

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ESTUDO DE POLIMORFISMOS DOS GENES KIR E HLA EM
PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA**

Pâmela Portela da Silva

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Dissertação de Mestrado

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ESTUDO DE POLIMORFISMOS DOS GENES KIR E HLA EM
PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA**

Pâmela Portela da Silva

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Dissertação de Mestrado

2011

Agradecimentos

Ao Professor Rafael Roesler pela sua orientação.

Ao Professor Luiz Fernando Jobim, por acreditar no meu trabalho.

A Dra Mariana Jobim pelo incentivo e dedicação na realização desta pesquisa.

Ao Professor Walter Koff, pela oportunidade de trabalhar com seus pacientes.

A amiga Patrícia Salim, pelo auxílio prático e com as análises estatísticas deste trabalho.

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

Aos residentes do Serviço de Urologia pela ajuda na captação dos pacientes.

Aos meus pais, ao meu irmão e ao meu namorado pelo carinho.

FONTES FINANCIADORAS

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), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM) e Fundação SOAD de Pesquisas do Câncer.

Sumário

FONTES FINANCIADORAS.....	4
ABREVIATURAS E SIGLAS	6
RESUMO	8
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO.....	10
JUSTIFICATIVA	12
1 REVISÃO DA LITERATURA.....	13
1.1 CÂNCER DE PRÓSTATA.....	13
1.2 CÉLULA NATURAL KILLER.....	17
1.3.1 LIGANTES DOS RECEPTORES KIR.....	22
REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	27
2 OBJETIVOS	34
2.1 OBJETIVO GERAL	34
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3 ARTIGO ORIGINAL.....	35
CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
APÊNDICE	54
A – PROTOCOLO DE PESQUISA	54
B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - PACIENTES	55
C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - CONTROLES.....	57
ANEXOS	59
ANEXO I – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO HCPA	59

ABREVIATURAS E SIGLAS

CaP: Câncer de próstata

HLA: *Human leukocyte antigen* - Antígeno leucocitário humano

HPB: Hiperplasia prostática benigna

IL: *Interleukin* - Interleucina

INF: Interferon

KIR: *Killer Immunoglobulin Like receptor* - Receptor do tipo imunoglobulina da célula NK

NK: *Natural killer cells* - Células matadoras naturais

NKT: *Natural killer T cells* - Células matadoras naturais tipo célula T

PSA: Prostate specific antigen - Antígeno prostático específico

CTLs: *Cytotoxic T lymphocytes* - Linfócitos T citotóxicos

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

TNF: *Tumor necrosis factor* - Fator de necrose tumoral

GM-CSF: *Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor* - Fator estimulador de colônia granulocítico-macrofágico

ADCC: *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* - Citotoxicidade celular dependente de anticorpo

TGF: *Tumor growth factor* - Fator de crescimento tumoral

TNRF: *Tumor necrosis receptor family* – Família dos receptores de necrose tumoral

Th : *Linfócito T helper* – Linfócito T auxiliar

PCR: *Polimerase chain reaction* - Reação em cadeia da polimerase

SSP: *Sequence specific primers* - Sequência de primers específicos

RESUMO

O câncer de próstata é o segundo câncer mais comum entre homens, uma vez que tanto a incidência como a mortalidade aumentam exponencialmente após a idade de 50 anos. As células *Natural Killer* (NK) fazem parte do sistema imune inato e reconhecem moléculas de HLA de classe I na célula alvo, através de seus receptores de membrana, chamados killer immunoglobulin-like-receptors (KIR). O objetivo desse estudo foi avaliar a associação entre os genes KIR e HLA em pacientes com câncer de próstata e grupo controle. Genotipamos 200 pacientes com diagnóstico de câncer de próstata e 185 pacientes saudáveis para os genes KIR e HLA classe I por PCR-SSP. Quando comparados os grupos, não foram encontradas diferenças significativas para HLA-C do grupo 1 e do grupo 2, HLA-Bw4, HLA-A3 e A11. Nenhuma diferença foi observada na frequência dos genes KIR nos pacientes com câncer de próstata e nos controles. Esses resultados sugerem que não há potencial papel para o sistema dos genes KIR no câncer de próstata.

PALAVRAS-CHAVE: Antígeno leucocitário humano, Células natural killer, Câncer de próstata, Genes KIR

ABSTRACT

Prostate cancer is the second most common cancer among men, since both incidence and mortality exponentially increases in men over fifty years of age. 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 immunoglobulin-like receptors (KIR). The aim of our study was to evaluate the association between the KIR genes and HLA alleles in patients with prostate cancer and healthy controls. Two hundred prostate cancer patients and 185 healthy controls were typed for HLA class I and KIR genes by PCR-SSP. When both groups were compared, no significant differences were found for HLA-C group 1 and group 2, HLA-Bw4, HLA-A3 and A11. No difference was seen either in KIR frequency between patients with prostate cancer and controls. In conclusion, our data suggests no potential role for the KIR gene system in prostate cancer.

KEYWORDS: Human leukocyte antigen; Killer cell immunoglobulin-like receptor; Prostate cancer; Natural killer cell

INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CaP) é a segunda neoplasia maligna mais incidente entre homens sendo que a incidência é maior que 30% em homens com idade superior a 50 anos, aumentado progressivamente até aproximadamente 80% aos 80 anos^{1,2}.

A causa do CaP ainda não é bem compreendida, e por isso tem sido alvo de grande quantidade de estudos científicos, especialmente na área da genética. Muitos deles propõem associações entre polimorfismos genéticos³.

As células *Natural Killer* (NK) são linfócitos que diferem das células T e B. Morfologicamente são maiores e apresentam citoplasma granular. São capazes de mediar a resposta do sistema imune inata contra células infectadas virais e células malignas transformadas. Portanto, possuem habilidade de matar tumores ou células infectadas por vírus, implicando que durante a resposta imune, podem provocar um ataque direto às células alvo^{29,30}.

Quando a expressão do HLA (*Human leukocyte antigen*) de classe I está diminuída como durante uma transformação tumoral, a célula NK pode ser ativada levando à morte da célula alvo. A célula NK é regulada por um balanço entre os sinais que são gerados a partir de receptores de ativação e de receptores de inibição⁴⁸⁻⁴⁹.

Estes receptores são chamados de *killer cell immunoglobulin-like receptors* (KIR) e são representantes da família das imunoglobulinas presentes na superfície celular, sendo expressos em células NK e em alguns linfócitos T. Estão localizados no braço longo do cromossomo 19 e são divididos em grupos funcionais inibidores e ativadores, que conforme a interação com seus respectivos ligantes podem gerar um “balanço”, evitando ou causando a lise da célula alvo⁵⁰⁻⁵².

O presente trabalho tem como objetivo estudar a associação dos genes KIR e HLA com o câncer de próstata. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sob o número 09-277.

JUSTIFICATIVA

As células NK e os genes KIR têm uma importante e comprovada relação com o câncer. As identificações de polimorfismos dos genes KIR e HLA de classe I com o câncer de próstata poderiam oferecer melhor compreensão sobre o possível papel das células NK no controle do crescimento tumoral.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 CÂNCER DE PRÓSTATA

O câncer de próstata (CaP) é o segundo câncer mais diagnosticado e a sexta causa de morte em homens, representando 14% do total de novos casos de câncer e 6% do total de mortes por câncer em homens no ano de 2008. A prevalência do CaP aumenta com a idade, com média de diagnóstico aos 72 anos, sendo uma doença que afeta predominantemente homens mais velhos^{1,2}.

O CaP envolve a proliferação de células epiteliais localizadas predominantemente na zona periférica da glândula prostática. Sua causa ainda não é bem compreendida, embora alguns fatores possam influenciar em seu surgimento. Esses fatores podem ser endógenos como alterações hormonais e história familiar, ou exógenos como dieta, agentes ambientais, exposição a radiações ou substâncias químicas. Além disso, a idade, raça e estresse oxidativo também são considerados fatores de risco para o desenvolvimento do CaP³⁻⁵.

A maioria dos tumores prostáticos é assintomática, desenvolvendo-se de forma lenta e silenciosa, contudo alguns sintomas podem ser percebidos, geralmente associados com alteração urinária. O diagnóstico precoce e o tratamento do CaP são fatores determinantes para a sobrevida e prognóstico dos pacientes⁶⁻⁸.

Os métodos utilizados para o diagnóstico do CaP incluem o exame do toque retal, a dosagem sérica do antígeno prostático específico (PSA- *Prostate specific antigen*), a ultra-

sonografia transretal e a biópsia da próstata. O teste do PSA em conjunto com o toque retal são considerados essenciais para diagnóstico do CaP. As diretrizes da *American Cancer Society* recomendam que o PSA e o toque retal sejam realizados a partir dos 50 anos, anualmente, e para homens com história familiar da doença, a partir dos 40 anos^{9,10}.

Os níveis de PSA na faixa de 2,5 a 4 ng/ml, juntamente com o toque retal, são comumente utilizados como limite para a decisão de realizar uma biópsia de próstata. Isto é, principalmente, devido ao fato de que o PSA não é um marcador específico para o CaP, pois seus níveis séricos aumentam na hiperplasia prostática benigna (HPB) e são afetados por outros fatores, como medicamentos, manipulação urológica e inflamação. No entanto, o PSA tem alto valor prognóstico, visto que seus níveis estão diretamente relacionados à progressão ou regressão do tumor. Assim, pode-se avaliar a eficiência do tratamento pela diminuição das concentrações séricas do PSA¹¹⁻¹³.

O diagnóstico definitivo do CaP é realizado pelo estudo histopatológico do tecido obtido pela biópsia da próstata, que avalia o grau de diferenciação do tecido utilizando o Escore de Gleason. Esse sistema está baseado no nível de diferenciação e do padrão de crescimento das células cancerosas, além de auxiliar na determinação do tratamento para o paciente. Os escores totais variam de 2 a 10. Em geral, quanto maior o escore, pior o prognóstico^{14,15}.

O CaP pode ter efeitos muito variáveis, dependendo da idade do paciente, do potencial de extensão do tumor e do seu grau de malignidade e agressividade. De acordo com esses parâmetros, foi adotado um sistema de estadiamento “TNM” desenvolvido pelo *The American Joint Committee on Cancer*, que descreve os estágios do câncer. Nesse sistema o “T” se refere à

extensão do tumor primário, “N” a ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais e “M” a presença ou ausência de metástase á distância^{16,17}.

O tratamento para o CaP pode aumentar a sobrevida de muitos pacientes. Para o tratamento da doença inclui-se, principalmente, a prostatectomia radical, que é a remoção cirúrgica de parte ou de toda a próstata; a radioterapia, que usa radiação externa com isótopos radioativos; a braquiterapia, a qual utiliza o implante de “sementes” radioativas; a administração de bloqueadores hormonais; e a observação vigilante, que é uma opção empregada apenas em pacientes com tumores de baixo grau histológico. A opção de tratamento tem aplicação variada conforme o caso, dependendo do estadiamento clínico, se o tumor é localizado, localmente avançado ou metastático¹⁸⁻²⁰.

Mesmo utilizando parâmetros clínicos como o Escore de Gleason, níveis séricos de PSA e estadiamento do tumor, ainda é difícil prever o prognóstico dos pacientes. Atualmente, estudos moleculares representam uma nova possibilidade de auxílio a esses parâmetros, sendo que muitos deles propõem associações entre polimorfismos genéticos e a doença^{21,22}.

Um destes estudos foi a descoberta da relação entre o CaP e o número de repetições da sequência nucleotídica “CAG” no gene do receptor de androgênios (AR), gene altamente polimórfico que codifica este receptor, diretamente envolvido na doença. O trabalho relatou que um menor número de repetições “CAG” no gene AR está associado a um maior grau de agressividade do tumor²³.

Também foi proposta uma relação entre o polimorfismo do gene CYP17 e o CaP, e a conclusão foi que indivíduos com o alelo CYP17 A2 apresentam mais chance de desenvolver a patologia²⁴.

Outros estudos propuseram ainda uma relação entre o polimorfismo do gene do receptor de vitamina D (VDR) e o CaP, indicando que homens com o genótipo recessivo para este gene apresentam apenas 1/3 de chance de desenvolver a doença, em comparação com os demais²⁵.

A associação de genes com evidências experimentais e o CaP foi mostrada em um estudo de metanálise, que identificou um número considerável de novos genes candidatos ao desenvolvimento da doença. Foram identificados 10 genes, sendo CDC2, CCNA2, IGF1, EGR1, SRF, CTGF, CCL2, CAV1, SMAD4 e AURKA, genes que formam uma rede de interação e, portanto, é provável que sejam os condutores primários no desenvolvimento do CaP²⁶.

Outro trabalho recente quantificou e comparou os níveis de metilação absoluta entre 28 genes candidatos, utilizando 48 amostras de CaP e 29 amostras de HPB, usando o método de pirosequenciamento para identificar genes com potencial diagnóstico e prognóstico. No geral, 20 dos 28 genes investigados foram capazes de distinguir entre HPB e tecidos de câncer, como o RARB que mostra perfeita habilidade de discriminação. Os resultados sugerem que enquanto a metilação de alguns genes demonstra características mais promissoras para o diagnóstico, como RARB, HIN1, HLAa e GSTP1, outros, como SFN, SLIT2 e SERPINB5, merecem uma validação adicional como marcadores de prognóstico²⁷.

Uma vantagem da descoberta e da definição do papel funcional dos genes que são diferencialmente expressos no CaP seria a utilização destes genes como novos potenciais marcadores para diagnóstico, prognóstico e estadiamento, bem como potenciais alvos de terapia do CaP²⁸.

1.2 CÉLULA NATURAL KILLER

As células *Natural Killer* (NK) são um subtipo de linfócitos que fazem parte da imunidade inata para defesa do organismo contra patógenos infecciosos invasivos e transformações malignas, através de citocinas e atividade citolítica. Desde a década de 1980, as células NK foram consideradas a primeira linha de defesa contra células tumorais. Nessa época, foi demonstrado que essas células tinham atividade citotóxica contra diversos tipos de leucemias, tanto de células primárias quanto de linhagens estabelecidas^{29,30}.

São encontradas no sangue periférico e baço, raramente em outros tecidos linfóides, pulmão, trato gastrointestinal e no útero gravídico, sendo 10-15% das células mononucleares circulantes do sangue. Apresentam marcadores de superfície CD16 e CD56 e ausência do receptor de célula T (TCR). Fenotipicamente, as células NK são CD3⁻CD2⁺CD16⁺CD56⁺CD14⁻CD19⁻
³¹⁻³².

Essas células se diferem das células T e B, sendo de baixa densidade, linfócitos granulares grandes que se desenvolvem e diferenciam principalmente na medula óssea, e depois entram na circulação. Assim como os grânulos dos linfócitos T citotóxicos (CTLs), os grânulos das células

NK contêm perforinas e granzimas, ambos importantes na função citotóxica. Os grânulos podem estar presentes em várias formas, dependendo do estágio de ativação celular^{33,34}.

Funcionalmente, as células NK são uma fonte importante de citocinas de imunorregulação, como interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e Interleucinas (IL-3, IL-5, IL-10, IL-13), que regulam a função de macrófagos, linfócitos, hemácias e células dendríticas. As células NK também têm atividade citotóxica direta ou natural contra algumas células infectadas por vírus, células leucêmicas e outras células tumorais e também mediam citotoxicidade celular dependente de anticorpo (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*- ADCC), por força da expressão do CD16, sendo efetoras na imunidade inata contra tumores e células infectadas por vírus³⁵⁻³⁷.

A atividade das células NK é estimulada, principalmente, pelas citocinas IL-2, IL-12, IL-15 e IL-18. A IL-2, através das cadeias β e γ das células e do receptor (IL-2R), estimula a proliferação e as funções efetoras das células NK. A IL-12 ativa as células NK, promove secreção de INF- γ pelas células NK e células T e acelera a atividade citotóxica das células NK e dos CTLs. A IL-15, que é produzida principalmente por macrófagos, também tem um papel importante na ativação celular, aumentando a resposta contra vírus. E, enfim, a IL-18 sinergiza com a IL-12, estimulando a produção do INF- γ pelas células NK e pelas células T³⁸⁻⁴⁰.

Durante a resposta imune, as células NK podem provocar ataque direto as células alvo e interagir com células dendríticas. Para isso, elas usam dois diferentes mecanismos citolíticos, como a apoptose ativada por grânulos, com liberação de perforinas e granzimas e a apoptose

induzida pela interação Fas/FasL, da superfamília dos receptores de necrose tumoral (TNRF). 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 TNF⁴¹⁻⁴³.

A atividade citolítica e a produção de citocinas pelas células NK estão reguladas por diversos receptores de superfície, também presentes em alguns linfócitos T, e responsáveis pela identificação de agentes infecciosos e de células transformadas. Os receptores compreendem famílias distintas. A primeira família a ser descoberta é chamada de família do receptor *killer* semelhante à Ig (*killer Ig-like receptor* – KIR). A segunda família consiste nos transcritos semelhantes à Ig, chamada de ILTs (*Ig-like transcripts*), também chamados de LIRs (*leukocyte Ig-like receptors*), expressos em células B e T, não sendo específico das células NK. A terceira família consiste em heterodímeros compostos da lectina C NKG2 co-valentemente ligada ao CD94 (CD94/NKG2A, ligante do HLA-E com função inibidora; e NKG2D, ligante do MICA com função ativadora)⁴⁴⁻⁴⁷.

1.3 RECEPTORES KIR

Os receptores KIR são representantes da família das imunoglobulinas presentes na superfície celular, sendo expressos em células NK e em alguns linfócitos T (NKT)^{48,49}.

Localizados no cromossomo 19q13.4, na região do complexo de receptores leucocitários (LRC), os receptores KIR possuem 17 genes descobertos até o momento, sendo divididos em

grupos funcionais inibidores e ativadores. 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) e dois pseudogenes (2DP1 e 3DP1). Destes, quatro genes KIR (3DL3, 3DP1, 2DL4, 3DL2) estão sempre presentes e são considerados genes estruturais, pois sugerem certa estabilidade em relação à recombinação genética⁵⁰⁻⁵².

A nomenclatura dos receptores KIR está baseada na estrutura da cauda citoplasmática do gene e no número de domínios extracelulares de imunoglobulina (Figura 1).

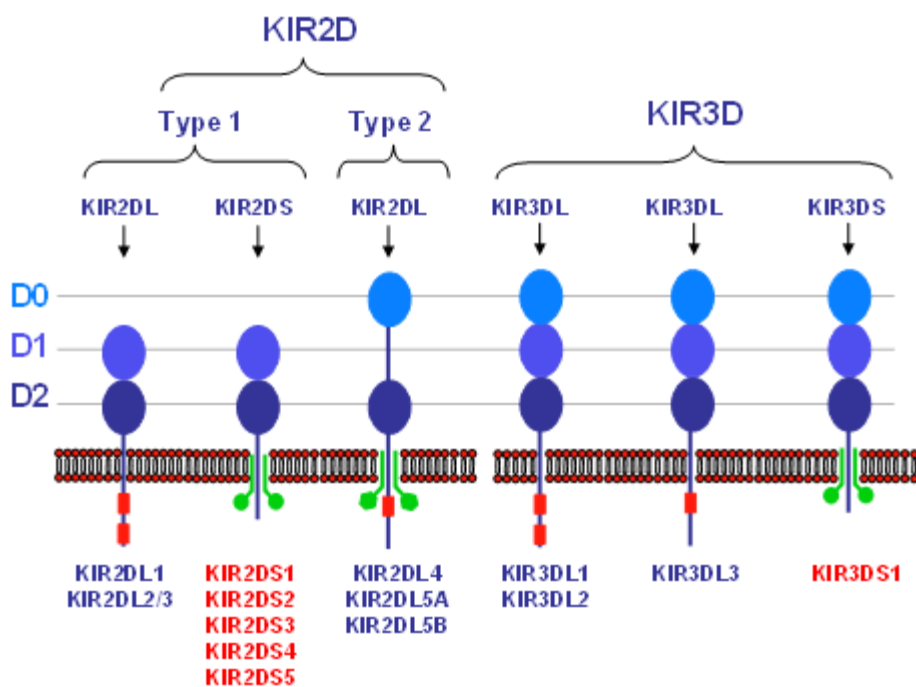


Figura 1: Estrutura dos genes KIR (Steven Marsh, Anthony Nolan Institute, UK)

Os receptores inibitórios, que evitam a lise da célula alvo, possuem uma cauda citoplasmática longa, por isso a denominação da letra “L” (*long*). Já os receptores ativadores, que causam a lise da célula alvo, receberam a denominação da letra “S” (*short*) devido à causa citoplasmática curta^{53,54}.

Os receptores que possuem cadeias citoplasmáticas longa têm dois motivos moleculares inibitórios (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs* – ITIMs) que iniciam a inibição das células NK e células T com atividade citotóxica pelo recrutamento de fosfatases da tirosina. A cadeia citoplasmática curta transmite sinais ativadores através da sua interação com o DAP-12, que contém motivos moleculares ativadores (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs* – ITAMs)^{55,56}.

Os domínios extracelulares são responsáveis pelo reconhecimento da célula alvo. Alguns possuem dois domínios de imunoglobulina (denominados 2D) e outros possuem três domínios de imunoglobulina (denominados 3D). Os três domínios existentes são conhecidos como D0, D1 e D2. Os receptores com dois domínios podem ser de tipos diferentes: o tipo 1 possui os domínios D1 e D2 (KIR2DL1/2/3 e KIR2DS1/2/3/4/5), devido à remoção do exon 3, e o tipo 2 possui os domínios D0 e D2 (KIR2DL4/5), por causa da deleção do exon 4^{57,58}.

A ordem dos genes KIR no cromossomo foi determinada em duas categorias, haplótipo A e B (Figura 2). O haplótipo A tem como característica a dominância dos genes que inibem os receptores (2DL1, 2DL3, 2DL4, 3DL1, 3DL2 e 3DL3), existindo somente um gene ativador (2DS4). Já o haplótipo B, é marcado por várias combinações de 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS5, 3DS1 e 2DS4 e também pela presença de 2DL2 e ausência de 2DL1 e 2DL3 como inibidores. Os genes

estruturais 3DL3, 3DP1, 2DL4, 3DL2 estão presentes em todos (ou quase todos) os haplótipos. A variação de haplótipos já foi demonstrada através do estudo de diferentes populações⁵⁹⁻⁶¹.

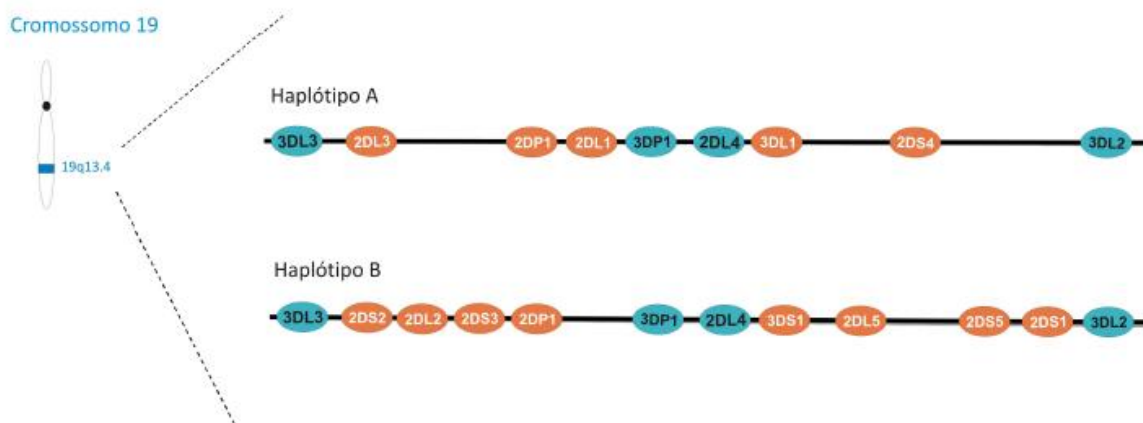


Figura 2: Haplótipos dos Genes KIR

1.3.1 LIGANTES DOS RECEPTORES KIR

As células NK reconhecem as moléculas do Antígeno Leucocitário Humano (*human leukocyte antigen* – HLA) de classe I clássicas (HLA-A, HLA-B e HLA-C) e não clássicas (HLA-E e HLA-G), presentes nas células, por intermédio desta família de receptores de superfície envolvida na sua atividade citolítica. Com isso, a atividade da célula NK depende de um determinado antígeno HLA de classe I expresso na superfície das células e de um KIR específico, ativador ou inibidor, expresso na célula NK (Tabela 1)^{62,63}.

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

Tabela 1: Receptores KIR e seus respectivos ligantes

A especificidade da interação KIR/HLA é definida por um dimorfismo do HLA-Cw na posição 80 e um dimorfismo na posição 44 do receptor KIR. O dimorfismo nas posições 77 e 80 da sequência do aminoácido definem dois grupos do HLA-C distintos serologicamente: o grupo 1 (C1) caracterizado pela Ser77/Asn80 e o grupo 2 (C2) que apresenta Asn77/Lys80. O grupo C1 consiste do HLA-Cw1, -Cw3, -Cw7, -Cw8, -Cw13, -Cw14 e o grupo C2 é composto do HLA-Cw2, -Cw4, -Cw5, -Cw6, -Cw17, -Cw18, sendo que KIR 2DL2, 2DL3 e 2DS2 são ligantes do HLA-C1 e KIR 2DL1 e 2DS1 reconhecem o HLA-C2⁶⁴⁻⁶⁷.

O HLA-B pode ser dividido em dois grupos: Bw4 e Bw6. KIR3DL1/KIR3DS1 interagem com o HLA-Bw4 (que difere do Bw6 devido a um polimorfismo na posição 77 e 80). O KIR3DL1 interage com moléculas HLA-B quando sorologicamente forem Bw4, sendo que, se essas apresentarem isoleucina (Ile) na posição 80, acontece maior inibição de lise mediada pela célula NK. Não se conhecem interações de alta afinidade com moléculas Bw6⁶⁸⁻⁶⁹.

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. As células NK em repouso podem ser estimuladas a produzir citocinas e quimiocinas por HLA-G solúvel. A atividade das células NK é regulada por um equilíbrio entre os sinais provocados por receptores ativadores e inibidores^{69,70} (Figura 3).

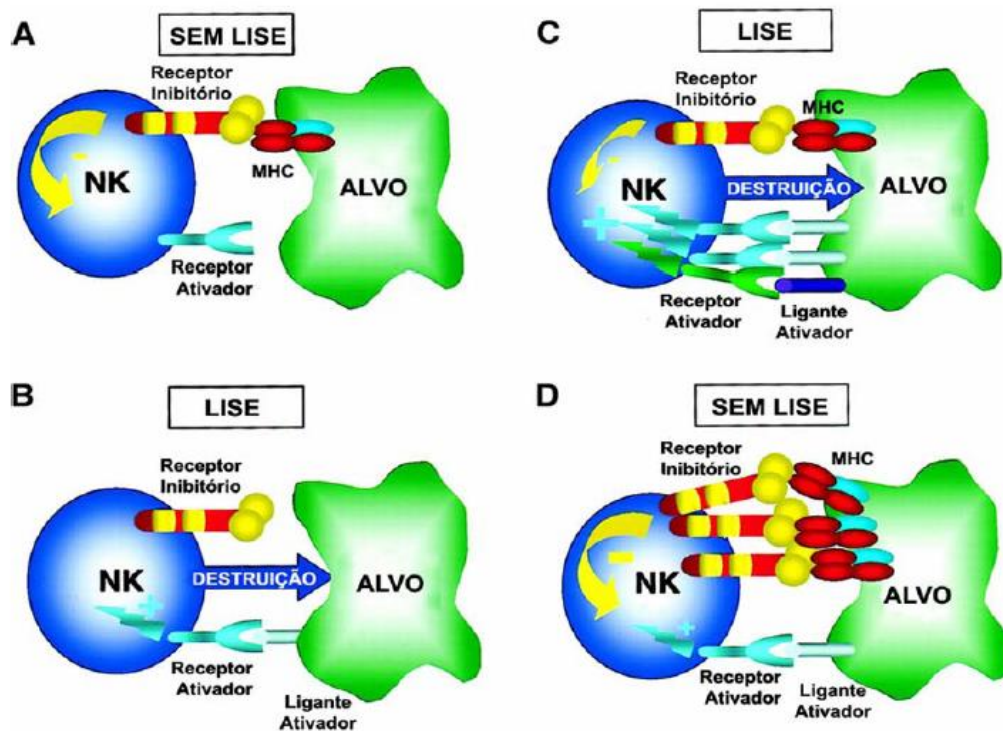


Figura 3: Ativação e inibição das células NK com a célula alvo⁷⁰

Em A, o sinal inibidor prevalece por não haver ligação de nenhum receptor ativador. Em B, há ligação de receptor ativador na ausência de sinais inibidores, de forma que ocorre lise da célula alvo. C e D representam situações em que ocorrem simultaneamente ligações de receptores ativadores e inibidores. Se houver mais sinais ativadores do que inibidores, ocorre lise da célula

alvo. Por outro lado, se houver mais sinais inibidores do que ativadores (D), a célula alvo será protegida. As células NK estão sempre prontas para matar. Elas fazem um processo contínuo de vigilância imunológica, averiguando se todas as células estão expressando corretamente as moléculas HLA⁷¹.

1.3 CÉLULAS NK E CÂNCER

A célula NK tem a capacidade de atacar células tumorais e a deficiência delas leva a expansão do tumor. Entretanto, elas não possuem a capacidade de inibir o seu desenvolvimento. Ainda, a atividade de morte da célula tumoral dá-se particularmente pelas citocinas IL-12, IL-15 e IL18⁷².

As células NK podem destruir muitas células tumorais, especialmente aquelas que possuem expressão reduzida do HLA classe I e podem escapar da lise dos linfócitos T citotóxicos. As células NK também podem responder na ausência de moléculas de HLA classe I, pois o reconhecimento dessas moléculas libera sinais inibidores para célula NK⁷³.

A atividade das células NK foi medida em pacientes de câncer de próstata não tratados e o resultado mostrou que o nível da atividade destas células estava correlacionado com a presença de células tumorais na circulação, sendo que nos indivíduos livres de tumor a atividade da célula NK estava reduzida⁷⁴.

Há evidências de que as células NK possuem uma potente atividade citotóxica em linhagens celulares de pacientes com câncer de próstata em estágio avançado. Alguns estudos

relacionados com câncer e o polimorfismo dos genes KIR têm sido citados na literatura, como câncer de rim, cervical, nasofaríngeo, coloretal, laringe e de bexiga⁷⁵⁻⁷⁸.

REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. *Ca Cancer J Clin* 2011; 61:69-90.
2. Stephen J. Freedland, MD. Screening, Risk Assessment, and the Approach to Therapy in Patients With Prostate Cancer. *Cancer* 2011; 117:1123-35.
3. Jadvar H. Prostate cancer. *Methods Mol Biol* 2011;727:265-90.
4. Bostwick DG, Burke HB, Djakiew D, et al. Human prostate cancer risk factors. *Cancer* 2004; 101:2371-2490.
5. Bratt O, Kristiffersson U, Lundgren R, et al. Familial and hereditary prostate cancer in southern Sweden. A population-based case-controls study. *European Journal of cancer* 1999; 35: 272-277.
6. Alonso-Sandoica E, Jara-Rascon J, Martinez-Salamanca JI, et al. Validity of digital Rectal Examination in the era of prostate specific antigen. *Aten Primaria* 2006; 37:9-17.
7. Abate-Shen C, Shen MM. Diagnostics: The prostate-cancer metabolome. *Nature* 2009; 457:799-800.
8. Gudmundsson J, Besenbacher S, Sulem P, Gudbjartsson DF, Olafsson I, Arinbjarnarson S, et al. Genetic Correction of PSA Values Using Sequence. Variants Associated with PSA Levels. *Sci Transl Med* 2010; 15:62-92.
9. Roehrborn CG, Gregory A, McConnell JD, Sagalowsky AI, Wians FH Jr. Comparison of three assays for total serum prostate-specific antigen and percentage of free prostate-specific antigen in predicting prostate histology. *Urology* 1996; 48:23-32.
10. Smith RA, Cokkinides V, Eyre HJ. American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer. *CA Cancer J Clin* 2004; 54:41-52.

11. Polascik TJ, Oesterling JE, Partin AW. Prostate specific antigen: a decade of discovery-- what we have learned and where we are going. *J Urol* 1999;162:293-306.
12. Barry MJ, Screening for prostate cancer- the controversy that refuses to die. *N Engl J Med* 2009; 360:1351-1354.
13. Stamey TA, Kabalin JN. Prostate specific antigen in the diagnosis and treatment of adenocarcinoma of the prostate. I. Untreated patients. *J Urol* 1989;141:1070-5.
14. Stark JR, Perner S, Stampfer MJ, et al. Gleason Score and Lethal Prostate Cancer: Does 3 + 4 = 4 + 3? *J Clinical Oncology* 2009;1-6.
15. Buhmeida A, Pyrhönen S, Laato M, Collan Y. Prognostic factors in prostate cancer. *Diagn Pathol* 2006;1:4.
16. Sobin LH, Wittekind CH. TNM classification of malignant tumors. International Union Against Cancer 1997; 5:180-182.
17. Hong SK, Han BK, Chung JS, Park DS, Jeong SJ, Byun SS, et al. Evaluation of pT2 subdivisions in the TNM staging system for prostate cancer. *BJU Int* 2008; 102:1092-6
18. Hadaschik BA, Gleave ME, Martin E, Gleave MD. Therapeutic options for hormone-refractory prostate cancer in 2007. *Urol Oncol* 2007;25:413-9.
19. Richaud P, Chapet O, Azria D, Soulié M, Salomon L, Hennequin C, et al. Prostate cancer 2010. Therapeutic innovations. *Cancer Radiother* 2011;15:7-11.
20. Bossi A. Which modality for prostate brachytherapy? *Cancer Radiother* 2010;14:488-92.
21. Singh D, Febbo PG, Ross K, Jackson DG, Manola J, Ladd C, et al. Gene expression correlates of clinical prostate cancer behavior. *Cancer Cell* 2002;1:203-9.
22. Laitinen S, Martikainen PM, Tolonen T, Isola J, Tammela TL, Visakorpi T. EZH2, Ki-67 and MCM7 are prognostic markers in prostatectomy treated patients. *Int J Cancer* 2008;122:595-602.
23. Giovannucci E, Stampfer MJ, Krithivas K, Brown M, Dahl D, Brufsky A, et al. The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:3320-3323.

24. Lunn RM, Bell DA, Mohler JL, Taylor JA. Prostate cancer risk and polymorphism in 17 hydroxylase (CYP17) and steroid reductase (SRD5A2). *Carcinogenesis* 1999; 20:1727-1731.
25. Taylor JA, Hirvonen A, Watson M, Pittman G, Mohler JL, Bell DA. Association of prostate cancer with vitamin D receptor gene polymorphism. *Cancer Research* 1996; 56:4108-4110.
26. Gorlov IP, Sircar K, Zhao H, Maity SN, Navone NM, Gorlova OY et al. Prioritizing genes associated with prostate cancer development. *BMC Cancer* 2010;10:599.
27. Vasiljević NA, Wu K, Brentnall AR, Kim DC, Thorat MA, Kudahetti SC, et al. Absolute quantitation of DNA methylation of 28 candidate genes in prostate cancer using pyrosequencing. *Dis Markers* 2011;30:151-61.
28. Cooper CS, Campbell C, Jhavar S. Mechanisms of Disease: biomarkers and molecular targets from microarray gene expression studies in prostate cancer. *Nat Clin Pract Urol* 2007; 12: 677-687.
29. Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 1990;76:2421-38.
30. Yan Y, Steinherz P, Klingemann HG, Dennig D, Childs BH, McGuirk J, et al. Antileukemia activity of a natural killer cell line against human leukemias. *Clin Cancer Res* 1998;4:2859-68.
31. Miller JS. The biology of natural killer cells in cancer, infection, and pregnancy. *Exp Hematol* 2001;29:1157-68.
32. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 1989;47:187-376.
33. Freud AG, Caligiuri MA. Human natural killer cell development. *Immunol Rev.* 2006;214:56-72.
34. Storek J, Witherspoon RP, Storb R. T cell reconstitution after bone marrow transplantation into adult patients does not resemble T cell development in early life. *Bone Marrow Transplant* 1995;16:413-25.
35. Farag SS, Caligiuri MA. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev* 2006;20:123-37.

36. Ugolini S, Vivier E. Immunology: Natural killer cells remember. *Nature* 2009;457:544-5.
37. Handa K, Suzuki R, Matsui H, Shimizu Y, Kumagai K. Natural killer (NK) cells as a responder to interleukin 2 (IL 2). II. IL 2-induced interferon gamma production. *J Immunol* 1983;130:988-92.
38. Hamerman JA, Ogasawara K, Lanier LL. NK cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2005;17:29-35.
39. Del Vecchio M, Bajetta E, Canova S, Lotze MT, Wesa A, Parmiani G, et al. Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clin Cancer Res* 2007;13:4677-85
40. Kannan Y, Yu J, Raices RM, Seshadri S, Wei M, Caligiuri MA, et al. I κ B ζ augments IL-12- and IL-18-mediated IFN- γ production in human NK cells. *Blood* 2011;117:2855-63.
41. Zhang AL, Colmenero P, Purath U, Teixeira de Matos C, Hueber W, Klareskog L, et al. Natural killer cells trigger differentiation of monocytes into dendritic cells. *Blood* 2007;110:2484-93.
42. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2002;2:735-47.
43. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 2005;42:501-10.
44. Moretta L, Bottino C, Pende D, Castriconi R, Mingari MC, Moretta A. Surface NK receptors and their ligands on tumor cells. *Semin Immunol* 2006;18:151-8.
45. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL. et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999;285:727-9.
46. Lanier LL, Corliss B, Wu J, Phillips JH. Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity* 1998;8:693-701.
47. Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 2002;20:217-51.
48. Van Kaer L. NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions. *Curr Opin Immunol* 2007;19:354-64.

49. Moretta A, Tambussi G, Bottino C, Tripodi G, Merli A, Ciccone E, 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* 1990;171:695-714.
50. Suto Y, Maenaka K, Yabe T, Hirai M, Tokunaga K, Tadok K, et al. Chromosomal localization of the human natural killer cell class I receptor family genes to 19q13.4 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 1996;35:270-2.
51. Wilson MJ, Torkar M, Haude A, Milne S, Jones T, Sheer D, et al. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:4778-83.
52. Rajalingam R, Hong M, Adams EJ, Shum BP, Guethlein LA, Parham P, Short KIR. Haplotypes in pygmy chimpanzee (Bonobo) resemble the conserved framework of diverse human KIR haplotypes. *J Exp Med* 2001;193:135-46.
53. Fan QR, Mosyak L, Winter CC, Wagtmann N, Long EO, Wiley DC. Structure of the inhibitory receptor for human natural killer cells resembles haematopoietic receptors. *Nature* 1997;389:96-100.
54. Campbell KS, Dessing M, Lopez-Botet M, Cella M, Colonna M. Tyrosine phosphorylation of a human killer inhibitory receptor recruits protein tyrosine phosphatase 1C. *J Exp Med* 1996;184:93-100.
55. Lanier LL, Corliss BC, Wu J, Leong C, Phillips JH. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* 1998;391:703-7.
56. Lanier LL. DAP10- and DAP12-associated receptors in innate immunity. *Immunol Rev* 2009;227:150-60.
57. Marsh SG, Parham P, Dupont B, Geraghty DE, Trowsdale J, Middleton D, et al. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Tissue Antigens* 2003;62:79-86.
58. Biassoni R, Cantoni C, Falco M, Verdiani S, Bottino C, Vitale M, 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* 1996;183:645-50.

59. Martin AM, Kulski JK, Gaudieri S, Witt CS, Freitas EM, Trowsdale J, et al. Comparative genomic analysis, diversity and evolution of two KIR haplotypes A and B. *Gene* 2004;335:121-31.
60. Hsu KC, Liu XR, Selvakumar A, Mickelson E, O'Reilly RJ, Dupont B. Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *J Immunol* 2002;169:5118-29.
61. Norman PJ, Stephens HA, Verity DH, Chandanayingyong D, Vaughan RW. Distribution of natural killer cell immunoglobulin-like receptor sequences in three ethnic groups. *Immunogenetics* 2001;52:195-205.
62. Parham P. Killer cell immunoglobulin-like receptor diversity: balancing signals in the natural killer cell response. *Immunol Lett* 2004;92:11-3.
63. Boyington JC, Motyka SA, Schuck P, Brooks AG, Sun PD. Crystal structure of an NK cell immunoglobulin-like receptor in complex with its class I MHC ligand. *Nature* 2000;405:537-43.
64. Winter CC, Long EO. 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* 1997;158:4026-8.
65. Guethlein LA, Flodin LR, Adams EJ, Parham P. 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* 2002;169:220-9.
66. Long BR, Ndhlovu LC, Oksenberg JR, Lanier LL, Hecht FM, Nixon DF, et al. Conferral of enhanced natural killer cell function by KIR3DS1 in early human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 2008;82:4785-92.
67. O'Connor GM, Guinan KJ, Cunningham RT, Middleton D, Parham P, Gardiner CM. Functional polymorphism of the KIR3DL1/S1 receptor on human NK cells. *J Immunol* 2007;178:235-41.
68. Carr WH, Pando MJ, Parham P. KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. *J Immunol* 2005;175:5222-9.

69. Jobim M, Jobim LF. Natural killer cells and immune surveillance. *J. Pediatr* 2008;84:58-67.
70. Moretta A, Sivori S, Vitale M, Pende D, Morelli L, Augugliaro R, et al. Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells. *J Exp Med*. 1995 Sep 1;182(3):875-84.
71. Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 2002;100:1935-47.
72. Rich R, Fleisher T, Shearer W, Schroeder H, Frew A, Weyand C. *Clinical Immunology: Principles and Practice*. 2th edition, 2001, Toronto: Mosby.
73. Abbas AK, Lichtman HL, Pober JS, *Cellular and Molecular Immunology*. 4th edition, 2000, Philadelphia: Saunders.
74. Tarle M, Kraljić I, Kastelan M. Comparison between NK cell activity and prostate cancer stage and grade in untreated patients: correlation with tumor markers and hormonal serotest data. *Urol Res* 1993;21:17-21.
75. Oikawa T, Kawai K, Ishiwata I, Ohno T, Akaza H. Induction of potent antitumour natural-killer cells from peripheral blood of patients with advanced prostate cancer. *BJU Int* 2003;92:1009-15.
76. Carrington M, Wang S, Martin MP, Gao X, Schiffman M, Cheng J, et al. Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. *J Exp Med* 2005; 201:1069-75.
77. Butsch Kovacic M, Martin M, Gao X, Fuksenko T, Chen CJ, Cheng YJ, et al. Variation of the Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptors and HLA-C Genes in Nasopharyngeal Carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:2673-7.
78. Middleton D, Vilchez JR, Cabrera T, Meenagh A, Williams F, Halfpenny I, et al. Analysis of KIR gene frequencies in HLA class I characterised bladder, colorectal and laryngeal tumours. *Tissue Antigens* 2007;69:220-6.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o polimorfismo dos genes KIR e HLA classe I em pacientes com câncer de próstata (CaP) e grupo controle.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a frequência dos diversos polimorfismos dos genes KIR (2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DP1, 2DS5, 3DS1) através do método PCR-SSP, em pacientes com CaP e grupo controle;
- Avaliar a interação dos genes HLA classe I (C1, C2, Bw4, A3, A11), ligantes dos genes KIR, através do método PCR-SSP, em pacientes com CaP e grupo controle.

3 ARTIGO ORIGINAL

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

Pâmela Portela^a, Luiz Fernando Jobim^{a,b}, Patrícia H. Salim^a, Walter J. Koff^{b,c}, Timothy J. Wilson^a, Maria Regina Jobim^a, Gilberto Schwartzmann^{d,e,f}, Rafael Roesler^{e,f,g}, Mariana Jobim^{a,*}

^a*Department of Immunology, Hospital de Clínicas, Porto Alegre, Brazil*

^b*Graduate Course in Surgery, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

^c*Department of Urology, Hospital de Clínicas, Porto Alegre, Brazil*

^d*Department of Internal Medicine, School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

^e*Cancer Research Laboratory, University Hospital Research, Center (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

^f*National Institute for Translational Medicine (INCT-TM), Porto Alegre, RS, Brazil*

^g*Laboratory of Neuropharmacology and Neural Tumor Biology, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

*Corresponding author

Mariana Jobim, MD

Department of Immunology, Hospital de Clínicas

Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, Brazil

Tel and fax: 55 51 3359 8020

E-mail: mjobim@hcpa.ufrgs.br

ABSTRACT

Prostate cancer is the second most common cancer in men, with a significant increase of incidence and mortality in men over fifty years of age. 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 immunoglobulin-like receptors (KIR). The aim of our study is to evaluate the association between the KIR genes and HLA alleles in patients with prostate cancer and healthy controls. Two hundred prostate cancer patients and 185 healthy controls were typed for HLA class I and KIR genes by PCR-SSP. When both groups were compared, no significant differences were found for HLA-C group 1 and group 2, HLA-Bw4, HLA-A3 and A11. No difference was seen either in KIR frequency between patients with prostate cancer and controls. In conclusion, our data suggests no potential role for the KIR gene system in prostate cancer.

Key words:

Human leukocyte antigen; Killer cell immunoglobulin-like receptor; Prostate Cancer; Natural killer cell

1. INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa) is one of the most common solid tumors in men; its metastatic form represents the second cause of cancer-related death (Flavin *et al.*, 2011; Peraldo-Neia *et al.*, 2011). Although some risk factors for PCa have been already described, further studies are needed to better explain the causes of the disease. These factors may be endogenous, related to hormonal changes and family history, or exogenous ones that entail environmental radiation, or chemicals. In addition, age, race and oxidative stress are also considered to be risk factors for the development of PCa (Bostwick *et al.*, 2004; Mcdowell *et al.*, 2009).

Several studies have suggested the involvement of genetic factors in PCa risk. Evidence for this concept comes from studies of relatives of patients with PCa (Lichtenstein *et al.*, 2000) and from studies in patients with abnormalities in well known cancer-associated genes such as BRCA2 and BRCA1 (Struwingn *et al.*, 1997). Genome-wide association studies have also encountered genetic variations in the form of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) which have been associated with a greater risk of PCa. Each SNP has only a moderate association, but when SNPs are combined, the association may be stronger (Zhen *et al.*, 2008). Individuals with the CYP17 A2 allele, have greater chances of developing PCa (Lunn *et al.*, 1999; Souiden *et al.*, 2010). Another study has found a relationship between PCa and the number of repeats of the "CAG" nucleotide sequence in the androgen receptor (AR) gene. This study has reported that a lower number of "CAG" repetitions in the AR gene are associated with a higher degree of tumor aggressiveness (Giovannucci *et al.*, 1997). A relationship between the gene polymorphism of the vitamin D receptor (VDR) and PCa has been also proposed, thus men with the recessive genotype for this gene have only one third of a chance of developing the disease (Taylor *et al.*, 1996).

Natural killer (NK) cells participate in innate immunity and have the ability to kill tumor and virus-infected cells (Parham, 2005). Class I HLA molecules are recognized by the presence of NK cells through their killer immunoglobulin-like receptors (KIR). KIR receptors are divided into functional inhibitor groups that prevent target cell lysis, as well as activators that incite cell lysis (Boyton *et al.*, 2007; Parham, 2004). When the expression of class I HLA is decreased or deficient, such as during tumor transformation, the inhibitory signal is weakened and the NK cell is activated, hence leading to target cell death (Parham, 2005; Borrego *et al.*, 2002). 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 (Winter *et al.*, 1997; Guethlein *et al.*, 2002). The C1 group consists of HLA-Cw1, -Cw3, -Cw7, -Cw8, -Cw13, -Cw14. The C2 group consists of HLA-Cw2, -Cw4, -Cw5, -Cw6, -Cw17, -Cw 18. KIR2DL2, 2DL3 and 2DS2 bind HLA-C1 ligands, whereas KIR2DL1 and 2DS1 bind HLA-C2 ligands. The inhibitory KIR3DL1 recognizes HLA-B Bw4 allotypes and KIR3DL2 binds HLA-A3 and HLA-A11 (Long *et al.*, 2008; O' Connor *et al.*, 2007). Located on chromosome 19q13.4, KIR receptors have had 17 genes found so far. Eight KIR receptors are inhibitory (2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL5A, 2DL5B, 3DL1, 3DL2 and 3DL3), seven are activators (2DL4, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5 and 3DS1) and two are pseudogenes (2DP1 and 3DP1). Four in these genes (3DL3, 3DP1, 2DL4, 3DL2) are always present and considered framework genes (Wilson *et al.* 2000, Rajalingam *et al.*, 2001).

A group of patients with untreated prostate cancer was evaluated for NK activity with and results show that the level of activity of these cells was correlated with the presence of tumor cells in blood circulation, considering that NK cell activity was reduced in tumor-free individuals (Tarle *et al.*, 1993). There is evidence that NK cells hold potent cytotoxic activities in cell lines from patients with advanced prostate cancer (Oikawa *et al.*, 2003). Some studies focusing on the relationship between cervical, nasopharyngeal, colorectal, larynx, bladder, kidney and breast cancer with the polymorphism of KIR genes have been described (Carrington *et al.*, 2005; Butsch Kovacic *et al.*, 2005, Middleton *et al.*, 2007; Ozturk *et al.*, 2011).

In the present study, we examined 15 KIR genes and HLA ligands in a group of 200 prostate cancer patients and compared them with findings in 185 healthy controls, aiming at the identification of patterns of KIR genotypes and HLA ligands that could be more clearly associated with susceptibility to this disease, as well as, to better explain the role of NK cells in tumor growth. To the best of our knowledge, this is the first study examining KIR genes in patients with prostate cancer.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Patient and control samples

To analyze the combination of KIR genotypes and HLA-C ligands, we studied 200 prostate cancer patients from the Urology Clinic of Hospital de Clínicas de Porto Alegre and 185 healthy unrelated individuals with PSA <2.5 ng/ml and normal digital rectal examination. This study was approved by the Research Ethics Board of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (IRB0000921) and all parents signed an informed consent for participating in this study.

2.2. Methods

Blood samples were collected by venepuncture into tubes containing EDTA as anticoagulant. After centrifugation, the buffy coat whereof DNA was extracted using the salting-out method was obtained (Miller *et al.*, 1988). DNA samples were genotyped using the Polymerase Chain Reaction method with Sequence Specific Primer (PCR-SSP) for 15 KIR genes (2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DP1, 2DS5, 3DS1). PCR primers and conditions were based on previous reports (Gomez-Lozano *et al.*, 2002). Internal control was included in each PCR reaction. The combination used to achieve a 10 µl volume reaction was 10 ng of genomic DNA, 500nM of specific primers, 2.5 U of Taq

polymerase, 0.08 µl of PCR buffer, 0.3 µl of MgCl, and 10 µl of distilled water, which was amplified by the Gene Amp PCR system 9700 (Perkin Elmer, Norwalk, CT).

Temperature cycling conditions for PCR reaction were as follows: denaturation for 3 minutes at 94°C, followed by four cycles of 15 seconds at 94°C, 15 seconds at 65°C, 15 seconds at 72°C; 21 cycles of 15 seconds at 94°C, 15 seconds at 60°C, and 30 seconds at 72°C; five cycles of 15 seconds at 94°C, 1 minute at 55°C, 2 minutes at 72°C, and a final elongation step at 72°C for 7 minutes. Resulting products were visualized under UV light after electrophoresis in 1% agarose gel containing ethidium bromide.

HLA typing Cw epitope C1 (Cw 01, 03, 07 {01-06}, 08, 12 {02, 03, 06}, 14, 16 {01, 03, 04}, and C2 (Cw 02, 04, 05, 06, 0707, 12 {04, 05}, 15, 1602, 17, 18) was done using PCR-SSP, as described by Jones *et al.*, 2006. HLA-Bw4, A3 and A11 were also done using PCR-SSP (Bunce *et al.*, 1995 and Long *et al.*, 2000).

2.3. Statistical analysis

Comparison of the KIR gene frequency with the control group was executed by Pearson χ^2 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). The number of genes used was adjusted for with the Bonferroni correction.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The distribution of KIR and HLA gene frequencies for cases and controls is shown in tables 1 and 2. As expected, KIR2DL4, KIR3DL2 and KIR3DL3 framework genes were present in all individuals. In general, no significant differences in the frequencies of KIR genes were observed among cases and controls. The presence of HLA-C group 1 was approximately 80% and C2 group was 70% in patients and controls. Furthermore, when analyzing these genes in homozygosis and heterozygosis, no difference was found in patients and controls. By comparing the two groups, no significant results were found for HLA-Bw4, A3 and A11. Table 3 and 4 displays the different correlations evaluated between the different KIR genes and their respective HLA-C ligands, and likewise there are no significant differences.

NK cells are important elements of the innate immune system, since they are able to destroy virus-infected and tumor cells (Hanna, 1982). The role of NK cells as a factor that influences the metastasis of solid tumors was carefully investigated. The ability to remove circulating tumor emboli is closely associated with the level of NK cells (Hanna, 1980). An escape mechanism used by tumor cells to avoid the attack of T cells is mediated by regulation of class I HLA molecules on their cell surface, thus making them more susceptible to NK cells-mediated lysis. However, the complete lack of expression of HLA may facilitate the destruction of tumor cells by NK cells, whereas various tumors show partial loss of HLA expression or heterozygosity (Garrido *et al.*, 1997; Yamata *et al.*, 2008). Taking into account the varied expression of KIR genes in every NK cell, it is possible that some NK cell clones are capable of lysing tumor cells (Al Omar *et al.*, 2010).

Promotion of solid tumor metastasis by surgery is experimentally reproducible, but it is unfortunately thought to occur occasionally in patients undergoing resection of solid tumors.

Because of its potential role in host defense, it is important to understand the consequences of immune surgery on tumor-bearing patients. Various studies reinforce the great significance of NK cells in this monitoring, whereas there is not an inverse correlation between the overall NK activity and the progression of various metastatic tumors (Cole, 1961). Evaluations show a direct correlation between lifetime of patients with suppressed tumors and NK cell activity (Healy *et al.*, 1985).

In a recent study, KIR and HLA genes were assessed in a population of women with cervical cancer and their biological parents. HLA-C group 1, which is a ligand of KIR genes, was significantly more transmitted in women with invasive cervical cancer, and particularly in the subgroup of women infected with the high risk HPV types: 16 or 18. These data show the involvement of HLA-C in modulating the risk of cervical cancer through its function as ligands of KIR genes (Martin *et al.*, 2010). An interesting paper published in 2005, verified that KIR and HLA gene combinations affect the risk of developing cervical neoplasia, a malignancy caused by human papillomavirus. The presence of the activating KIR3DS1, particularly when found in the absence of certain inhibitory KIR-HLA ligand pairs, was associated with increased risk of cervical cancer (Carrington *et al.*, 2005). Another study on nasopharyngeal carcinoma (NPC), which is an Epstein-Barrvirus (EBV)-associated malignancy, suggests that KIR mediated activation may be associated with NPC risk. Two distinct hypotheses could explain the possible role of KIRs in the etiology of NPC and other viral associated cancers. They proposed two possible mechanisms by which this occurs. The first explanation would be that activating KIRs (and/or reduction in inhibitory KIRs) may be have a protective role against NPC as a consequence of increased cytolysis of EBV-infected cells by activated NK cells. The alternative explanation would be that activating KIRs (and/or reduction in inhibitory KIRs) might increase risk of NPC through nonspecific inflammatory responses (Butsch Kovacic *et al.*, 2005).

HCV infected patients with certain KIR and HLA genotypes were more likely to develop liver cancer, providing genetic evidence of that over-activation of NK cell might contribute to hepatitis C progressing to hepatocellular carcinoma (HCC) development. A Spanish study found

that the human leukocyte antigen-Bw4I80 epitope and the KIR3DS1 gene were more frequent in HCV carriers than in patients with hepatocellular carcinoma (López-Vázquez *et al.*, 2005). A recent study found association of KIR genes and HLA with HCC in patients with hepatitis B (Pan *et al.*, 2011).

A report of 2007, in a group of patients with laryngeal, bladder and colorectal cancers, showed that KIR3DL1 and KIR2DS4 were significantly higher in patients with bladder tumor; no significant differences were observed in the frequencies of KIR genes for patients with laryngeal and colorectal cancer. In the group of colorectal carcinomas, there was an overall significant difference in the frequencies of C group heterozygosity and homozygosity with HLA alterations on the tumor. The authors expected that individuals who are able to clear tumor cells would be more likely to have activating genes. Therefore, when an HLA haplotype loss occurs in a tumor from a homozygous individual for HLA-C groups, there would be no change in KIR-mediated triggering, and NK cells would not eliminate these tumors. That would be a fair explanation for the findings of higher frequency of homozygosity for HLA-C groups in patients with colorectal carcinoma with HLA haplotype loss (Middleton *et al.*, 2007).

In our study, when comparing patients with prostate cancer with a control group of healthy individuals, we found no significant differences, consistent with the lack of evidence that NK cells play a role in protection against this cancer. As before, another study did not find any statistically significant difference of KIR genes between groups of solid tumors (non-small-cell lung cancer and small-cell lung cancer, colon, and kidney cancer) (Al Omar *et al.*, 2010). The density of all these data about the roles of KIR genes in tumorigenesis reflects the large variety of potential pathogenic mechanisms, immune responses, and immune break out mechanisms seen in cancers of different origins.

In conclusion, our data suggest a role of KIR gene system in prostate cancer. It would also have been of interest to examine NK cell function, and this will be the subject of a subsequent manuscript. To the best of our knowledge this was the first published study that associated KIR genes with prostate cancer; further studies should be conducted in order to deepen the understanding of the NK cells role.

CONFLITS OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Department of Immunology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. R.R. and G.S. 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

Al Omar, S., Middleton, D., Marshall, E., Porter, D., Xinarianos, G., Raji, O., *et al.* (2010) Associations between genes for killer immunoglobulin-like receptors and their ligands in patients with solid tumors. *Human Immunology*, **71**, 976.

- Borrego, F., Kabat, J., Kim, D.K., Lieto, L., Maasho, K., Peña, J., *et al.* (2002) Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Mol Immunol*, **38**, 637.
- Bostwick, D.G., Burke, H.B., Djakiew, D., Euling, S., Ho, S.M., Landolph, J., *et al.* (2004) Human prostate cancer risk factors. *Cancer*, **101**, 2371.
- Boyton, R.J. & Altmann, D.M., (2007) Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptor and human antigen class I in disease. *Clin Exp Immunol*, **149**, 1.
- Bunce, M., O'Neill, C.M., Barnardo, M.C., Krausa, P., Browning, M.J., Morris, P.J., *et al.* (1995) Phototyping: 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**, 355.
- Butsch Kovacic, M., Martin, M., Gao, X., Fuksenko, T., Chen, C.J., Cheng, Y.J., *et al.* (2005) Variation of the Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptors and HLA-C Genes in Nasopharyngeal Carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **14**, 2673.
- Carrington, M., Wang, S., Martin, M.P., Gao, X., Schiffman, M., Cheng, J., *et al.* (2005) Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. *J Exp Med*, **201**, 1069.
- Cole, W.H. (1961) Dissemination of Cancer the colon. *Gastroenterology* **41**, 412.
- Flavin, R., Zadra, G., Loda, M. (2011) Metabolic alterations and targeted therapies in prostate cancer. *J Pathol*, **223**, 283.
- Garrido, F., Ruiz-Cabello, F., Cabrera, T., Pérez-Villar, J.J., López-Botet, M., Duggan-Keen, M., *et al.* (1997) Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumors. *Immunol Today*, **18**, 89.
- Giovannucci, E., Stampfer, M.J., Krithivas, K., Brown, M., Dahl, D., Brufsky, A., *et al.* (1997) The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 3320.
- Gomez-Lozano, N. & Vilches, C. (2002) Genotyping of human killer-immunoglobulin-like receptor genes by polymerase chain reaction with sequence-specific primers an update. *Tissue Antigens*, **59**, 84.

- Guethlein, L.A., Flodin, L.R., Adams, E.J., Parham, P. (2002) 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*, **169**, 220.
- Hanna, N. (1980) Expression of metastatic potential of tumor cells in young nude mice is correlated with low levels of natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Int J Cancer*, **26**, 675.
- Hanna, N. (1982) Role of natural killer cells in control of cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, **1**, 45.
- Healy, F., Rees, R.C. & Hancock B.W. (1985) An assessment of natural killer cell mediated cytotoxicity in patients with malignant lymphoma. *Eur J Cancer Oncol*, **21**, 775.
- Hokland, M., Jacobsen, N., Ellegaard, J. & Hokland, P. (1988) Natural killer Function following allogeneic bone marrow transplantation. Very early reemergence but strong dependence of cytomegalovirus infection. *Transplantation*, **45**, 1080.
- Jones, D.C., Edgar, R.S., Ahmad, T., Cummings, J.R., Jewell, D.P., Trowsdale, J., *et al.* (2006) Killer Ig-like receptor (KIR) genotype and HLA ligand combination in ulcerative colitis susceptibility. *Genes Immun*, **7**, 576.
- Khakoo, S.I., Thio, C.L., Martin, M.P., Brooks, C.R., Gao, X., Astemborski, J., *et al.* (2004) HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science*, **305**, 872.
- Lichtenstein, P., Holm, N.V., Verkasalo, P.K., *et al.* (2000) Environmental and heritable factors in the causation of cancer-analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*, **342**, 78.
- Long, B.R., Ndhlovu, L.C., Oksenberg, J.R., Lanier, L.L., Hecht, F.M., Nixon, D.F., *et al.* (2008) Conferral of enhanced natural killer cell function by KIR3DS1 in early human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Viro*, **82**, 4785.
- Long, E.O. & Rajagopalan, S. HLA class I recognition by killer cell Ig-like receptors. (2000) *Semin Immunol*, **12**, 101.
- López-Vázquez, A., Rodrigo, L., Martínez-Borra, J., Pérez, R., Rodríguez, M., Fdez-Morera, J.L., *et al.* (2005) Protective effect of the HLA-Bw4I80 epitope and the killer cell immunoglobulin-like receptor 3DS1 gene against the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection. *J Infect Dis*, **192**, 162.

- Lunn, R.M., Bell, D.A., Mohler, J.L. & Taylor, J.A. (1999) Prostate cancer risk and polymorphism in 17 hydroxylase (CYP17) and steroid reductase (SRD5A2). *Carcinogenesis*, **20**, 1727.
- Martin, M.P., Borecki, I.B., Zhang, Z., Nguyen, L., Ma, D., Gao, X., *et al.* (2010) HLA-Cw group 1 ligands for KIR increase susceptibility to invasive cervical cancer. *Immunogenetics*, **62**, 761.
- Mcdowell, M.E., Occhipinti, S., Gardiner, R.A., Baade, P.D. & Steginga, S.K. (2009) A review of prostate-specific antigen screening prevalence and risk perceptions for first-degree relatives of men with prostate cancer. *European Journal of Cancer Care*, **18**, 545.
- Middleton, D., Vilchez, J.R., Cabrera, T., Meenagh, A., Williams, F., Halfpenny, I., *et al.* (2007) Analysis of KIR gene frequencies in HLA class I characterized bladder, colorectal and laryngeal tumors. *Tissue Antigens*, **69**, 220.
- Miller, S.A., Dykes, D.D. & Polesky, H.F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, **16**, 1215.
- O'Connor, G.M., Guinan, K.J., Cunningham, R.T., Middleton, D., Parham, P., Gardiner, C.M. (2007) Functional polymorphism of the KIR3DL1/S1 receptor on human NK cells. *J Immunol*, **178**, 235.
- Oikawa, T., Kawai, K., Ishiwata, I., Ohno, T., Akaza, H. (2003) Induction of potent antitumor natural-killer cells from peripheral blood of patients with advanced prostate cancer. *BJU Int*, **92**, 1009.
- Ozturk, O.G., Gun, F.D. & Polat, G. (2011) Killer cell immunoglobulin-like receptor genes in patients with breast cancer. *Med Oncol*.
- Pan, N., Jiang, W., Sun, H., Miao, F., Qiu, J., Jin, H., *et al.* (2011) KIR and HLA loci are associated with hepatocellular carcinoma development in patients with Hepatitis B Virus Infection: A Case-Control Study. *PLoS One*, **6**, 25682.
- Parham, P. (2005) Influence of KIR diversity on human immunity. *Adv Exp Med Biol*, **560**, 47.
- Parham, P. (2004) Killer cell immunoglobulin-like receptor diversity: balancing signals in the natural killer cell response. *Immunol Lett*, **92**, 11.
- Parham, P. (2005) MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol*, **5**, 201.

- Peraldo-Neia, C., Migliardi, G., Mello-Grand, M., Montemurro, F., Segir, R., Pignochino, Y., *et al.* (2011) Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) mutation analysis, gene expression profiling and EGFR protein expression in primary prostate cancer. *BMC Cancer*, **11**, 31.
- Rajalingam, R., Hong, M., Adams, E.J., Shum, B.P., Guethlein, L.A., Parham, P. (2001) Short KIR haplotypes in pygmy chimpanzee (Bonobo) resemble the conserved framework of diverse human KIR haplotypes. *J Exp Med*, **193**, 135.
- Struwingn, J.P., Hartge, P., Wacholder, S., Baker, S.M., Berlin, M., McAdams, M. *et al.* (1997) The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med*, **336**, 1401.
- Stern, M., Opelz, G., Döhler, B., Hess, C. (2010) Natural killer-cell receptor polymorphisms and post transplantation non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, **115**, 3960.
- Souden, Y., Mahdouani, M., Chaieb, K., Elkamel, R., Mahdouani, K. (2011) CYP17 gene polymorphism and prostate cancer susceptibility in a Tunisian population. *Cancer Epidemiol. Cancer Epidemiol*, **35**, 480.
- Tarle, M., Kraljić, I., Kastelan, M. (1993) Comparison between NK cell activity and prostate cancer stage and grade in untreated patients: correlation with tumor markers and hormonal serotest data. *Urol Res*, **21**, 17.
- Taylor, J.A., Hirvonen, A., Watson, M., Pittman, G., Mohier, J.L., Bell, D.A. (1996) Association of prostate cancer with vitamin D receptor gene polymorphism. *Cancer Research*, **56**, 4108.
- Wilson, M.J., Torkar, M., Haude, A., Milne, S., Jones, T., Sheer, D., *et al.* (2000) Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 4778.
- Winter, C.C., Long, E.O. (1997) 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**, 4026.
- Yawata, M., Yawata, N., Draghi, M., Partheniou, F., Little, A.M., Parham P. (2008) MHC class I-specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse human NK cell repertoires toward a balance of missing self-response. *Blood*, **112**, 2369.

Zheng, S.L., Sun, J., Wiklund, F., Smith, S., Stattin, P., Li, G., *et al.* (2008) Cumulative association of five genetic variants with prostate cancer. *N Engl J Med*, **358**, 910.

Tables

Table 1. KIR gene frequencies (%) in Controls (n=185) and Prostate Cancer (200).

KIR gene	Controls		Patients		P-value*
	N	%	N	%	
2DL1	176	95.1	196	98.0	NS
2DL2	105	56.8	100	50.0	NS
2DL3	165	89.2	181	90.5	NS
2DL4	185	100.0	200	100.0	NS
2DL5	102	55.1	106	53.0	NS
3DL1	174	94.1	190	95.0	NS
3DL2	185	100.0	200	100.0	NS
3DL3	185	100.0	200	100.0	NS
2DS1	81	43.8	102	51.0	NS
2DS2	90	48.6	116	58.0	NS
2DS3	51	27.6	62	31.0	NS
2DS4	174	94.1	185	92.5	NS
2DP1	177	95.7	198	99.0	NS
2DS5	68	36.8	72	36.2	NS
3DS1	73	39.5	80	40.0	NS

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

Table 2. Frequencies of KIR ligands in Controls (n=185) and Prostate Cancer (200).

KIR gene	Controls		Patients		P-value*
	N	%	N	%	
A3	40	21.6	38	19.1	NS
A11	10	5.4	22	11.1	NS
Bw4	103	55.7	105	52.8	NS
C1	151	81.6	166	83.0	NS
C2	132	71.4	142	72.4	NS
C1/C1	53	28.6	54	27.1	NS
C2/C2	34	18.4	34	17.1	NS
C1/C2	98	53.0	111	55.8	NS

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

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

Table 3 . Inhibitory KIR genes frequencies in the presence and absence of their ligands in controls (185) and Prostate Cancer (200).

	Controls		Patients		P-value*
	n	(%)	n	(%)	
2DL1+ C2+	124	(67.0)	141	(70.9)	NS
2DL1+ C2-	52	(28.1)	54	(27.1)	NS
2DL1+ C2/C2	31	(16.8)	33	(16.6)	NS
2DL2+ C1+	84	(45.4)	82	(41.0)	NS
2DL2+ C1-	21	(11.4)	18	(9.0)	NS
2DL2+ C1/C1	30	(16.2)	31	(15.6)	NS
2DL3+ C1+	139	(75.1)	152	(76.0)	NS
2DL3+ C1-	26	(14.1)	29	(14.6)	NS
2DL3+ C1/C1	48	(25.9)	51	(25.6)	NS
3DL1+ Bw4+	97	(52.4)	100	(50.3)	NS
3DL1+ Bw4-	77	(41.6)	89	(44.7)	NS

*Chi-Square Test with continuity correction, NS = Not Significant

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

Table 4. Activatory KIR genes frequencies in the presence and absence of their ligands in controls (185) and Prostate Cancer (200).

	Controls		Patients		P-value*
	n	(%)	n	(%)	
2DS2+ C1+	70	(37.8)	96	(48.2)	NS
2DS2+ C1-	20	(10.8)	20	(10.1)	NS
2DS2+ C1/C1	24	(13.0)	32	(16.1)	NS
2DS1+ C2+	60	(32.4)	75	(37.5)	NS
2DS1+ C2-	21	(11.4)	26	(13.1)	NS
2DS1+ C2/C2	16	(8.6)	20	(10.1)	NS
3DS1+ Bw4+	45	(24.3)	42	(21.1)	NS
3DS1+ Bw4-	28	(15.1)	38	(19.1)	NS

*Chi-Square Test with continuity correction, NS = Not Significant

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

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O câncer de próstata está entre os tumores mais diagnosticados em homens, sendo que sua causa ainda não é bem compreendida. Acredita-se que história familiar, agentes ambientais, alterações hormonais, idade e raça são consideradas fatores de risco para doença.

As células natural killer (NK) possuem habilidade de matar tumores ou células infectadas e tem sido alvo de estudos sobre o possível papel dessas células no crescimento tumoral. As evidências destes estudos sugerem que as células NK estão mais ativadas quando há presença de células tumorais na circulação. Existem estudos correlacionando o polimorfismo dos genes KIR com o câncer.

A atividade da célula NK na doença tem um importante papel na interação com as células T, além de fazer parte da regulação da imunidade inata. O resultado final desta interação é a ativação da citotoxicidade com liberação de perforinas, produção de INF γ e proliferação das células NK.

O objetivo desse estudo foi avaliar a associação entre os genes KIR e HLA em pacientes com câncer de próstata e grupo controle. Genotipamos 200 pacientes com diagnóstico de câncer de próstata e 185 pacientes saudáveis para os genes KIR e HLA classe I por PCR-SSP.

Quando comparados os grupos, não foram encontradas diferenças significativas para HLA-C do grupo 1 e do grupo 2, HLA-Bw4, HLA-A3 e A11. Nenhuma diferença foi observada na

frequência dos genes KIR nos pacientes com câncer de próstata e nos controles. Estes resultados sugerem que não há potencial papel para o sistema dos genes KIR no câncer de próstata.

APÊNDICE

A – Protocolo de Pesquisa

Projeto: Estudo de polimorfismos dos genes KIR e HLA em pacientes com Câncer de Próstata.

Câncer de Próstata Grupo Controle

Nome do paciente: _____

Número do paciente: _____ Número do prontuário: _____

Raça: _____ Idade: _____ anos

História familiar de Câncer de Próstata: Sim (grau de parentesco _____)
 Não

Nível de PSA: _____

Última biópsia: _____ Score de Gleason: _____

Observações: _____

Tipagem HLA C1: _____

Tipagem HLA C2: _____

Tipagem HLA Bw4: _____

Tipagem HLA A3, A11: _____

Tipagem KIR: _____

B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Pacientes

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO CASOS

PROJETO: Estudo de polimorfismos dos genes KIR e HLA em pacientes com Câncer de Próstata.

NOME:

FONE:

NÚMERO DO PRONTUÁRIO:

DATA:

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA E OBJETIVO:

O Câncer de Próstata é uma doença que surge a partir de uma multiplicação descontrolada das células da próstata, sendo ainda de causa desconhecida. Atualmente é o tumor mais comum entre homens acima de 50 anos de idade.

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

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

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

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

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

BENEFÍCIOS: Colaborar para o avanço e progresso do conhecimento genético sobre o Câncer de Próstata.

COMPREENSÃO E AUTORIZAÇÃO

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

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

Nome Legível

Assinatura

Pesquisador responsável: Dr Gilberto Schwartzmann

Pesquisadora executora: Pâmela Portela da Silva

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

Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Rua Ramiro Barcelos 2350-

Serviço de Imunologia - 2º andar

C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Controles

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO CONTROLES

PROJETO: Estudo de polimorfismos dos genes KIR e HLA em pacientes com Câncer de Próstata.

NOME:

FONE:

NÚMERO DO PRONTUÁRIO:

DATA:

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA E OBJETIVO:

O Câncer de Próstata é uma doença que surge a partir de uma multiplicação descontrolada das células da próstata, sendo ainda de causa desconhecida. Atualmente é o tumor mais comum entre homens acima de 50 anos de idade.

O objetivo desse estudo é investigar as origens genéticas dessa doença e porque ela acontece em pacientes com Câncer de Próstata. Os resultados serão comparados com um grupo de pessoas saudáveis. Você estará participando do grupo de indivíduos que não tenham Câncer de Próstata.

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

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

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

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

BENEFÍCIOS: Colaborar para o avanço e progresso do conhecimento genético sobre o Câncer de Próstata.

COMPREENSÃO E AUTORIZAÇÃO

Eu, _____ pelo presente termo de compromisso, autorizo o uso de minha amostra de sangue para análise dos genes KIR e HLA, comparando-os com pacientes com Câncer de Próstata. O termo que li, esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu atendimento e tratamento.

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

Nome Legível

Assinatura

Pesquisador responsável: Dr Gilberto Schwartsmann

Pesquisadora executora: Pâmela Portela da Silva

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

Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Rua Ramiro Barcelos 2350-

Serviço de Imunologia - 2º andar.

ANEXOS

Anexo I – Carta de aprovação do Comitê de Ética do HCPA



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

Projeto: 09-277

Versão do Projeto: 28/07/2009

Versão do TCLE: 31/07/2009

Pesquisadores:

GILBERTO SCHWARTSMANN

MARIANA DE SAMPAIO LEITE JOBIM WILSON

LUIZ FERNANDO JOB JOBIM

PAMELA PORTELA DA SILVA

RAFAEL ROESLER

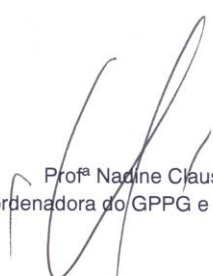
WALTER JOSE KOFF

Título: ESTUDO DE POLIMORFISMOS DOS GENES KIR E HLA EM PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA

- Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA. Somente poderão ser utilizados os Termos de Consentimento onde conste a aprovação do GPPG/HCPA.

- De acordo com a regulamentação da Resolução 340/2004 do CNS/MS o CEP/HCPA foi credenciado, através da Carta Circular Nº 037 CONEP/CNS/MS de 11 de agosto de 2004, para dar aprovação final para este projeto.

Porto Alegre, 03 de agosto de 2009.


Profª Nadine Clausell
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA