer Facts & Figures 2013-2014. 2013. Acesso em: abril de 2014.
- 28 PAAP, E. et al. Breast cancer screening halves the risk of breast cancer death: A case-referent study. **Breast**, Apr 2014. ISSN 1532-3080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24713277> >.
- 29 PACE, L. E.; KEATING, N. L. A systematic assessment of benefits and risks to guide breast cancer screening decisions. **JAMA**, v. 311, n. 13, p. 1327-35, Apr 2014. ISSN 1538-3598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24691608> >.
- 30 HORTOBAGYI, G. N. et al. The global breast cancer burden: variations in epidemiology and survival. **Clin Breast Cancer**, v. 6, n. 5, p. 391-401, Dec 2005. ISSN 1526-8209. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16381622> >.
- 31 ANOTHASINTAWEE, T. et al. Risk factors of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **Asia Pac J Public Health**, v. 25, n. 5, p. 368-87, Sep 2013. ISSN 1941-2479. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23709491> >.
- 32 PATHAK, D. R.; OSUCH, J. R.; HE, J. Breast carcinoma etiology: current knowledge and new insights into the effects of reproductive and hormonal risk factors in black and white populations. **Cancer**, v. 88, n. 5 Suppl, p. 1230-8, Mar 2000. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10705360> >.
- 33 KHOO, S. K.; CHICK, P. Sex steroid hormones and breast cancer: is there a link with oral contraceptives and hormone replacement therapy? **Med J Aust**, v. 156, n. 2, p.

- 124-32, Jan 1992. ISSN 0025-729X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1736053> >.
- 34 FENTIMAN, I. S. 20. Oral contraceptives, hormone replacement therapy and breast cancer. **Int J Clin Pract**, v. 56, n. 10, p. 755-9, Dec 2002. ISSN 1368-5031. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12510949> >.
- 35 MOORE, D. H.; MOORE, C. T. Breast carcinoma etiological factors. **Adv Cancer Res**, v. 40, p. 189-253, 1983. ISSN 0065-230X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6362356> >.
- 36 TURNBULL, C.; RAHMAN, N. Genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, v. 9, p. 321-45, 2008. ISSN 1527-8204. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18544032> >.
- 37 MAVADDAT, N. et al. Genetic susceptibility to breast cancer. **Mol Oncol**, v. 4, n. 3, p. 174-91, Jun 2010. ISSN 1878-0261. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20542480> >.
- 38 LYNCH, H. T. et al. Hereditary breast-ovarian cancer at the bedside: role of the medical oncologist. **J Clin Oncol**, v. 21, n. 4, p. 740-53, Feb 2003. ISSN 0732-183X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12586815> >.
- 39 CAREY, L. A. et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. **JAMA**, v. 295, n. 21, p. 2492-502, Jun 2006. ISSN 1538-3598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16757721> >.
- 40 CAPALBO, C. et al. BRCA1 and BRCA2 genetic testing in Italian breast and/or ovarian cancer families: mutation spectrum and prevalence and analysis of mutation prediction models. **Ann Oncol**, v. 17 Suppl 7, p. vii34-40, Jun 2006. ISSN 1569-8041. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16760289> >.
- 41 MOLYNEUX, G.; SMALLEY, M. J. The cell of origin of BRCA1 mutation-associated breast cancer: a cautionary tale of gene expression profiling. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 16, n. 1, p. 51-5, Apr 2011. ISSN 1573-7039. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21336547> >.
- 42 BURGESS, M.; PUHALLA, S. BRCA 1/2-Mutation Related and Sporadic Breast and Ovarian Cancers: More Alike than Different. **Front Oncol**, v. 4, p. 19, 2014. ISSN 2234-943X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24579064> >.
- 43 DUMITRESCU, R. G.; COTARLA, I. Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? **J Cell Mol Med**, v. 9, n. 1, p. 208-21, Jan-Mar 2005. ISSN 1582-1838 (Print)1582-1838. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 44 RODENHISER, D.; MANN, M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. **CMAJ**, v. 174, n. 3, p. 341-8, Jan 2006. ISSN 1488-2329. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16446478> >.
- 45 GARCIA-CLOSAS, M. et al. Heterogeneity of breast cancer associations with five

- susceptibility loci by clinical and pathological characteristics. **PLoS Genet**, v. 4, n. 4, p. e1000054, Apr 2008. ISSN 1553-7404. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18437204> >.
- 46 BIÈCHE, I. et al. Two distinct regions involved in 1p deletion in human primary breast cancer. **Cancer Res**, v. 53, n. 9, p. 1990-4, May 1993. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8097672> >.
- 47 BECKMANN, M. W. et al. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. **J Mol Med (Berl)**, v. 75, n. 6, p. 429-39, Jun 1997. ISSN 0946-2716. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9231883> >.
- 48 BAŁ, A. et al. A risk of breast cancer in women - carriers of constitutional CHEK2 gene mutations, originating from the North - Central Poland. **Hered Cancer Clin Pract**, v. 12, n. 1, p. 10, 2014. ISSN 1731-2302. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24713400> >.
- 49 WEINBERG, R. A. Tumor suppressor genes. **Science**, v. 254, n. 5035, p. 1138-46, Nov 1991. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1659741> >.
- 50 EROLES, P. et al. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer Treat Rev**, v. 38, n. 6, p. 698-707, Oct 2012. ISSN 1532-1967. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22178455> >.
- 51 SOLOMON, H.; MADAR, S.; ROTTER, V. Mutant p53 gain of function is interwoven into the hallmarks of cancer. **J Pathol**, v. 225, n. 4, p. 475-8, Dec 2011. ISSN 1096-9896. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22025211> >.
- 52 ABD EL-REHIM, D. M. et al. High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses. **Int J Cancer**, v. 116, n. 3, p. 340-50, Sep 2005. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15818618> >.
- 53 AMBROGI, F. et al. Molecular subtyping of breast cancer from traditional tumor marker profiles using parallel clustering methods. **Clin Cancer Res**, v. 12, n. 3 Pt 1, p. 781-90, Feb 2006. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16467089> >.
- 54 NIEPEL, M. et al. Analysis of growth factor signaling in genetically diverse breast cancer lines. **BMC Biol**, v. 12, n. 1, p. 20, 2014. ISSN 1741-7007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24655548> >.
- 55 POLYAK, K. Heterogeneity in breast cancer. **J Clin Invest**, v. 121, n. 10, p. 3786-8, Oct 2011. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21965334> >.
- 56 FLOOR, S. L. et al. Hallmarks of cancer: of all cancer cells, all the time? **Trends Mol**

- Med**, v. 18, n. 9, p. 509-15, Sep 2012. ISSN 1471-499X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22795735> >.
- 57 HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 4 2011. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013> >.
- 58 SONNENSCHNEIN, C.; SOTO, A. M. The aging of the 2000 and 2011 Hallmarks of Cancer reviews: a critique. **J Biosci**, v. 38, n. 3, p. 651-63, Sep 2013. ISSN 0973-7138. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23938395> >.
- 59 MATSEN, C. B.; NEUMAYER, L. A. Breast cancer: a review for the general surgeon. **JAMA Surg**, v. 148, n. 10, p. 971-9, Oct 2013. ISSN 2168-6262. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23986370> >.
- 60 GOLDHIRSCH, A. Personalized adjuvant therapies: lessons from the past: the opening address by the St. Gallen 2013 award recipient. **Breast**, v. 22 Suppl 2, p. S3-7, Aug 2013. ISSN 1532-3080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24074788> >.
- 61 ZELNAK, A. B. Special considerations in early-stage breast cancer patients and survivors. **Obstet Gynecol Clin North Am**, v. 40, n. 3, p. 573-82, Sep 2013. ISSN 1558-0474. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24021258> >.
- 62 DEL BARCO, S. et al. SEOM clinical guidelines for the systemic treatment of early breast cancer 2013. **Clin Transl Oncol**, v. 15, n. 12, p. 1011-7, Dec 2013. ISSN 1699-3055. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23979909> >.
- 63 HAVILAND, J. S. et al. The UK Standardisation of Breast Radiotherapy (START) trials of radiotherapy hypofractionation for treatment of early breast cancer: 10-year follow-up results of two randomised controlled trials. **Lancet Oncol**, v. 14, n. 11, p. 1086-94, Oct 2013. ISSN 1474-5488. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24055415> >.
- 64 ORECCHIA, R.; LEONARDI, M. C. Partial breast irradiation: targeting volume or breast molecular subtypes? **Breast**, v. 22 Suppl 2, p. S137-40, Aug 2013. ISSN 1532-3080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24074774> >.
- 65 GIPPONI, M. et al. Sentinel lymph node as a new marker for therapeutic planning in breast cancer patients. **J Surg Oncol**, v. 85, n. 3, p. 102-11, Mar 2004. ISSN 0022-4790. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14991881> >.
- 66 DELPECH, Y.; BARRANGER, E. [Breast cancer surgery]. **Rev Prat**, v. 63, n. 10, p. 1395-9, Dec 2013. ISSN 0035-2640. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24579336> >.
- 67 HERNANDEZ-AYA, L. F.; GONZALEZ-ANGULO, A. M. Adjuvant systemic therapies in breast cancer. **Surg Clin North Am**, v. 93, n. 2, p. 473-91, Apr 2013. ISSN 1558-3171. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23464697> >.

- 68 VODUC, K. D. et al. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 10, p. 1684-91, Apr 2010. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20194857> >.
- 69 LIAO, Z. et al. Locoregional irradiation for inflammatory breast cancer: effectiveness of dose escalation in decreasing recurrence. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 47, n. 5, p. 1191-200, Jul 2000. ISSN 0360-3016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10889372> >.
- 70 BRISTOL, I. J. et al. Locoregional treatment outcomes after multimodality management of inflammatory breast cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 72, n. 2, p. 474-84, Oct 2008. ISSN 0360-3016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18439768> >.
- 71 VAN HERK-SUKEL, M. P. et al. Major changes in chemotherapy regimens administered to breast cancer patients during 2000-2008 in the Netherlands. **Breast J**, v. 19, n. 4, p. 394-401, 2013 Jul-Aug 2013. ISSN 1524-4741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23663128> >.
- 72 VON MINCKWITZ, G. et al. Lessons from the neoadjuvant setting on how best to choose adjuvant therapies. **Breast**, v. 20 Suppl 3, p. S142-5, Oct 2011. ISSN 1532-3080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22015282> >.
- 73 _____. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. **J Clin Oncol**, v. 30, n. 15, p. 1796-804, May 2012. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22508812> >.
- 74 CAZAP, E. et al. Breast cancer in Latin America: experts perceptions compared with medical care standards. **Breast**, v. 19, n. 1, p. 50-4, Feb 2010. ISSN 1532-3080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19945878> >.
- 75 BERGH, J. et al. A systematic overview of chemotherapy effects in breast cancer. **Acta Oncol**, v. 40, n. 2-3, p. 253-81, 2001. ISSN 0284-186X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11441936> >.
- 76 Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. **Lancet**, v. 351, n. 9114, p. 1451-67, May 1998. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9605801> >.
- 77 Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. **Lancet**, v. 352, n. 9132, p. 930-42, Sep 1998. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9752815> >.
- 78 CLARKE, M. et al. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. **Lancet**, v. 366, n. 9503, p. 2087-106, Dec 2005. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16360786> >.

- 79 LI, J. et al. Triple-negative subtype predicts poor overall survival and high locoregional relapse in inflammatory breast cancer. **Oncologist**, v. 16, n. 12, p. 1675-83, 2011. ISSN 1549-490X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22147002> >.
- 80 EASTON, D. F. et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. **Nature**, v. 447, n. 7148, p. 1087-93, Jun 2007. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17529967> >.
- 81 PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747-52, Aug 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10963602> >.
- 82 GREEN, A. R. et al. Identification of key clinical phenotypes of breast cancer using a reduced panel of protein biomarkers. **Br J Cancer**, v. 109, n. 7, p. 1886-94, Oct 2013. ISSN 1532-1827. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24008658> >.
- 83 SORLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 19, p. 10869-74, Sep 11 2001. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.191367098> >.
- 84 PEINTINGER, F. Using molecular profiles to tailor treatment in breast cancer: are they ready for prime time? **Curr Opin Obstet Gynecol**, v. 26, n. 1, p. 21-6, Feb 2014. ISSN 1473-656X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24346126> >.
- 85 HUBER, K. E.; CAREY, L. A.; WAZER, D. E. Breast cancer molecular subtypes in patients with locally advanced disease: impact on prognosis, patterns of recurrence, and response to therapy. **Semin Radiat Oncol**, v. 19, n. 4, p. 204-10, Oct 2009. ISSN 1053-4296. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.semradonc.2009.05.004> >.
- 86 SORLIE, T. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 14, p. 8418-23, Jul 8 2003. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0932692100> >.
- 87 PARKER, J. S. et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 8, p. 1160-7, Mar 2009. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19204204> >.
- 88 MATSUBARA, N. et al. Different prognostic significance of Ki-67 change between pre- and post-neoadjuvant chemotherapy in various subtypes of breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 137, n. 1, p. 203-12, Jan 2013. ISSN 1573-7217. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23184081> >.
- 89 NGUYEN, P. L. et al. Breast cancer subtype approximated by estrogen receptor, progesterone receptor, and HER-2 is associated with local and distant recurrence after

- breast-conserving therapy. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 14, p. 2373-8, May 2008. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18413639> >.
- 90 ALBERT, J. M. et al. Estrogen/progesterone receptor negativity and HER2 positivity predict locoregional recurrence in patients with T1a,bN0 breast cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 77, n. 5, p. 1296-302, Aug 2010. ISSN 1879-355X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20472353> >.
- 91 BUYSE, M. et al. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 98, n. 17, p. 1183-92, Sep 2006. ISSN 1460-2105. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16954471> >.
- 92 NETWORK, C. G. A. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 61-70, Oct 2012. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23000897> >.
- 93 DE RUIJTER, T. C. et al. Characteristics of triple-negative breast cancer. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 137, n. 2, p. 183-92, Feb 2011. ISSN 1432-1335. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21069385> >.
- 94 LI, S. G.; LI, L. Targeted therapy in HER2-positive breast cancer. **Biomed Rep**, v. 1, n. 4, p. 499-505, Jul 2013. ISSN 2049-9434. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24648975> >.
- 95 DALENC, F. [Medical treatment of breast cancer: chemotherapy and tailored therapy]. **Rev Prat**, v. 63, n. 10, p. 1408-14, Dec 2013. ISSN 0035-2640. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24579340> >.
- 96 COTTU, P. [Breast cancer adjuvant endocrine treatment]. **Rev Prat**, v. 63, n. 10, p. 1404-7, Dec 2013. ISSN 0035-2640. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24579339> >.
- 97 OLSON, E.; MULLINS, D. When Standard Therapy Fails in Breast Cancer: Current and Future Options for HER2-Positive Disease. **J Clin Trials**, v. 3, p. 1000129, Mar 2013. ISSN 2167-0870. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24527366> >.
- 98 FIGUEROA-MAGALHÃES, M. C. et al. Treatment of HER2-positive breast cancer. **Breast**, v. 23, n. 2, p. 128-136, Apr 2014. ISSN 1532-3080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24360619> >.
- 99 LIN, N. U. et al. International guidelines for management of metastatic breast cancer (MBC) from the European School of Oncology (ESO)-MBC Task Force: Surveillance, staging, and evaluation of patients with early-stage and metastatic breast cancer. **Breast**, v. 22, n. 3, p. 203-10, Jun 2013. ISSN 1532-3080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23601761> >.
- 100 GRAHAM, L. J. et al. Current Approaches and Challenges in Monitoring Treatment Responses in Breast Cancer. **J Cancer**, v. 5, n. 1, p. 58-68, 2014. ISSN 1837-9664.

- Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24396498> >.
- 101 CARLSON, R. W. et al. Treatment of breast cancer in countries with limited resources. **Breast J**, v. 9 Suppl 2, p. S67-74, 2003 May-Jun 2003. ISSN 1075-122X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12713499> >.
- 102 O'TOOLE, S. A. et al. Therapeutic targets in triple negative breast cancer. **J Clin Pathol**, v. 66, n. 6, p. 530-42, Jun 2013. ISSN 1472-4146. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23436929> >.
- 103 SOLIMAN, H. Immunotherapy strategies in the treatment of breast cancer. **Cancer Control**, v. 20, n. 1, p. 17-21, Jan 2013. ISSN 1526-2359. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23302903> >.
- 104 RODY, A. et al. T-cell metagene predicts a favorable prognosis in estrogen receptor-negative and HER2-positive breast cancers. **Breast Cancer Res**, v. 11, n. 2, p. R15, 2009. ISSN 1465-542X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19272155> >.
- 105 ASCIERTO, M. L. et al. A signature of immune function genes associated with recurrence-free survival in breast cancer patients. **Breast Cancer Res Treat**, v. 131, n. 3, p. 871-80, Feb 2012. ISSN 1573-7217. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21479927> >.
- 106 YAU, C. et al. A multigene predictor of metastatic outcome in early stage hormone receptor-negative and triple-negative breast cancer. **Breast Cancer Res**, v. 12, n. 5, p. R85, 2010. ISSN 1465-542X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20946665> >.
- 107 DENARDO, D. G. et al. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. **Cancer Discov**, v. 1, n. 1, p. 54-67, Jun 2011. ISSN 2159-8290. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22039576> >.
- 108 DENKERT, C. et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 1, p. 105-13, Jan 2010. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19917869> >.
- 109 ZITVOGEL, L.; KEPP, O.; KROEMER, G. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 8, n. 3, p. 151-60, Mar 2011. ISSN 1759-4782. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21364688> >.
- 110 DEMARIA, S. et al. Development of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer after neoadjuvant paclitaxel chemotherapy. **Clin Cancer Res**, v. 7, n. 10, p. 3025-30, Oct 2001. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11595690> >.
- 111 TSAVARIS, N. et al. Immune changes in patients with advanced breast cancer

- undergoing chemotherapy with taxanes. **Br J Cancer**, v. 87, n. 1, p. 21-7, Jul 2002. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12085250> >.
- 112 EMENS, L. A. et al. Timed sequential treatment with cyclophosphamide, doxorubicin, and an allogeneic granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-secreting breast tumor vaccine: a chemotherapy dose-ranging factorial study of safety and immune activation. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 35, p. 5911-8, Dec 2009. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19805669> >.
- 113 BAROK, M. et al. Trastuzumab causes antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediated growth inhibition of submacroscopic JIMT-1 breast cancer xenografts despite intrinsic drug resistance. **Mol Cancer Ther**, v. 6, n. 7, p. 2065-72, Jul 2007. ISSN 1535-7163. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17620435> >.
- 114 ARNOULD, L. et al. Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? **Br J Cancer**, v. 94, n. 2, p. 259-67, Jan 30 2006. ISSN 0007-0920 (Print)0007-0920. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6602930> >.
- 115 MUSOLINO, A. et al. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 11, p. 1789-96, Apr 2008. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18347005> >.
- 116 MATSUMURA, S. et al. Radiation-induced CXCL16 release by breast cancer cells attracts effector T cells. **J Immunol**, v. 181, n. 5, p. 3099-107, Sep 2008. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18713980> >.
- 117 REITS, E. A. et al. Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. **J Exp Med**, v. 203, n. 5, p. 1259-71, May 2006. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16636135> >.
- 118 DEWAN, M. Z. et al. Fractionated but not single-dose radiotherapy induces an immune-mediated abscopal effect when combined with anti-CTLA-4 antibody. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 17, p. 5379-88, Sep 1 2009. ISSN 1078-0432 (Print)1078-0432. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-09-0265> >.
- 119 SOLIMAN, H. Developing an effective breast cancer vaccine. **Cancer Control**, v. 17, n. 3, p. 183-90, Jul 2010. ISSN 1526-2359. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20664516> >.
- 120 SHARMA, A. et al. HER-2 pulsed dendritic cell vaccine can eliminate HER-2 expression and impact ductal carcinoma in situ. **Cancer**, v. 118, n. 17, p. 4354-62, Sep 2012. ISSN 1097-0142. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22252842> >.
- 121 MOHEBTASH, M. et al. A pilot study of MUC-1/CEA/TRICOM poxviral-based

- vaccine in patients with metastatic breast and ovarian cancer. **Clin Cancer Res**, v. 17, n. 22, p. 7164-73, Nov 2011. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22068656> >.
- 122 ANTONIA, S. J. et al. Combination of p53 cancer vaccine with chemotherapy in patients with extensive stage small cell lung cancer. **Clin Cancer Res**, v. 12, n. 3 Pt 1, p. 878-87, Feb 2006. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16467102> >.
- 123 GHEBEH, H. et al. FOXP3+ Tregs and B7-H1+/PD-1+ T lymphocytes co-infiltrate the tumor tissues of high-risk breast cancer patients: Implication for immunotherapy. **BMC Cancer**, v. 8, p. 57, 2008. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18294387> >.
- 124 MAO, H. et al. New insights of CTLA-4 into its biological function in breast cancer. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 10, n. 7, p. 728-36, Nov 2010. ISSN 1873-5576. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20578982> >.
- 125 LEE, S. et al. Optimized combination therapy using bortezomib, TRAIL and TLR agonists in established breast tumors. **Cancer Immunol Immunother**, v. 59, n. 7, p. 1073-81, Jul 2010. ISSN 1432-0851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20213120> >.
- 126 KIESSLING, R. et al. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. **Eur J Immunol**, v. 5, n. 2, p. 117-21, Feb 1975. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1086218> >.
- 127 KÄRRE, K. et al. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. **Nature**, v. 319, n. 6055, p. 675-8, 1986 Feb 20-26 1986. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3951539> >.
- 128 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> >.
- 129 MACFARLANE, A. W.; CAMPBELL, K. S. Signal transduction in natural killer cells. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 298, p. 23-57, 2006. ISSN 0070-217X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16329184> >.
- 130 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. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12894845> >.
- 131 VIVIER, E. et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. **Science**, v. 331, n. 6013, p. 44-9, Jan 2011. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21212348> >.

- 132 TRAPANI, J. A.; SMYTH, M. J. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 10, p. 735-47, Oct 2002. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12360212> >.
- 133 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> >.
- 134 SUN, J. C.; BEILKE, J. N.; LANIER, L. L. Adaptive immune features of natural killer cells. **Nature**, v. 457, n. 7229, p. 557-61, Jan 2009. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19136945> >.
- 135 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> >.
- 136 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> >.
- 137 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> >.
- 138 JACOBS, R. et al. CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. **Eur J Immunol**, v. 31, n. 10, p. 3121-7, Oct 2001. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11592089> >.
- 139 SCHEPIS, D. et al. Increased proportion of CD56bright natural killer cells in active and inactive systemic lupus erythematosus. **Immunology**, v. 126, n. 1, p. 140-6, Jan 2009. ISSN 1365-2567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18564343> >.
- 140 FEHNIGER, T. A. et al. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. **Blood**, v. 101, n. 8, p. 3052-7, Apr 2003. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12480696> >.
- 141 JONCKER, N. T.; RAULET, D. H. Regulation of NK cell responsiveness to achieve self-tolerance and maximal responses to diseased target cells. **Immunol Rev**, v. 224, p. 85-97, Aug 2008. ISSN 1600-065X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18759922> >.
- 142 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> >.

- 143 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> >.
- 144 MORETTA, L. et al. Human NK-cell receptors. **Immunol Today**, v. 21, n. 9, p. 420-2, Sep 2000. ISSN 0167-5699. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10953091> >.
- 145 MORETTA, A. et al. A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3-CD16+ natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic function. **J Exp Med**, v. 171, n. 3, p. 695-714, Mar 1990. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2137855> >.
- 146 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> >.
- 147 BOYINGTON, J. C.; BROOKS, A. G.; SUN, P. D. Structure of killer cell immunoglobulin-like receptors and their recognition of the class I MHC molecules. **Immunol Rev**, v. 181, p. 66-78, Jun 2001. ISSN 0105-2896. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11513153> >.
- 148 LONG, E. O. Negative signaling by inhibitory receptors: the NK cell paradigm. **Immunol Rev**, v. 224, p. 70-84, Aug 2008. ISSN 1600-065X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18759921> >.
- 149 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> >.
- 150 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> >.
- 151 MCVICAR, D. W.; BURSHTYN, D. N. Intracellular signaling by the killer immunoglobulin-like receptors and Ly49. **Sci STKE**, v. 2001, n. 75, p. re1, Mar 2001. ISSN 1525-8882. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11752646> >.
- 152 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> >.
- 153 WILSON, M. J.; TORKAR, M.; TROWSDALE, J. Genomic organization of a human killer cell inhibitory receptor gene. **Tissue Antigens**, v. 49, n. 6, p. 574-9, Jun 1997. ISSN 0001-2815. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9234478> >.

- 154 MARTIN, A. M. et al. Comparative genomic analysis, diversity and evolution of two KIR haplotypes A and B. **Gene**, v. 335, p. 121-31, Jun 2004. ISSN 0378-1119. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15194195> >.
- 155 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> >.
- 156 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> >.
- 157 FAN, Q. R. et al. Direct binding of a soluble natural killer cell inhibitory receptor to a soluble human leukocyte antigen-Cw4 class I major histocompatibility complex molecule. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 14, p. 7178-83, Jul 1996. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8692965> >.
- 158 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> >.
- 159 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> >.
- 160 GUETHLEIN, L. A. et al. NK cell receptors of the orangutan (*Pongo pygmaeus*): a pivotal species for tracking the coevolution of killer cell Ig-like receptors with MHC-C. **J Immunol**, v. 169, n. 1, p. 220-9, Jul 2002. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12077248> >.
- 161 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> >.
- 162 OLDER AGUILAR, A. M. et al. Coevolution of killer cell Ig-like receptors with HLA-C to become the major variable regulators of human NK cells. **J Immunol**, v. 185, n. 7, p. 4238-51, Oct 2010. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20805421> >.
- 163 COLONNA, M.; SAMARIDIS, J. Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. **Science**, v. 268, n. 5209, p. 405-8, Apr 1995. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7716543> >.

- 164 CAMPBELL, K. S.; PURDY, A. K. Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. **Immunology**, v. 132, n. 3, p. 315-25, Mar 2011. ISSN 1365-2567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21214544> >.
- 165 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> >.
- 166 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> >.
- 167 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> >.
- 168 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> >.
- 169 THIELENS, A.; VIVIER, E.; ROMAGNÉ, F. NK cell MHC class I specific receptors (KIR): from biology to clinical intervention. **Curr Opin Immunol**, v. 24, n. 2, p. 239-45, Apr 2012. ISSN 1879-0372. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22264929> >.
- 170 KIM, S. et al. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. **Nature**, v. 436, n. 7051, p. 709-13, Aug 2005. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16079848> >.
- 171 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> >.
- 172 ARNHEIM, L.; DILLNER, J.; SANJEEVI, C. B. A population-based cohort study of KIR genes and genotypes in relation to cervical intraepithelial neoplasia. **Tissue Antigens**, v. 65, n. 3, p. 252-9, Mar 2005. ISSN 0001-2815. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15730517> >.
- 173 CARRINGTON, M. et al. Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. **J Exp Med**, v. 201, n. 7, p. 1069-75, Apr 2005. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15809352> >.
- 174 NAUMOVA, E. et al. Genetic polymorphism of NK receptors and their ligands in melanoma patients: prevalence of inhibitory over activating signals. **Cancer Immunol Immunother**, v. 54, n. 2, p. 172-8, Feb 2005. ISSN 0340-7004. Disponível em: <

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15248031> >.
- 175 VERHEYDEN, S.; BERNIER, M.; DEMANET, C. Identification of natural killer cell receptor phenotypes associated with leukemia. **Leukemia**, v. 18, n. 12, p. 2002-7, Dec 2004. ISSN 0887-6924. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15470487> >.
- 176 KRÖGER, N. et al. Comparison between antithymocyte globulin and alemtuzumab and the possible impact of KIR-ligand mismatch after dose-reduced conditioning and unrelated stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. **Br J Haematol**, v. 129, n. 5, p. 631-43, Jun 2005. ISSN 0007-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15916686> >.
- 177 MORETTA, A.; LOCATELLI, F.; MORETTA, L. Human NK cells: from HLA class I-specific killer Ig-like receptors to the therapy of acute leukemias. **Immunol Rev**, v. 224, p. 58-69, Aug 2008. ISSN 1600-065X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18759920> >.
- 178 STERN, M. et al. Survival after T cell-depleted haploidentical stem cell transplantation is improved using the mother as donor. **Blood**, v. 112, n. 7, p. 2990-5, Oct 2008. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18492955> >.
- 179 SHI, J. et al. Infusion of haplo-identical killer immunoglobulin-like receptor ligand mismatched NK cells for relapsed myeloma in the setting of autologous stem cell transplantation. **Br J Haematol**, v. 143, n. 5, p. 641-53, Dec 2008. ISSN 1365-2141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18950462> >.
- 180 MILLER, J. S. et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. **Blood**, v. 105, n. 8, p. 3051-7, Apr 2005. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15632206> >.
- 181 RUBNITZ, J. E. et al. NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 6, p. 955-9, Feb 2010. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20085940> >.
- 182 BENSON, D. M. et al. IPH2101, a novel anti-inhibitory KIR antibody, and lenalidomide combine to enhance the natural killer cell versus multiple myeloma effect. **Blood**, v. 118, n. 24, p. 6387-91, Dec 2011. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22031859> >.
- 183 MORETTA, L. et al. Human NK Cells: From Surface Receptors to the Therapy of Leukemias and Solid Tumors. **Front Immunol**, v. 5, p. 87, 2014. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24639677> >.
- 184 VEY, N. et al. A phase 1 trial of the anti-inhibitory KIR mAb IPH2101 for AML in complete remission. **Blood**, v. 120, n. 22, p. 4317-23, Nov 2012. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23002117> >.

- 185 ROMAGNÉ, F. et al. Preclinical characterization of 1-7F9, a novel human anti-KIR receptor therapeutic antibody that augments natural killer-mediated killing of tumor cells. **Blood**, v. 114, n. 13, p. 2667-77, Sep 2009. ISSN 1528-0020. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19553639>>.
- 186 BENSON, D. M. et al. A phase 1 trial of the anti-KIR antibody IPH2101 in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. **Blood**, v. 120, n. 22, p. 4324-33, Nov 2012. ISSN 1528-0020. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23033266>>.




JUSTIFICATIVA

Há poucos dados sobre potenciais associações entre os genes KIR e HLA de classe I e o câncer de mama. Consideramos, pois, que a identificação de diferenças entre grupos de pacientes e controles sadios poderá favorecer o surgimento de informações que contribuam para uma melhor compreensão do eventual papel dos genes KIR e HLA de classe I nesta doença. Entendemos também que estes novos conhecimentos poderão ser úteis na identificação de indivíduos com maior ou menor predisposição ao desenvolvimento da doença, bem como no estabelecimento de prognósticos, auxiliando, assim, no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas de base imunológica contra o câncer de mama.

4 Artigo Científico (publicado na revista *Human Immunology*)

Analysis of KIR gene frequencies and HLA class I genotypes in breast cancer and control group

Analysis of KIR gene frequencies and HLA class I genotypes in breast cancer and control group

- [Maria Regina Jobim^a](#),  ,
- [Mariana Jobim^a](#),  ,
- [Patrícia H. Salim^a](#),
- [Pâmela Portela^a](#),
- [Luiz Fernando Jobim^{a, b}](#),
- [Sandra Leistner-Segal^c](#),
- [Ana Cristina Bittelbrunn^d](#),
- [Carlos Henrique Menke^d](#),
- [Jorge Villanova Biazús^d](#),
- [Rafael Roesler^{e, f, g}](#),
- [Gilberto Schwartzmann^{b, e, f}](#)

Abstract

Breast cancer is the main cause of cancer-related death among women, with a 0.5% increase in incidence per year. 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 alleles in patients with breast cancer and healthy controls. Two hundred thirty patients with breast cancer and 272 healthy controls were typed for HLA class I and KIR genes by PCR-SSO. When both

groups were compared, the presence of inhibitory KIR2DL2 receptors was significantly higher in breast cancer patients than in healthy controls. No significant differences were found for HLA-C2 and HLA-Bw4. However, a higher frequency of HLA-C1 in breast cancer patients was observed. These findings suggest a potential role for the KIR gene system in breast cancer. Further studies to confirm this observation are warranted.

1. Introduction

Breast cancer (BC) is a highly prevalent disease in most developed and developing countries, being one of the most lethal malignancies in this patient population [1]. Familial Linkage studies performed in patients with BC have identified high-penetrance genes, such as BRCA1, BRCA2, PTEN and TP53, which are responsible for inherited BC syndromes [2].

Over the last years, family-based and population-based strategies have also indicated that genes functionally related to BRCA1 and/or BRCA2 and involved in DNA repair, such as CHEK2, ATM, BRIP and PALB2, are associated with moderate risk for BC [3]. Together, these known genes account for about 25% of the familial aggregation cases. More recently, genome wide association studies (GWAS) revealed single nucleotide polymorphisms (SNPs) in five novel genes associated to BC susceptibility: TNRC9, FGFR2, MAP3K1, H19 and lymphocyte-specific protein 1 (LSP1) [4]. The rs3803662 SNP of the TNRC9 gene was strongly associated with BC, being correlated with bone metastases and estrogen receptor expression [5]. Another SNP on intron 2 of the FGFR2 gene was amplified and over-expressed in 5–10% of patients with BC [6]. Notably, the rs889312 SNP of the MAP3K1 gene was correlated with BC susceptibility in BRCA2 mutation carriers, but not in BRCA1 carriers [7]. Various other SNPs identified in the LSP1 and H19 genes showed significant but less prominent association with BC risk [7].

New allelic variants associated with BC risk were also discovered in other

genes involved in cell cycle regulation, apoptosis, metabolism and mitochondrial functions. Taken together, the information on BC susceptibility genes and specific SNPs may lead to improvements in strategies for prevention, early detection and treatment of this fatal disease in the future [7].

Natural killer cells (NK) are crucial components of the innate immune system and provide a first line of defense against tumor transformation and infection [8]. Class I HLA molecules are recognized by NK cells through their killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) [9]. KIR receptors are divided into functional inhibitory groups that prevent target cell lysis and activators that incite cell lysis [10]. Based on the dimorphism in position 80 (epitope for KIR binding), 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. KIR2DL2, 2DL3 and 2DS2 bind HLA-C1 ligands, whereas KIR2DL1 and 2DS1 bind HLA-C2 ligands [11]. The inhibitory KIR3DL1 recognizes HLA-B Bw4 allotypes and KIR3DL2 binds HLA-A3 and HLA-A11 [12]. Downregulation of tumor HLA expression might be a strategy for the evasion of immune surveillance by malignant cells [13].

Thus far, 17 KIR genes and pseudogenes have been described on human chromosome 19q13.4 [14]. Eight KIR receptors are inhibitory (2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL5A, 2DL5B 3DL1, 3DL2 and 3DL3), seven are activating (2DL4, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 2DS5 and 3DS1), and two are pseudogenes (2DP1 and 3DP1) [15]. Of these, four KIR genes (3DL3, 3DP1, 2DL4, 3DL2) are always present and are considered framework genes [16].

Preclinical studies describing the role of NK cells in tumor growth and metastasis were recently reported [17]. In a study using peripheral-blood mononuclear cells, a significantly lower NK activity was observed in samples obtained from BC patients, as compared to healthy individuals [18]. More recently, novel experimental anticancer therapies exploring the use of

autologous activated NK cells have been reported[\[19\]](#).

Data on the role of KIR gene polymorphisms for the susceptibility to BC are very limited. There is only one published series listed in PubMed and authored by Ozturk and cols [\[20\]](#), in which 33 BC patients and 77 healthy volunteers were analyzed. The activating KIR2DS1 polymorphism was present in a much higher frequency in BC patients as compared to healthy controls, while the 003/4/6/7 allelic types of activating KIR2DS4 were less frequent in BC patients. The authors described also a negative correlation between KIR2DL1 gene and BC development, suggesting that the activating KIR2DS1 may facilitate BC development, while KIR2DL1 gene and KIR2DS4 alleles could act as BC protectors.

In the present study, we examined 16 KIR genes and HLA ligands in a larger sample, including 230 caucasoid BC patients and compared them with findings from 278 healthy controls, aiming to identify not only patterns of KIR genotypes, but also HLA ligands 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 BC caucasoid population.

2. Materials and methods

2.1. Study population

To analyze the combination of KIR genotypes and HLA-Cw and Bw4 ligands, we studied 230 Brazilian caucasoid patients with BC from de Breast Unit of our university hospital (Hospital de Clínicas de Porto Alegre), and 278 caucasoid healthy unrelated female individuals. The age was 44.22 ± 10.11 (mean \pm SD) years for the patients and 45.58 ± 12.49 years for the controls. Gender and geography were matched between the groups. This study was approved by the institutional Research Ethics Committee (IRB0000921), and all patients signed an informed consent for participating in this study.

2.2. KIR typing

Blood samples were collected into tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). DNA was extracted using a modified salting-out procedure [\[21\]](#).

The KIR SSO Genotyping Test applies Luminex technology (One-Lambda Inc, Canoga Park, CA, USA) to the reverse SSO DNA typing method. First, target DNA is PCR-amplified using three separate group-specific primer sets targeting Exons 3 + 4, 5, and 7–9. Each PCR product is biotinylated, which allows later detection using R-Phycoerythrin-conjugated Streptavidin (SAPE). Each PCR product is denatured and allowed to hybridize to complementary DNA probes conjugated to fluorescently coded microspheres. After washing the beads, bound amplified DNA from the test sample is tagged with SAPE. A flow analyzer, the LABScan™ 100, identifies the fluorescent intensity of PE (phycoerythrin) on each microsphere. The fluorescent intensity varies based on reaction outcome, and is expected to be 500 or above for control probes.

2.3. HLA typing

HLA-Cw analysis was performed using PCR–SSP, as described by Jones et al. [22]. 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, A3 and A11 were also performed using PCR-SSP [23].

2.4. Statistical analysis

Comparison of the KIR gene frequency with the control group was executed by Pearson chi-square with continuity correction, and in a few, where the expected difference between the two groups was small, Fisher's exact test was employed. Odds ratios (OR), confidence intervals (95% CI) and significance values ($P < 0.05$) were calculated using SPSS for Windows version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The number of genes used was adjusted for with the Bonferroni correction.

3. Results

Distribution of the KIR genes among patients and controls is shown in [Table 1](#). The proportion of breast cancer patients with inhibitory KIR2DL2 receptors was significantly higher than healthy controls (73.9% vs 56.5%; OR: 2.18; 95%

CI: 1.47–3.05; $P < 0.001$). There was no significant difference in the frequencies of the other KIR genes.

Table 1.

KIR gene frequencies (%) in controls ($n = 278$) and breast cancer (230).

KIR gene	Controls		Patients		P-value [□]
	N	%	N	%	
2DL1	273	98.2	221	96.1	NS
2DL2	157	56.5	170	73.9	<0.001**
2DL3	240	86.3	212	92.2	NS
2DL4	278	100.0	230	100.0	NS
2DL5	157	56.5	129	56.1	NS
3DL1	257	92.4	222	96.1	NS
3DL2	278	100.0	230	100.0	NS
3DL3	278	100.0	230	100.0	NS
2DS1	101	36.3	94	40.9	NS
2DS2	149	53.6	133	57.8	NS
2DS3	85	30.6	69	30.0	NS
2DS4	269	96.8	211	91.7	NS
2DS5	109	39.2	86	37.4	NS
3DP1	278	100.0	230	100.0	NS
2DP1	278	100.0	230	100.0	NS
3DS1	107	38.5	88	38.3	NS

□

Chi-Square Test or Fischer's Exact Test with Bonferroni correction; NS = Not Significant.

[Table options](#)

No difference was seen between the controls and the cases with regard to HLA ligand Bw4 and C2 ([Table 2](#)). However, we observed a higher frequency of HLA-C1 in cancer patients than in controls (85.7% vs 67.3%; OR: 2.71; 95% CI: 1.75–4.20). The heterozygote HLA-C group (C1/C2) was more frequent in the patients (55.2% vs 39.9%; OR: 1.86; 95% CI: 1.28–2.68; $P = 0.01$).

Table 2.

Frequencies of KIR ligands in controls ($n = 278$) and breast cancer (230).

KIR gene	Controls		Patients		<i>P</i> -value [□]	OR	95% CI
	N	%	N	%			
Bw4	151	54.3	148	63.3	NS		
C1	187	67.3	197	85.7	<0.001	2.71	1.75–4.20
C2	163	58.6	160	69.6	NS		
C1/C1	76	27.3	70	30.4	NS		
C2/C2	52	18.7	33	14.3	NS		
C1/C2	111	39.9	127	55.2	0.01	1.86	1.28–2.68

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.

OR: Odds Ratio; CI: Confidence Intervals.

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

□

Chi-Square Test or Fischer's Exact Test with Bonferroni correction; NS = Not Significant.

[Table options](#)

Analyzing the combinations of KIR genes in the presence of their ligands ([Table 3](#)), a significant association of KIR2DL2 in the presence of HLA C1 group with cancer patients was observed (72.7% vs 53.5%; OR: 2.32; 95% CI: 1.51–3.56; $P < 0.001$). In addition, the combination of inhibitor 2DL2 with heterozygote HLA-C group (C1/C2) was higher in breast cancer patients (74.3% vs 53.2%; OR: 2.55; 95% CI: 1.45–4.48; $P < 0.001$). No significant difference was observed for the combination of the activating KIR2DS2 and HLA-C group ligand.

Table 3.

Inhibitory and activatory KIR genes frequencies in the presence and absence of their ligands in controls (278) and breast cancer (230).

	Controls		Patients		<i>P</i> -value [□]
	<i>n</i>	(%)	<i>n</i>	(%)	
2DL2+ C1+	100	(53.5)	165	(72.7)	<0.001
2DL2+ C1/C1	41	(53.9)	58	(69.9)	NS
2DL2+ C1/C2	59	(53.2)	107	(74.3)	<0.001
2DS2+ C1+	92	(49.2)	126	(55.5)	NS
2DS2+ C1/C1	86	(52.8)	103	(57.5)	NS
2DS2+ C1/C2	55	(49.5)	82	(56.9)	NS

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.

□

Pearson's chi-square with Yates's correction, NS = Not Significant.

[Table options](#)

After performing a stratified analysis according to KIR2DS2 status, KIR2DL2 was a significant risk factor for breast cancer, particularly in the absence of KIR2DS2 ([Table 4](#)). The associations of activating and inhibitory KIR genes with breast cancer were further analyzed in the context of their respective HLA-C ligands using stratified analysis. The combination of KIR2DL2 with the C1 group in the absence of KIR2DS2 was higher in cancer patients than in healthy controls (50.5% vs 9.5%; OR: 9.95; 95% CI: 4.42–24.19; $P < 0.001$). The same was observed when analyzing KIR2DL2 with homozygote C1 group in the absence of KIR2DS2 (46.2% vs 10.3%; OR: 7.50; 95% CI: 2.04–33.73; $P = 0.001$) and with heterozygote HLA-C group C1C2 (53.2% vs 8.9%; OR: 11.61; 95% CI: 3.84–41.42; $P < 0.001$). Thus, a higher frequency of KIR2DL2 in the presence of 2DS2 with HLA C1 was observed in healthy controls (69.1% vs 91.0%; OR: 0.22; 95% CI: 0.09–0.49; $P < 0.001$). Similarly, the combination KIR2DL2 with homozygote HLA C1 group in the presence of the KIR2DS2 was higher in controls than among patients (69.0% vs 90.2%; OR: 0.24; 95% CI: 0.05–0.83; $P = 0.024$), and the same occurred for the

combination with the heterozygote HLA-C group C1C2 (69.2% vs 91.5%; OR: 0.21; 95% CI: 0.06–0.59; $P = 0.002$) ([Table 4](#)).

Table 4.

KIR 2DL2 in the presence or absence of KIR 2DS2 with their ligands in controls (278) and Breast Cancer (230).

	Controls		Patients		<i>P</i> -value [□]	OR	95% C.I
	<i>n</i>	(%)	<i>n</i>	(%)			
<i>2DS2+</i>							
2DL2+/C1	91	(91.0)	114	(69.1)	<0.001	0.22	0.09–0.049
2DL2+/C1C1	37	(90.2)	40	(69.0)	0.024	0.24	0.05–0.83
2DL2+/C1C2	54	(91.5)	74	(69.2)	0.002	0.21	0.06–0.59
<i>2DS2–</i>							
2DL2+/C1	9	(9.5)	51	(50.5)	<0.001	9.95	4.24–24.19
2DL2+/C1	4	(10.3)	18	(46.2)	0.001	7.50	2.04–33.73
2DL2+/C1C2	5	(8.9)	33	(53.2)	<0.001	11.61	3.84–41.42

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.

□

Pearson's chi-square with Yates's correction; OR: Odds Ratio; C.I: Confidence Intervals.

[Table options](#)

4. Discussion

This study describes the largest published analysis of KIR gene frequencies and HLA class I genotypes in BC patients and healthy controls. Two hundred and thirty caucasoid patients and 278 controls from Southern Brazil were included. A higher prevalence of inhibitory KIR2DL2 receptors in BC cancer patients was observed. Although no differences were demonstrated for HLA-C2 and HLA-Bw4, a higher frequency of HLA-C1 was also seen in BC patients. We could speculate that the higher prevalence of inhibitory allele KIR2DL2 in BC patients might have produced a negative effect on cell activation, affecting the eradication transformed cells. However, the biological significance of KIR in vivo depends on whether these receptors are present in individuals simultaneously with their ligands. Thus, any effect of KIR on disease susceptibility or progression might also depend on the presence of

putative HLA ligands in the same individual.

As we mentioned before, Ozturk et al. examined the frequencies of KIR genes in 33 BC patients and 77 healthy controls, reporting different results. The authors found an association between disease and the inhibitory KIR2DL1 gene, with a lower gene frequency in patients with cancer compared to controls ($P = 0.025$) [20]. Our data, however, demonstrated an association with the KIR2DL2 allele, and a further increase when analyzing with the corresponding HLA-C1 ([Table 3.](#))

This discrepancy of results between the two studies might be related to differences in sample sizes. It might also be related to the prevalence of Portuguese origin as the major European ethnic group in our sample, although subsequent waves of immigration to our geographic region contributed to the establishment of a more ethnically diversified population [24]. The later European immigrants settled in the Southeast and South areas of Brazil and had less breeding with the indigenous population. Since Ozturk et al. [20] analyzed a sample of the Turkish population, with a distinct ethnical composition, that could be another plausible explanation for the different results obtained in the two studies.

Other studies have attempted to identify an association between KIR genes and cancer, but no associations between the KIR gene system and prostate, colorectal, and laryngeal cancers were found [25] and [26]. 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 [27].

There are data describing an association between KIR genes and cancer, specifically in relation to viral infections. Martin and cols showed the involvement of HLA-C in modulating the risk of cervical cancer, mainly in the subgroup of women infected with the high-risk HPV types: 16 or 18 [28]. In a study performed in patients with nasopharyngeal carcinoma (NPC), which is an Epstein–Barr virus (EBV) associated malignancy, the authors suggests that

KIR-mediated activation might be associated with NPC risk. The observation of activating KIR genes in association with an increased risk of NPC is consistent with the hypothesis that increases in the level of innate immune response stimulation might contribute to the risk of virus-associated cancers, potentially by an amplified inflammatory response triggered by NK cells expressing activating KIRs [29].

In contrast, Bonagura and cols observed that NK cells expressing activating receptors KIR3DS1 and KIR2DS1 exhibited some degree of protection from developing severe forms of recurrent respiratory papillomatosis (RRP), a rare disease of the larynx and upper airway caused by another HPV strain, HPV-6/11[30]. Other studies did not reveal a clear relationship to prior viral infections, but found a risk factor in the association of activating KIRs in bladder and thyroid cancer [26] and [31].

Interestingly, individuals possessing KIR2DL2 and/or KIR2DS2 gene but no HLA-C2 ligand may respond better to treatment in lung cancer and survive longer than people bearing other genotypes [32]. In contrast, we found that KIR2DL2 combined with the HLA-C heterozygote ligand (C1/C2) might be associated with increased breast cancer susceptibility. It is possible that the combined potency of interactions can shift the balance between activating and inhibitory signals, whereby a strongly interacting inhibitory KIR/HLA compound genotype would lead to less-responsive NK cells.

In this context, a strong inhibitory KIR/HLA compound genotype may be deleterious when fighting infection or cancer, due to a decreased NK cell response to the presence of the virus or tumor cells. On the other hand, the potency of self-recognizing KIR/HLA interactions can also impact upon development of the total pool of responsive, mature NK cells in a process referred to as NK cell education or licensing. [33].

The variability of findings on the roles of KIR genes in tumorigenesis is a sign of the large diversity of potential pathogenic mechanisms, immune responses, and evading immune mechanisms observed in different types of cancer.

Further studies are needed to better understand the mechanistic basis of how specific KIR/HLA interactions influence NK cell maturation and function in individuals in ways that can be detrimental to health. The suggestion of a potential role for the KIR gene system in a common malignant disease such as BC deserves confirmatory studies.

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); the South American Office for Anticancer Drug Development (SOAD; Porto Alegre, Brazil); and the National Institute for Translational Medicine (INCT program).

References

- [1] G.N. Hortobagyi, J.G. Salazar, K. Pritchard, D. Amadori, R. Haidinger, C.A. Hudis *et al.* **The global breast cancer burden: variations in epidemiology and survival** Clin Breast Cancer, 6 (2005), pp. 391–401.
- [2] C. Turnbull, N. Rahman. **Review genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future.** Annu Rev Genomics Hum Genet, 9 (2008), pp. 321–345.
- [3] N. Mavaddat, A.C. Antoniou, D.F. Easton, M. Garcia-Closas. **Review genetic susceptibility to breast cancer.** Mol Oncol, 4 (2010), pp. 174–191
- [4] D.F. Easton, K.A. Pooley, A.M. Dunning, P.D.P. Pharoah, D. Thompson, D.G. Ballinger *et al.* **Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci.** Nature, 447 (2007), pp. 1087–10.
- [5] E.T. Gudmundsdottir, R.B. Barkardottir, A. Arason, H. Gunnarsson, L.T. Amundadottir, B.A. Agnarsson *et al.* **The risk allele of SNP rs3803662 and the mRNA level of its closest genes TOX3 and LOC643714 predict adverse outcome for breast cancer patients.** BMC Cancer, 12 (2012), pp. 621–631.
- [6] P.E. Huijts, M. van Dongen, M.C. de Goeij, A.J. van Moolenbroek, F. Blanken, M.P. Vreeswijk *et al.* **Allele-specific regulation of FGFR2 expression is cell type-dependent and may increase breast cancer risk through a**

paracrine stimulus involving FGF10. *Breast Cancer Res*, 13 (2011), p. R72.

[7] D. Fanale, V. Amodeo, L.R. Corsini, S. Rizzo, V. Bazan, A. Russo **Breast cancer genome-wide association studies: there is strength in numbers.** *Oncogene*, 31 (2012), pp. 2121–2128.

[8] R.J. Boyton, D.M. Altmann. **Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptor and human antigen class I in disease.** *Clin Exp Immunol*, 149 (2007), pp. 1–8.

[9] F. Borrego, J. Kabat, D.K. Kim, L. Lieto, K. Maasho, J. Peña *et al.* **Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells.** *Mol Immunol*, 38 (2002), pp. 637–660.

[10] P. Parham. **Killer cell immunoglobulin-like receptor diversity: balancing signals in the natural killer cell response.** *Immunol Lett*, 92 (2004), pp. 11–13.

[11] 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), pp. 4026–4028.

[12] G.M. O'Connor, K.J. Guinan, R.T. Cunningham, D. Middleton, P. Parham, C.M. Gardiner. **Functional polymorphism of the KIR3DL1/S1 receptor on human NK cells.** *J Immunol*, 178 (2007), pp. 235–241.

[13] F. Garrido, T. Cabrera, A. Concha, S. Glew, F. Ruiz-Cabello, P.L. Stern. **Natural history of HLA expression during tumour development.** *Immunol Today*, 14 (1993), pp. 491–499.

[14] Y. Suto, K. Maenaka, T. Yabe, M. Hirai, K. Tokunaga, K. Tadok *et al.* **Chromosomal localization of the human natural killer cell class I receptor family genes to 19q13.4 by fluorescence in situ hybridization.** *Genomics*, 35 (1996), pp. 270–277.

[15] 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), pp. 645–650.

[16] R. Rajalingam, M. Hong, E.J. Adams, B.P. Shum, L.A. Guethlein, P.

Parham. **Short KIR haplotypes in pygmy chimpanzee (Bonobo) resemble the conserved framework of diverse human KIR haplotypes.**

J Exp Med, 193 (2001), pp. 135–146.

[17] M.Z. Dewan, H. Terunuma, S. Ahmed, K. Ohba, M. Takada, Y. Tanaka *et al.* **Natural-killer-cells in breast cancer cell growth and metastasis in SCID mice.** Biomed Pharmacother, 59 (2005), pp. 375–379.

[18] E. Mamessier, A. Sylvain, M.L. Thibult, G. Houvenaeghel, J. Jacquemier, R. Castellano *et al.* **Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity.**

J Clin Invest, 121 (2011), pp. 3609–3622.

[19] I. Caras, A. Grigorescu, C. Stavaru, D.L. Radu, I. Mogos, G. Szegli *et al.* **Evidence for immune defects in breast and lung cancer patients.** Cancer Immunol Immunother, 53 (2004), pp. 1146–1152.

[20] O.G. Ozturk, F.D. Gun, G. Polat. **Killer cell immunoglobulin-like receptor genes in patients with breast cancer.** Med Oncol, 29 (2012), pp. 511–515.

[21] S.A. Miller, D.D. Dykes, H.F. Polesky. **A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.** Nucl Acids Res, 16 (1988), p. 1215.

[22] D.C. Jones, R.S. Edgar, T. Ahmad, J.R. Cummings, D.P. Jewell, J. Trowsdale *et al.* **Killer Ig-like receptor (KIR) genotype and HLA ligand combination in ulcerative colitis susceptibility.** Genes Immun, 7 (2006), pp. 576–582.

[23] M. Bunce, C.M. O'Neill, M.C. Barnardo, P. Krausa, M.J. Browning, P.J. Morris *et al.* **Photo typing: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 and DQB1 by PCR with 144 primers mixes utilizing sequence specific primers (PCR-SSP).** Tissue Antigens, 46 (1995), pp. 355–367.

[24] F.C. Parra, R.C. Amado, J.R. Lambertucci, J. Rocha, C.M. Antunes, S.D. Pena. **Color and genomic ancestry in Brazilians.** Proc Natl Acad Sci USA, 100 (2003), pp. 177–182.

[25] P. Portela, L.F. Jobim, P.H. Salim, W.J. Koff, T.J. Wilson, M.R. Jobim *et al.* **Analysis of KIR gene frequencies and HLA class I genotypes in prostate cancer and control group.** Int J Immunogenet, 39 (2012), pp. 423–428.

- [26] D. Middleton, J.R. Vilchez, T. Cabrera, A. Meenagh, F. Williams, I. Halfpenny *et al.* **Analysis of KIR gene frequencies in HLA class I characterized bladder, colorectal and laryngeal tumours.** *Tissue Antigens*, 69 (2007), pp. 220–226.
- [27] S. Al Omar, D. Middleton, E. Marshall, D. Porter, G. Xinarianos, O. Raji *et al.* **Associations between genes for killer immunoglobulin-like receptors and their ligands in patients with solid tumors.** *Hum Immunol*, 71 (2010), pp. 976–981.
- [28] M.P. Martin, I.B. Borecki, Z. Zhang, L. Nguyen, D. Ma, X. Gao *et al.* **HLA-Cw group 1 ligands for KIR increase susceptibility to invasive cervical cancer.** *Immunogenetics*, 62 (2010), pp. 761–765.
- [29] M. Butsch Kovacic, M. Martin, X. Gao, T. Fuksenko, C.J. Chen, Y.J. Cheng *et al.* **Variation of the killer cell immunoglobulin-like receptors and HLA-C genes in nasopharyngeal carcinoma.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14 (2005), pp. 2673–2677.
- [30] V.R. Bonagura, Z. Du, E. Ashouri, L. Luo, L.J. Hatam, J.A. DeVoti *et al.* **Activating killer cell immunoglobulin-like receptors 3DS1 and 2DS1 protect against developing the severe form of recurrent respiratory papillomatosis.** *Hum Immunol*, 71 (2010), pp. 212–219.
- [31] E. Ashouri, M.H. Dabbaghmanesh, S. Rowhanirad, M. Bakhshayeshkaram, G. Ranjbar Omrani, A. Ghaderi. **Activating KIR2DS5 receptor is a risk for thyroid cancer.** *Hum Immunol*, 73 (2012), pp. 1017–1022.
- [32] A. Wiśniewski, R. Jankowska, E. Passowicz-Muszyńska, E. Wiśniewska, E. Majorczyk, I. Nowak *et al.* **KIR2DL2/S2 and HLA-C C1C1 genotype is associated with better response to treatment and prolonged survival of patients with non-small cell lung cancer in a Polish Caucasian population.** *Hum Immunol*, 73 (2012), pp. 927–931.
- [33] 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), pp. 2211–2220.



Corresponding authors. Fax: +55 5133598020.

Elsevier Inc. All rights reserved.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os receptores KIR humanos formam um grupo altamente polimórfico. Muitas de suas variantes podem influenciar de forma significativa a sua expressão e afinidade por ligantes, com implicações funcionais óbvias. Esta família de receptores presentes na superfície de células NK é fundamental na regulação da tolerância imunológica. Os seus níveis de expressão influenciam marcadamente a produção de sinais para a maturação e ativação das células NK^{1; 2; 3}.

Há evidências científicas, produzidas por vários grupos de pesquisadores, incluindo o nosso próprio laboratório, indicando que combinações alélicas distintas de genes KIR e HLA classe I podem contribuir na suscetibilidade a doenças, mas também na capacidade reprodutiva e sucesso com técnicas de transplante de células tronco hematopoiéticas^{1; 2; 3; 4; 5}.

Infelizmente, o conhecimento acerca dos múltiplos polimorfismos que podem ocorrer nestes genes é ainda muito limitado. Além disto, este desconhecimento se estende aos mecanismos moleculares que regulam a expressão e funcionamento de muitos de seus ligantes, o que limita sobremaneira a interpretação de achados isolados no que se refere a diferenças na prevalência de genes KIR e HLA classe I entre indivíduos doentes e sadios^{1; 2; 5; 6}.

Além da presença de polimorfismos, deve-se também considerar, em relação a estes genes, a possibilidade de que modificações pós-transcricionais nas (suas?) proteínas, em sua conformação, presença ou ausência de glicosilação ou fosforilação, sejam potenciais fontes adicionais de variabilidade.

No futuro, o domínio destas variáveis pode ter implicações terapêuticas fundamentais. Talvez um conhecimento mais profundo sobre os mecanismos de regulação das células NK e seus ligantes HLA possa gerar novas modalidades terapêuticas contra infecções, câncer, doenças autoimunes e transplantes de órgãos. É possível, entretanto, antecipar que esse mecanismo de vigilância

imunológica pode estar deficiente em indivíduos propensos ao desenvolvimento de neoplasias, pelo fato de abrigarem polimorfismos menos favoráveis em genes KIR e/ou HLA, ou por apresentarem alterações na regulação da atividade de células NK em decorrência de efeitos produzidos pelo meio ambiente^{1; 3; 5; 6}.

São potenciais fatores de desequilíbrio a idade, a presença de mutações em genes relevantes na homeostase, alterações hormonais, a exposição a substâncias mutagênicas ou promotoras de neoplasias, como o tabaco, o álcool e certas infecções virais. Há também a possibilidade de que o desequilíbrio decorra de imunodepressão medicamentosa ou natural ou uma dieta inadequada. Esses fatores podem ter influência na suscetibilidade ao câncer, a despeito da vigilância imunológica das células NK e da imunidade adquirida^{1; 2; 3; 5; 6}.

Diversos estudos têm demonstrado que a relação KIR/HLA pode estar associada à incidência e ao curso de tumores sólidos e hematológicos¹⁷¹. Os resultados dessas pesquisas dizem quase sempre respeito à relação KIR/HLA e à predominância de sinais inibidores sobre os sinais de ativação por parte da célula NK, como foi observado em pacientes com câncer de mama, colo uterino, melanoma maligno, leucemia aguda e crônica e linfomas^{22; 172; 173; 174; 175; 176}.

A imunoterapia com manipulação das relações KIR-Ligante foi primeiramente demonstrada nos transplantes de medula óssea para o tratamento de leucemias. Nestes transplantes, a escolha de doadores haploidênticos, ou seja, com somente discreta incompatibilidade HLA-Cw, permite, após o regime de condicionamento e da infusão de células tronco CD34+, ativar células NK do doador contra células leucêmicas residuais do paciente ou receptor¹⁸². Pacientes transplantados com este protocolo de incompatibilidade que ativa células NK tiveram 67% de remissões completas contra 18% dos que receberam células tronco HLA idênticas¹⁷⁸. Mesmo pacientes em quimioterapia com doença refratária, a sobrevida livre de doença foi de 34% em transplantes com haloreatividade contra 6% sem haloreatividade. O mesmo foi observado em pacientes com mieloma múltiplo^{178; 179}.

A infusão de células NK com diferenças na relação KIR/ligante entre doador e receptor em diversos tumores foi avaliada. Em um estudo, observou-se 50% de respostas completas em pacientes com mieloma múltiplo avançado e que

receberam infusões de células NK haploidênticas, KIR/ligante discretamente incompatíveis e depletadas de linfócitos T. Essas células demonstraram forte atividade citotóxica contra as células do tumor. Resultados semelhantes foram observados em leucemias de adultos e crianças^{180; 181}.

A imunoterapia com anticorpos monoclonais contra receptores KIR inibidores tem sido também alvo de interesse^{182; 183; 185}. O primeiro agente utilizado foi o bloqueador do inibidor KIR (IPH2101), um anticorpo IgG dirigido contra KIRDL1, 2 e 3 que, ao ligar-se a esses receptores, evita o sinal de inibição, com consequente liberação de citocinas antitumorais. O bloqueio deste mecanismo de inibição também favorece a ocorrência de ADCC pelas células NK contra células tumorais e não células normais^{184; 186}.

Em nosso estudo, vários genes KIR e alelos do sistema HLA de classe I foram analisados em pacientes caucasóides brasileiros e controles, pelas técnicas de PCR-SSO e PCR-SSP. Uma frequência maior do genótipo supressor 2DL2 foi observada em pacientes com câncer de mama em relação ao grupo controle ($P < 0,001$). Ainda que os genes HLA-C2 e HLA-BW4 não apresentassem diferenças entre os grupos, o gene HLA-C1 foi mais frequente nos pacientes do que nos controles normais.

Estes resultados apontam maior frequência do genótipo supressor 2DL2 e maior expressão do gene HLA-C1 em pacientes com câncer de mama. Se comprovada esta observação em outras séries de pacientes com câncer de mama, vislumbramos potenciais aplicações clínicas com base nestes achados.

APENDICE

I – Protocolo de coleta de dados

Projeto: Análise do polimorfismo dos genes KIR e HLA em pacientes com Câncer de Mama

Nome do paciente: _____

Número do paciente: _____ Número do prontuário: _____

Raça: _____

Data de nascimento: ____/____/____ Idade: ____ anos

Observações: _____

Tipagem HLA C1: _____

Tipagem HLA C2: : _____

Tipagem HLA Bw4: : _____

Tipagem KIR: _____

II – Termo de Consentimento Informado

NOME DO HOSPITAL
Serviço de Mastologia

Consentimento Informado ***Banco Regional de Tecidos/DNA de Mama/Ovário - RS***

Estamos convidando pessoas com diagnóstico de câncer de mama e/ou câncer de ovário a doar amostras de sangue, de tecido mamário normal (um pequeno fragmento da mama que está sendo retirada pela cirurgia) e de tecido tumoral (um pequeno fragmento do tumor que está sendo retirado pela cirurgia).

Este material será armazenado no Banco Regional de Tecidos/DNA de Mama e Ovário do Rio Grande do Sul – Hospital de Clínicas de Porto Alegre, para futuros estudos sobre fatores genéticos associados ao câncer de mama.

As amostras de tecido mamário normal e de tecido tumoral serão coletadas durante a sua cirurgia, e este procedimento não terá influência sobre a mesma. Os tecidos utilizados são uma pequena parte do tecido que é retirado rotineiramente em cirurgias como a que você irá fazer. A quantidade de sangue doado, cerca de 5 ml, não trará prejuízos à sua saúde.

O armazenamento das amostras não implicará em custo adicional, nem terá interferência na definição dos exames e procedimentos necessários ao seu tratamento.

O material coletado será armazenado por um período de tempo indeterminado que variará de acordo com a quantidade de material obtido após as extrações, bem como da utilização dos mesmos nas pesquisas desenvolvidas.

A liberação de amostras identificadas, bem como de resultados identificados para terceiros só ocorrerão com a sua autorização por escrito.

Em nenhuma hipótese haverá quebra de confidencialidade quanto aos dados coletados no momento de seu cadastramento no Banco Regional de Tecidos/DNA de Mama e Ovário do Rio Grande do Sul.

Todas as dúvidas sobre a coleta e sobre as futuras pesquisas que serão desenvolvidas utilizando o material coletado poderão ser esclarecidas pelos médicos e enfermeiras da equipe cirúrgica que está lhe acompanhando, ou posteriormente, através do telefone **2101.8849** com o Dra. Sandra Segal ou Dra. Ana Bittelbrunn.

Sendo assim:

a) Concordo que minhas amostras sejam armazenadas para serem utilizadas em futuras pesquisas, inclusive as realizadas em outros centros, sobre doenças da mama?

sim;

não

b) Desejo ser informada sobre os resultados destes estudos?

sim, e estou ciente de que minhas amostras serão identificadas e que serei informada sobre os estudos realizados e consultada sobre o meu interesse específico em saber o resultado de cada um;

não, e estou ciente que minhas amostras não serão identificadas e que não receberei qualquer informação sobre estes estudos.

c) Caso eu esteja impossibilitada, por qualquer motivo, de receber esses resultados:

desejo que estes sejam transmitidos a _____

(endereço: _____ fone: _____)

não desejo que qualquer pessoa receba os resultados por mim.

d) Concordo que minhas amostras sejam futuramente utilizadas em pesquisas, inclusive as realizadas em outros centros, não relacionadas à minha doença:

sim, e estou ciente que apesar de não obter nenhum benefício direto dos resultados destes estudos, os mesmos poderão ser muito importantes para o progresso da medicina;

não

Declaro que li e compreendi as informações acima e que minhas dúvidas foram esclarecidas por: _____, que assina abaixo como responsável pelas informações fornecidas.

Nome: _____

Assinatura: _____

Data: _____/_____/_____

Assinatura do responsável pelas informações fornecidas:

Data: _____/_____/_____

III – Termo de Consentimento - REDOME

REGISTRO BRASILEIRO DE DOADORES VOLUNTARIOS DE MEDULA OSSEA – REDOME

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, abaixo assinado(a) e acima qualificado(a), pelo presente instrumento CONSINTO que os meus dados cadastrais, o resultado de minha tipificação HLA e os outros resultados dos exames de histocompatibilidade / Imunogenética sejam incluídos no REGISTRO BRASILEIRO DE DOADORES VOLUNTÁRIOS DE MEDULA OSSEA - REDOME, coordenado pelo Laboratório de Imunogenética do Instituto Nacional de Câncer — INCA, do Ministério da Saúde. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em possíveis testes genéticos futuros, desde que de maneira sigilosa.

Nesta data recebi as orientações sobre o que é o transplante de medula óssea e o transplante de células precursoras e estou ciente de que:

O candidato a doador de medula óssea e/ou tecidos hematopoéticos deve encontrar-se em bom estado de saúde.

Na oportunidade de ser selecionado, o doador deverá passar por exames clínicos e laboratoriais que atestem a inexistência de doença, especialmente as infectocontagiosas.

Na oportunidade de ser selecionado para doação de medula óssea, o doador passará por internação hospitalar (hospital/dia) sendo necessário submeter-se a procedimento sob anestesia geral para retirada de não mais que 10% de sua medula óssea. O procedimento consiste em punção glútea (4 a 8 punções). A medula óssea do doador é espontaneamente restaurada em poucas semanas.

Na oportunidade de ser selecionado para doação de precursores hematopoéticos,

após utilizar por via subcutânea uma medicação estimulante de células hematopoiéticas, o doador será submetido a procedimento semelhante a doação de sangue sendo este realizado em caráter ambulatorial, não sendo para isso necessários os procedimentos mencionados no segundo item deste termo.

Os riscos para doadores de medula óssea e/ou tecidos hematopoéticos é praticamente inexistente. Nos casos de doação de medula óssea, devido ao procedimento de punção, é comum haver queixa de discreta dor no local da punção.

Tenho, também ciência do propósito a que se destina o referido Registro e meu cadastramento nele.

Proponho-me, assim, a ser um eventual doador de medula óssea ou de células precursoras, sabendo que me é reservado o direito de decisão final para doação, mantendo-se a condição de sigilo acima especificada.

Porto Alegre, ____/____/____

Nome Legível

Assinatura

Testemunhas:

Nome legível: _____ Assinatura: _____

Nome legível: _____ Assinatura: _____