

MINISTÉRIO DA SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER

**O PAPEL DOS POLIMORFISMOS DO PROMOTOR PROXIMAL DO GENE DA
INTERLEUCINA-10 NA SUSCEPTIBILIDADE E RESPOSTA TERAPÊUTICA DO
LINFOMA DE BURKITT PEDIÁTRICO EM UMA REGIÃO DE ASSOCIAÇÃO
INTERMEDIÁRIA COM O VÍRUS EPSTEIN-BARR**

CAROLINA FONSECA MINNICELLI

2009

Carolina Fonseca Minnicelli

O papel dos polimorfismos do promotor proximal do gene da interleucina-10 na susceptibilidade e resposta terapêutica do linfoma de Burkitt pediátrico em uma região de associação intermediária com o vírus Epstein-Barr.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia, Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Oncologia.

Orientadora: Cláudia Esther Alicia Rocio Hassan

Rio de Janeiro, 2009.

FICHA CATALOGRÁFICA

M663p Minnicelli, Carolina Fonseca.

O papel dos polimorfismos do promotor proximal de gene da interleucina-10 na susceptibilidade e resposta terapêutica do linfoma de Burkitt pediátrico em uma região de associação intermediária com o vírus Epstein-Barr. / Carolina Fonseca Minnicelli. - Rio de Janeiro: INCA, 2009.

149 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Câncer. Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Oncologia do Instituto Nacional de Câncer (INCA-RJ), 2009. Orientador: Cláudia Esther Alicia Rocio Hassan.

1. Linfoma de Burkitt. 2. Interleucina-10. 3. Polimorfismo Genético. 4. Herpesvirus Humano 4. I. Hassan, Cláudia Esther Alicia Rocio. II. Título.

CDD 616.99419042

FOLHA DE APROVAÇÃO

Carolina Fonseca Minicelli

O papel dos polimorfismos do promotor proximal do gene da interleucina-10 na susceptibilidade e resposta terapêutica do linfoma de Burkitt pediátrico em uma região de associação intermediária com o vírus Epstein-Barr.

Aprovada em:

Prof. (Presidente)

Prof.

Prof.

Prof.

Prof.

Rio de Janeiro, 2009.

À minha família.

“Estranha é a nossa situação aqui na Terra. Cada um de nós vem para uma curta passagem, sem saber por quê, ainda que algumas vezes tentando adivinhar um propósito. Do ponto de vista da vida cotidiana, porém, de uma coisa sabemos: o homem está aqui pelo bem dos outros homens – acima de tudo daqueles de cujos sorrisos e bem-estar nossa própria felicidade depende.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela beleza da vida.

Agradeço a minha orientadora e amiga, Rocio Hassan, a quem eu serei eternamente grata pela paciência e confiança depositadas em mim, por compartilhar o conhecimento e me guiar intensamente no desenvolvimento de um tema tão envolvente como esse.

À chefe do laboratório Ilana Zalcborg por abrir as portas do laboratório de maneira tão acolhedora.

À coordenação do programa de pós-graduação do INCA.

Ao querido amigo e companheiro de equipe Mário com quem eu pude contar nos momentos mais difíceis e alegres desse período.

À toda equipe, Valéria, Tarssyo, Yuri e Luciana, sem a qual a realização deste trabalho não seria possível.

Aos queridos amigos e companheiros de trabalho: Elsa, Fernanda, Fernandinha, Gisele, Laíde, Lauana, Lyanna, Marina, Priscilla, Telma, Vanessa, Victor, e Virgínia.

À alegre Deisy que me apoiou no início de tudo.

Ao Gustavo pela revisão da tese e por sua tranquilidade transmitida naturalmente a todos os integrantes do laboratório.

À Lílian que me auxiliou de forma tão eficiente nas primeiras análises do MegaBace.

À Dra. Claudete Klumb pela ajuda com os dados de tratamento dos pacientes.

À Prof. Tereza Cartaxo por todo o apoio no início dessa jornada.

Aos queridos amigos de Recife: Gabriela, Mirella e Moacyr pelo carinho.

Agradeço muito à minha querida família, meus pais, João Edison e Maria Izabel, pelo incentivo depositado em mim para que esse mestrado fosse realizado, minha irmã,

Isadora, por seu companheirismo nas horas de alegria e aflição e meu noivo, Maurício, pelo carinho e compreensão da minha ausência durante a realização deste trabalho.

Ao meu lindo cãozinho, Mel, que me confortou, mesmo sem saber, por muitas vezes, transmitindo paz e tranquilidade.

Ao querido amigo Frederico por sua alegria e amizade incondicional.

Aos meus tios e primos pelo carinho e pela força que sempre me deram.

À uma família muito especial sem a qual a vinda para o Rio de Janeiro seria muito mais difícil: Marlene, Matos, Valéria, Mônica e Eduardo. Obrigada pelo carinho, amizade e apoio.

Por último, mas não menos importante, agradeço aos pais dos pacientes pediátricos que mantêm a esperança de que a ciência possa melhorar a vida de seus pequenos. Espero não desapontá-los nunca. Obrigada pela confiança.

RESUMO

A citocina imunoregulatória interleucina-10 (IL-10) exerce função proliferativa em células B. Variações no promotor do gene da IL-10 regulam a expressão da proteína e a infecção com o vírus Epstein-Barr (EBV). Este trabalho objetivou investigar a associação dos polimorfismos da IL-10 com a susceptibilidade e resposta clínica no linfoma de Burkitt pediátrico (LB), de acordo com o status do EBV. Foi realizado um estudo caso-controle, incluindo 62 crianças com LB (2-16a) e 230 doadores saudáveis como grupo controle. O EBV foi detectado por EBER-ISH. Os SNPs -1082A/G e -592A/C foram genotipados por PCR alelo específica (AS-PCR) e os haplótipos proximais por três AS-PCR cruzadas por caso. Iniciadores fluorescentes discriminaram alelos dos microssatélites IL10.G e IL10.R. A estatística incluiu testes não paramétricos para comparações caso-controle; regressão logística para cálculo de “odds ratios” (OR) com intervalos de confiança de 95% (IC 95%); e o método de Kaplan-Meier e comparações Log-rank para análise de sobrevida. As frequências dos genótipos AA, AG e GG, do SNP -1082A/G, foram de 34,4%; 41%; 24,6% para pacientes e 46,5%; 43,9%; 9,6% para controles (Teste de Fisher, $p=0,0017$) com aumento do risco de desenvolvimento de LB na presença do genótipo GG (modelo recessivo) (OR 3,08; IC95% 1,49-6,4). As frequências de CC, CA e AA, no SNP -592C/T, foram de 56,7%; 36,7%; 6,7% para pacientes e 42,9%; 44,7%; 12,4% para controles (Teste de Cochran-Armitage, $p=0,045$; OR=1,59; IC95% 1,01-2,51). A frequência da combinação GCC/GCC mostrou diferenças nos pacientes vs. controles (25,4% vs. 10,1%; OR 3,02, IC95% 1,45-6,29, $p=0,004$). Não houve diferenças quanto às frequências genotípicas dos polimorfismos de IL-10 entre os grupos EBV+ ($n=33$, 54,1%) e EBV- ($n=28$, 45,9%). Foi observada uma estratificação etária no grupo de pacientes, com predominância do EBV no grupo <10 anos (HR 0,038; IC95% 0,005–0,3; $p=0,017$) e do genótipo -1082GG no grupo >10 anos (HR 25,9; IC95% 3,13–214,5; $p=0,03$). Análise de sobrevida de 39 pacientes tratados uniformemente revelou que a presença do EBV foi associada a um desfecho favorável na sobrevida global (SG) (95,7% vs. 66,7%, $p=0,017$), e livre de doença (SLD) (91,3% vs. 60%, $p=0,021$). Já a presença da família IL10.01 (R3-GCC) foi associada a pior SG (50% vs. 91,7%, $p=0,005$) e SLD (50% vs. 83,3%, $p=0,042$). Tanto EBV quanto IL10.01 refletiram a SLD dos pacientes no grupo de risco avançado (GR3) (92,9% vs. 69,6%, $p=0,097$). A presença do alelo G12 também modificou a SLD dos pacientes no GR3 (33,3% vs. 81,3%, $p=0,034$). Um modelo de resposta terapêutica proposto a partir das variáveis independentes (EBV e IL10.01) para a SLD mostrou que pacientes EBV+/IL10.01- apresentaram 92,9% de SLD, comparados aos pacientes EBV-/IL10.01+, 25% ($p=0,017$). Em conclusão, variantes genéticas de IL-10 foram associadas ao risco desenvolvimento do LB com efeito de dose do haplótipo GCC. A estruturação etária indicou a existência de interações patogênicas idade-dependentes e fatores associados ao controle genético da infecção pelo EBV. A resposta clínica dos pacientes mostrou que fatores ambientais e genéticos estão envolvidos no tratamento do LB, levantando questões importantes quanto ao desenvolvimento de novas oportunidades terapêuticas.

Palavras-Chaves: 1. Linfoma de Burkitt. 2. Interleucina-10. 3. Polimorfismo Genético. 4. Herpesvirus Humano 4.

ABSTRACT

The immunoregulatory cytokine Interleukin-10 (IL-10) exerts B cell proliferation functions. Genetic variations in the IL-10 gene promoter regulate the protein expression and Epstein-Barr virus (EBV) infection. We aimed to investigate whether IL-10 polymorphisms are associated to susceptibility and clinical outcome in pediatric Burkitt lymphoma (BL), according to EBV status. A case-control study including 62 children (2-16 y) with BL and a control group of 230 healthy donors was performed. EBV was detected by EBER-ISH. SNPs -1082A/G and -592C/T were genotyped by allele-specific (AS)-PCRs and the proximal haplotypes by three crossing PCRs by case. Fluorescent primers discriminated alleles of microsatellite IL10.G and IL10.R. The statistic included non-parametric tests for case-control analyses; logistic regression for the odds ratio (OR) with 95% confidence intervals (95% CI); and the Kaplan-Meier method and Log-Rank comparisons for survival analysis. Genotypes frequencies of AA, AG e GG of SNP -1082A/G were 34.4%; 41%; 24.6% for patients and 46.5%; 43.9%; 9.6% for controls (Fisher Test, $p=0.0017$) with a higher risk of BL development in the presence of GG genotype (recessive model) (OR 3.08; IC95% 1.49-6.4). The frequencies of CC, CA and AA genotypes of SNP -592C/T were 56.7%; 36.7%; 6.7% for patients and 42.9%; 44.7%; 12.4% for controls (Cochran-Armitage Test, $p=0.045$; OR=1.59; IC95% 1.01-2.51). The frequency of the haplotype combination GCC/GCC showed differences in patients vs. controls (25.4% vs. 10.1%; OR 3.02, IC95% 1.45-6.29, $p=0.004$). Differences were not detected by comparing the genotype frequencies between EBV+ (n=33, 54.1%) and EBV- (n=28, 45.9%) groups. Age stratification was observed in the group of patients, in which EBV predominated in the age group <10y. (HR 0.038; IC95% 0.005-0.3; $p=0.017$) and -1082GG genotype predominated in the age group >10y. (HR 25.9; IC95% 3.13-214.5; $p=0.03$). Survival analysis of 39 patients uniformly treated showed that presence of EBV was associated to a better overall survival (OS) (95.7% vs. 66.7%, $p=0.017$), and disease free survival (DFS) (91.3% vs. 60%, $p=0.021$). Yet, the presence of IL10.01 family (R3-GCC) was associated to poor OS (50% vs. 91.7%, $p=0.005$) and DFS (50% vs. 83.3%, $p=0.042$). EBV and IL10.01 both reflected DFS of patients in the higher risk group (GR3) (92.9% vs. 69.6%, $p=0.097$). The presence of G12 allele also modified patients DFS at GR3 (33.3% vs. 81.3%, $p=0.034$). A therapeutic response model based on independent variables at DFS (EBV and IL10.01) showed that patients EBV+/IL10.01- presented 92.9% DFS, compared to patients EBV-/IL10.01+, 25% ($p=0.017$). In conclusion, IL-10 genetic variants were associated to higher BL risk development with a dose effect of GCC haplotype. The age structure of the BL group indicated the existence of age-dependent pathogenic interactions and features associated to genetic control of EBV infection. The clinical response of patients showed that environmental and genetic factors are involved in BL treatment, raising important questions in the development of new therapeutic opportunities.

Key-words: 1. Burkitt lymphoma. 2. Interleukin-10. 3. Genetic Polymorphisms. 4. Human Herpesvirus 4.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 2.1 Morfologia do linfoma de Burkitt	23
Figura 2.2 Representação esquemática da produção de IL-10 por células tumorais e seus efeitos em células do sistema imune e na resposta inflamatória	33
Figura 2.3 IL-10 e câncer	34
Figura 2.4 O papel da epidemiologia e da pesquisa básica nos estudos de associação genética	40
Figura 4.1 Haplotipagem experimental	55
Figura 4.2 Esquema da estratégia utilizada para genotipagem do SNP IL10 -1082 pela técnica de AS-PCR e os alelos do microssatélite IL10.G por STR-fluorescente	57
Figura 5.1 Detecção dos haplótipos de IL-10 em homo e heterozigose, por AS-PCRs cruzadas	68
Figura 5.2 Detecção dos alelos do microssatélite IL10.R. Electroferograma obtido com o programa Genetic Profiler, em um seqüenciador automático MegaBace 1000	70
Figura 5.3 Freqüências alélicas IL10.R/IL10.G nos controles	73
Figura 5.4 Freqüências dos alelos de IL10.G ligados aos alelos do SNP -1082	74
Figura 5.5 Detecção do EBV na célula tumoral de Burkitt por hibridização in situ para os RNAs virais	75
Figura 5.6 Associação do EBV com classes de idade no linfoma de Burkitt....	76
Figura 5.7 Análise da contribuição de efeitos aditivos ao risco conferido pelos SNPs proximais de IL10. Gráfico do teste de Cochran-Amitage. (A) SNP -1082 e (B) SNP -592	79
Figura 5.8 Comparação das freqüências de GCC/GCC em casos e controles ..	80
Figura 5.9 Freqüências genotípicas de -1082 dos linfomas de Burkitt EBV+ e EBV- comparados aos controles	84
Figura 5.10 Freqüências genotípicas de -1082 de acordo com idade no Linfoma de Burkitt	85

Figura 5.11	Análise da estruturação etária dos LB em relação ao EBV e polimorfismos de IL-10 e idade	87
Figura 5.12	Distribuição das frequências dos casos com LB com relação ao status do EBV e a presença do genótipo GCC/GCC, por grupos de idade	88
Figura 5.13	Curvas de SG e SLD dos pacientes com LB	91
Figura 5.14	Curvas de sobrevida dos pacientes com LB de acordo a presença dos polimorfismos de IL-10	93
Figura 5.15	Análise conjunta da presença do EBV e da família IL10.01 como fator prognóstico de recaída nos pacientes com LB	95
Figura 6.1	Interação entre fatores genéticos e ambientais no LB pediátrico ...	107

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 2.1 Grupos de risco (GR) para ajuste do tratamento no protocolo Berlim-Frankfurt-Münster	31
Tabela 2.2 Freqüências das famílias de IL-10 e combinações raras encontradas na população Européia (Eskdale et al, 1999)	38
Tabela 4.1 Combinação dos alelos do STR IL10.R e haplótipos proximais em famílias	58
Tabela 5.1 Características do grupo controle	67
Tabela 5.2 Freqüências genóticas e alélicas dos SNPs -1082 e -592 dos controles	67
Tabela 5.3 Freqüências haplotípicas do grupo controle	69
Tabela 5.4 Freqüências alélicas do microsatélite IL10.G nos controles	70
Tabela 5.5 Freqüências alélicas e genóticas do microsatélite IL10.R nos controles	71
Tabela 5.6 Freqüências de IL10.R/IL10.G observadas no grupo controle	72
Tabela 5.7 Caracterização dos pacientes com LB	75
Tabela 5.8 Comparação das freqüências alélicas e genóticas dos SNPs -1082 e -592 entre pacientes com LB e controles	78
Tabela 5.9 Comparação das freqüências de haplótipos proximais de IL-10 e suas combinações entre pacientes com LB e controles	80
Tabela 5.10 Comparação das freqüências alélicas do microsatélite IL10.G.....	81
Tabela 5.11 Comparação das freqüências alélicas e genóticas do microsatélite IL10.R	82
Tabela 5.12 Comparação das freqüências das famílias de IL-10 em casos e controles	83
Tabela 5.13 Comparação das freqüências genóticas de -1082 A/G entre linfomas de Burkitt EBV+ e EBV- e controles	84
Tabela 5.14 Freqüências haplotípicas em relação aos grupos de idade	86
Tabela 5.15 Análise multivariada dos fatores influenciando a estrutura etária do LB	88
Tabela 5.16 Análise de sobrevida nos pacientes com LB	90
Tabela 5.17 Análise multivariada de fatores prognósticos para recaída no LB, ajustada por grupo de risco	94

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µl	Microlitro
µm	Micrômetro
APC	Células Apresentadoras de Antígeno
AS-PCR	PCR- Alelo específica
BAX	BCL2-associated X protein
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
BCL6	B-cell CLL/lymphoma 6
BCR	Receptor de Células B (do inglês, <i>B-cell receptor</i>)
Bisacrilamida	N,N'-metileno bis-acrilamida
BSA	Albumina Sérica Bovina
CD	Células Dendríticas
CEMO	Centro de Transplante de Medula Óssea
CG	Centro Germinativo
CMN	Células Mononucleares
DAB	Di-amino-benzidina
DIPAT	Departamento Integrado de Anatomia Patológica
DL	Desequilíbrio de Ligação
DMF	sal de toluidina 5-bromo-4-cloro-3-indofil-fosfato
DMSO	Di-metil-sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EBER	RNA viral do Epstein-Barr (do inglês, <i>Epstein-Barr encoded RNA</i>)
EBNA	Antígeno Nuclear Viral do Epstein-Barr (do inglês, <i>Epstein-Barr Viral Nuclear Antigen</i>)
EBV	Vírus Epstein-Barr (do inglês, <i>Epstein-Barr Virus</i>)
EC	Estadiamento Clínico
EDTA	Acido Etileno-diamino-tetra-acético
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
FAB	French-American-British
FIP	Fixado e Impregnado em Parafina
GR	Grupo de Risco
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana

HLA	Antígeno de Leucócito Humano
IARC	Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (do inglês, <i>International Agency for Research on Cancer</i>)
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IgH	Gene da cadeia pesada da Imunoglobulina
IL-10	Interleucina-10
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IRF	Fator Regulatório do Interferon (do inglês, <i>Interferon regulatory factor</i>)
ISH	Hibridização <i>in situ</i>
LB	Linfoma de Burkitt
LBe	Linfoma de Burkitt endêmico
LBs	Linfoma de Burkitt esporádico
LDH	Lactato-deshidrogenase
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LMP	Proteína Latente de Membrana (do inglês, <i>Latent Membrane Protein</i>)
LNH	Linfomas Não Hodgkin
MO	Medula Óssea
NBT	azul de nitro tetrazolio
NK	Natural Killer
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	Odds Ratio
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, <i>Polymerase chain reaction</i>)
RCBL	Tampão de Lise de Células Vermelhas (do inglês, <i>Red cell buffer lysis</i>)
RNA	Ácido Ribonucléico
SCUP	Sangue de Cordão Umbilical e Placentário
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio ou Lauril sulfato
SG	Sobrevida Global
SIDA	Síndrome da Imnodeficiência Humana

SLD	Sobrevida Livre de Doença
SNP	Polimorfismos de Base Única
SP	Sangue Periférico
STR	Curtas Repetições em Tandem
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TBS	Tampão Tris Salino
TdT	Transferase Desoxirribonucleotídica Terminal
TEMED	N,N,N',N'-tetra-metileno-diamina
TGF	Fator de Crescimento Tumoral (do inglês, <i>transforming growth factor</i>)
Th	Células T Helper
TNF	Fator de Necrose Tumoral (do inglês, <i>Tumor necrosis factor</i>)
vIL-10	IL-10 viral

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Características biológicas e clínicas do linfoma de Burkitt	21
2.1.1 Classificação do LB	23
2.1.2 Patogênese do LB	23
2.1.2.1 Fatores genéticos	24
2.1.2.2 Microambiente tumoral	25
2.1.2.3 O papel do EBV na etiologia tumoral do LB	26
2.1.3 Estadiamento, tratamento e desfecho clínico do LB	29
2.2 Interleucina-10: evidências de um envolvimento na tumorigênese	32
2.2.1 Interações Biológicas entre o EBV e a IL-10	34
2.2.2 Polimorfismos da IL-10	35
2.2.3 Controle da expressão gênica por polimorfismos no gene da IL-10	38
2.3 Estudos de associação genética	39
2.3.1 Uma preocupação quanto aos métodos estatísticos utilizados	41
3. OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo Geral	43
3.2 Objetivos Específicos	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 Considerações sobre o desenho de estudo	44
4.2 Pacientes	44
4.3 Obtenção de dados clínicos	45
4.4 Controles	45
4.5 Amostras biológicas	46
4.5.1 Separação das células mononucleares (CMN) por centrifugação em gradiente de densidade	46

4.5.2	Obtenção de células totais por lise celular	46
4.5.3	Processamento de biópsias cirúrgicas	47
4.6	Métodos de extração de DNA	47
4.6.1	Extração de DNA de alto peso molecular das suspensões celulares	47
4.6.2	Isolamento de DNA de alto peso molecular a partir de tecido a fresco	47
4.6.2.1	Digestão com proteinase K	47
4.6.2.2	Extração orgânica com fenol-clorofórmio	48
4.6.3	Extração de DNA a partir de tecidos FIP	48
4.7	Avaliação qualitativa e quantitativa do DNA	49
4.8	Avaliação da amplificabilidade do DNA através de PCR para genes constitutivos	50
4.9	Detecção e tipificação do genoma do vírus Epstein-Barr (EBV) ..	50
4.9.1	Método de hibridização in situ para EBERs (EBER-ISH)	50
4.9.2	Tipificação do EBV por PCR para o gene EBNA2	51
4.9.3	Tipificação do EBV por PCR para o gene EBNA3C	52
4.10	Caracterização dos polimorfismos do promotor do gene da interleucina-10 (IL-10)	52
4.10.1	Estratégia de genotipagem	52
4.10.2	Genotipagem dos SNPs -1082 A/G e -592A/C	53
4.10.3	Haplotipagem experimental	54
4.10.4	Genotipagem dos microssatélites IL10.G e IL10.R	55
4.10.5	Detecção das famílias de IL-10	58
4.11	Confirmação da genotipagem no promotor do gene da IL-10	58
4.12	Eletroforese e avaliação dos produtos de PCR	60
4.12.1	Preparação de géis de agarose	60
4.12.2	Preparação e coloração de géis de poliacrilamida	60
4.12.3	Eletroforese	61
4.12.4	Avaliação de ampliações de microssatélites com iniciadores fluorescentes	61
4.13	Análises estatísticas	62
4.13.1	Estudo caso-controle	62
4.13.2	Análise do desequilíbrio de ligação	63

4.13.3	Estudo de série de casos	64
4.13.4	Análise de sobrevivência	64
5.	RESULTADOS	66
5.1	Apresentação dos resultados dos polimorfismos da IL-10	66
5.2	Caracterização do grupo controle	66
5.3	Análise dos polimorfismos de IL-10 no grupo controle	67
5.3.1	Frequências alélicas e genotípicas dos SNPs do grupo controle ...	67
5.3.2	Análise dos haplótipos proximais do promotor de IL-10 no grupo controle	68
5.3.3	Análise dos microssatélites IL10.R e IL10.G nos controles	69
5.3.4	Análise de ligação entre os alelos dos microssatélites IL10.R/IL10.G no grupo controle	71
5.3.5	Desequilíbrio de ligação entre IL10.G e -1082 nos controles	73
5.4	Estudos de associação entre polimorfismos do promotor de IL-10 e o linfoma de Burkitt	74
5.4.1	Caracterização dos pacientes estudados	74
5.4.2	Deteção e tipificação do vírus Epstein-Barr	75
5.4.3	Estudo de caso-controle	76
5.4.3.1	Frequências alélicas e genotípicas dos SNPs -1082, -819 e -592 ..	76
5.4.3.2	Análise dos haplótipos proximais do promotor de IL10	79
5.4.3.3	Análise dos microssatélites IL10.G e IL10.R	81
5.4.3.4	Análise das famílias de IL-10	82
5.4.4	Estudo de série de casos: Análise dos polimorfismos de IL-10 em relação às características clínico-epidemiológicas dos pacientes com LB	83
5.4.4.1	Polimorfismos de IL-10 e EBV	83
5.4.4.2	Polimorfismos de IL-10 e estrutura etária do LB	85
5.4.4.3	Avaliação da resposta terapêutica nos pacientes com LB	89
5.4.4.4	Proposta de um modelo genético-ambiental no prognóstico do LB pediátrico	93
6	DISCUSSÃO	96

7	CONCLUSÕES	117
8	REFERÊNCIAS	120
9	ANEXOS	134

1. INTRODUÇÃO

O Linfoma de Burkitt (LB) é um linfoma não Hodgkin (LNH) agressivo de células B maduras que acomete principalmente crianças (Magrath et al, 1992). Os fatores implicados na gênese do LB incluem mecanismos de base genética e a participação de agentes infecciosos (Magrath et al, 1992; Hsu et al, 2000). A associação do vírus Epstein-Barr (EBV) com o LB foi determinada em diversas regiões geográficas, demonstrando relação com a idade de soroconversão (Crawford et al, 2006). No sudeste brasileiro, o EBV está associado a aproximadamente 60% dos casos de LB (Hassan et al, 2008; Queiroga et al, 2008; Pizza et al, 2008), chegando a 80% na região nordeste do país (Araújo et al, 1996).

As interações dos fatores de crescimento celular e inibidores de apoptose estimulam as células do LB a proliferarem exacerbadamente, sendo este o câncer pediátrico com as maiores taxas proliferativas (Kearns, Smith, and Pitcock, 1986). Dentre os principais estimuladores de células B encontra-se a interleucina-10 (IL-10) (Rousset et al, 1992) que, ao mesmo tempo, atua como uma citocina antiinflamatória, com função supressora da resposta imune (Moore, 2001). No LB, o EBV é capaz de induzir a produção de IL-10, através de seus RNAs virais (Kitawaga et al, 2000).

Foi determinado que variações genéticas no promotor da IL-10 exercem um controle rígido na produção da proteína e têm um papel na resposta imune à infecção primária pelo EBV. Dentre os diversos polimorfismos de base simples (*single nucleotide polymorphisms* ou SNPs) encontrados no promotor do gene da IL-10, três (-1082A/G, -819C/T e 592C/A) assumem especial importância por sua localização próxima a fatores de transcrição e por serem herdados na forma de haplótipos ao longo das gerações (Eskdale et al, 1999). A combinação destes com microssatélites também encontrados no

promotor permitem o grupamento dos polimorfismos em famílias (Eskdale et al, 1999). As famílias encontradas no promotor do gene da IL-10, assim como os genótipos dos SNPs e alelos de microssatélites que as constituem, foram relacionados à produção diferenciada da proteína.

Neste contexto, os estudos de associação genética tornam-se importantes para a identificação de variantes de alta ou baixa expressão gênica que poderiam conferir um risco aumentado ao desenvolvimento de LB. Assim, é relevante determinar se os polimorfismos genéticos da IL-10 poderiam influenciar o comportamento do LB, tanto na interação com fatores ambientais quanto nas características clínicas da doença e resposta terapêutica dos pacientes.

A hipótese de que polimorfismos do promotor da IL-10 poderiam influenciar o risco de desenvolver a doença foi construída tomando-se como base os seguintes preceitos: i) a importância fisiológica da IL-10 em células B normais e tumorais (Rousset et al, 1992; O'Garra et al, 1990) ii) o seu papel pró-proliferativo nas células de Burkitt (Cervenak et al, 2000); iii) nas relações entre essa interleucina e o ciclo de vida do EBV (Kitagawa et al, 2000; Samanta et al; 2008), assim como nas evidências de que polimorfismos de IL-10 atuam no controle da idade de infecção por este vírus (Helminen et al, 1999; 2001); iv) na característica de que entre 50 a 75% da variação na produção de IL-10 parece ser determinada por polimorfismos no seu promotor (Westendorp et al; 1997; Reuss et al, 2002).

Até o momento, nenhum estudo foi realizado para investigar a associação entre os polimorfismos da IL-10 no desenvolvimento e evolução do LB pediátrico. O padrão de associação intermediária do EBV com o LB, na região Sudeste do Brasil, apresenta-se como um modelo ideal à investigação do papel das variantes genéticas da IL-10 em que é possível analisar casos EBV+ e EBV- originados de uma mesma região geográfica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características biológicas e clínicas do linfoma de Burkitt

O linfoma de Burkitt (LB) é um LNH agressivo de células B maduras, caracterizado por uma marcada variabilidade nas diferentes situações geográficas, em relação à idade específica de incidência, sítio de tumor primário e associação com o vírus Epstein-Barr (EBV) (Magrath et al, 1992). Essas diferenças permitem a caracterização de dois subtipos epidemiológicos, LB endêmico (LBe) e esporádico (LBs), reconhecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Além destes dois subtipos, a OMS inclui na sua classificação o LB associado à Síndrome da Imunodeficiência Humana (SIDA) (Diebold et al, 2001).

O LB foi primeiro descrito na África, em 1958, por um cirurgião britânico que trabalhava em Uganda e notou um tumor maligno bastante freqüente nas crianças, que crescia rapidamente com localização na mandíbula, com predomínio em áreas geográficas de baixa altitude, com altos índices pluviométricos e temperatura média de 16°C (Burkitt, 1962). A distribuição desta doença coincidia com a área holoendêmica da malária, e estudos posteriores confirmaram seu envolvimento na etiologia do LB (Burkitt, 1962). Esta doença, conhecida como LBe, tem grande incidência na África sub-saariana, onde contribui com mais de 36% dos cânceres infantis e 70% dos linfomas da infância (Parkin et al, 1998), sendo na quase totalidade dos casos associado ao EBV (de Thé et al, 1978; Geser et al, 1982). Usualmente afeta crianças de 4-7 anos, com uma proporção de afetados masculinos e femininos (M:F) de 2:1.

O LBs inclui os casos detectados em áreas de baixo risco (norte e leste europeu, os Estados Unidos e o Japão), afetando preferencialmente crianças de idade maior e adultos jovens. Associação com o EBV é observada em 10 a 30% dos casos (Magrath et al, 1992; Hsu et al, 2000).

A área de risco intermediário para o desenvolvimento do LB engloba o sudeste europeu, norte da África e Ásia (Stiller and Parkin, 1990). No Brasil, o LB é encontrado em uma situação epidemiológica intermediária, acometendo crianças de baixa idade. A associação com o EBV é variável (Klumb et al, 2004), com frequências de até 85% no nordeste do país (Araújo et al, 1996, Sandlund et al, 1996) e de 50% a 60% na região sudeste (Hassan et al, 2008; Queiroga et al, 2008; Pizza et al, 2008).

Independentemente da área em que o LB surge, uma característica comum é a desregulação do oncogene *MYC*, causada pela sua translocação para um dos genes das imunoglobulinas (Ig) (Hetch et al, 2000). Estas translocações envolvem a região cromossômica do gene *MYC* (8q24) e um dos *loci* de Ig nos cromossomos 14, 2, ou 22 (Leder et al, 1983; Klein and Klein, 1985). A t(8;14), envolvendo o gene da cadeia pesada de Ig (IGH) ocorre em aproximadamente 80% dos tumores, tanto endêmicos como esporádicos (Dalla-Favera et al, 1983; Magrath, 1985).

O LB possui características imunofenóticas de uma célula B madura, expressando IgM na maioria dos casos. As células do LB expressam os marcadores celulares CD19, CD20, CD22, HLA-DR, CD10, CD79a, CD38 e BCL6, sugerindo uma origem celular no centro germinativo (Diebold et al, 2001).

As células malignas caracterizam-se por uma taxa proliferativa extremamente alta, refletida pela expressão da proteína MIB (detectada pelo anticorpo Ki-67) em quase 100% das células. De fato, este critério (imunomarcção de Ki-67 >95%) é considerado imprescindível para o diagnóstico do LB na sua forma clássica (Diebold et al, 2001, Ferry, 2006).

2.1.1 Classificação do LB

Em termos clínico-patológicos, o LB frequentemente apresenta-se em sítios extranodais ou como uma leucemia aguda. A OMS reconhece como variantes do LB o linfoma de células não-clivadas em pacientes com uma massa tumoral sólida, e leucemia linfóide aguda (LLA) de tipo L3 na classificação FAB (LLA FAB-L3) em pacientes com envolvimento da medula óssea maior que 25% (Diebold et al, 2001).

Quanto aos critérios morfológicos, a maioria dos LB, principalmente os que afetam crianças, é caracterizada por linfoproliferações monomórficas de células de tamanho médio com núcleo redondo, múltiplos pequenos nucléolos e relativa abundância de citoplasma basofílico. Esta neoplasia possui alto índice mitótico e exibe uma infiltração por grande quantidade de macrófagos, cuja função é a fagocitose das células em apoptose. Isto cria um padrão morfológico de “céu estrelado” característico deste linfoma (Diebold et al, 2001) (Figura 2.1).

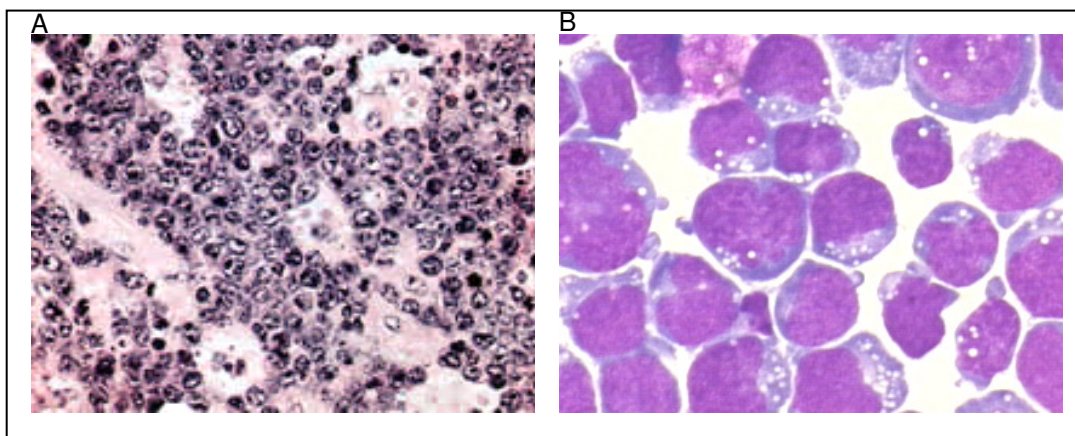


Figura 2.1: Morfologia do linfoma de Burkitt. A. Aspecto histológico da linfoproliferação com “padrão de céu estrelado”. B. Células de uma leucemia de Burkitt (FAB LLA-L3) mostrando a morfologia nuclear típica, com citoplasma basófilo e vacuolado.

2.1.2 Patogênese do LB

Apesar dos 50 anos de intensa pesquisa transcorridos desde o descobrimento do LB, os aspectos patogênicos desta doença ainda não são bem entendidos (Thorley-Lawson and

Allday, 2008). Fatores genéticos e ambientais estão envolvidos na patogênese desta doença e na definição das características biológicas das células do LB (Hetch and Aster, 2000). Os fatores relacionados com as interações celulares entre células tumorais e reacionais, no microambiente tumoral são menos conhecidos (Ogden et al, 2005). O papel de fatores do hospedeiro associados aos efeitos genéticos de susceptibilidade não tem sido investigados nesta doença.

2.1.2.1 Fatores genéticos

A desregulação de *MYC* é considerada o evento patogênico primário. A consequência da superexpressão deste oncogene é uma proliferação celular irrestrita e parada nos processos maturativos (Hetch and Aster, 2000) sendo este fenômeno responsável pelo fenótipo celular blástico e pelas características proliferativas do tumor.

Em células normais, a expressão hiper-aguda de *MYC* induz proliferação através da ativação das ciclinas D/E e repressão de p27Kip. Concomitantemente, *MYC* ativa diretamente p14ARF, levando à estabilização da proteína p53, a consequente transativação da expressão de p21cip e finalmente à parada no ciclo celular, e eventualmente apoptose. Vias intrínsecas de apoptose são também ativadas, principalmente pela ativação de membros anti-apoptóticos da família BCL2, as proteínas BAX e BIM, que são importantes antagonistas fisiológicos de BCL2, particularmente no sistema hematopoiético.

As células do LB mostram uma propensão a sofrer apoptose “espontânea”, provavelmente como consequência da disponibilidade limitada de fatores de sobrevivência no microambiente (Milner et al, 1993). Entretanto, o LB é a patologia humana com maior taxa proliferativa conhecida, portanto, a taxa de proliferação deve de

alguma maneira superar à da apoptose, indicando a existência de fatores anti-apoptóticos, tanto como de fatores de sobrevivência e crescimento.

Em estudos prévios foi relatado que 30% dos LBe e até 70% de linhagens celulares de LB portam mutações em p53, muitas delas prevenindo a apoptose e arresto do ciclo celular (Lindstrom and Wiman, 2004). No LB do Rio de Janeiro (RJ), 20% dos casos apresentaram mutações de p53 que foram relacionadas a um fenótipo mais agressivo da doença (Klumb et al, 2003).

Nos casos sem alterações da via de p53-ARF-MDM2 foi observada presença de mutações no próprio alelo translocado do gene *MYC* com conseqüente defeito na promoção da apoptose devido à falha de induzir BIM (Hemman et al, 2005). Assim, parece que, na célula do LB as alterações genéticas são selecionadas para que a célula possa se sobrepor ao alto limiar apoptótico potencialmente induzido pelo próprio *MYC* (Hemman and Lowe, 2006).

Mutações no gene da família do retinoblastoma, Rb2, foram relatadas como freqüentes no LBe em contraposição com o LBs (Cinti et al, 2000). Estes resultados não foram replicados em um estudo realizado em crianças com LB diagnosticadas no INCA, RJ (Klumb et al, 2007).

2.1.2.2 Microambiente tumoral

A característica mais marcante do microambiente tumoral é a infiltração massiva por macrófagos. Pouco é conhecido sobre a interação dos macrófagos do microambiente e as células tumorais no LB, mas evidências sugerem que estas células podem ter uma função dual na patogênese da doença: por um lado, através da capacidade de suprimir a imunidade anti-tumoral (Savill et al, 2002; Ogden et al, 2005); e por outro, através da produção de fatores de crescimento celular, que ajudam a modular a apoptose (Levens

et al, 2000; Ogden et al, 2005). Como os macrófagos respondem às concentrações locais de IL-10, foi inicialmente proposto que a IL-10 agia como inibidor da ativação, mas hoje se sabe que esta interleucina tem o efeito de gerar nos macrófagos um fenótipo de ativação “alternativa” ou polarização “M2” (Mantovani et al, 2002; Gordon, 2003). Macrófagos do microambiente tumoral são capazes de expressar IL-10 em resposta à presença de corpos apoptóticos, representando um mecanismo autócrino de inibição da via de NF- κ B e da expressão de IL-12 nestas células, com a consequência da inibição das respostas antitumorais (Sica et al, 2000).

2.1.2.3 O papel do EBV na etiologia tumoral do LB

Dentre os fatores ambientais com impacto na patogênese do LB, a infecção pelo EBV é objeto de intensa pesquisa (Kuppers, 2004; Kelly and Rickinson, 2007; Thorley-Lawson and Allday, 2008). O EBV é um Herpesvirus linfotrópico que infecta assintomaticamente aproximadamente 95% da população mundial adulta, mas sob certas condições está associado ao desenvolvimento de câncer (Rickinson and Kieff, 2001). Em 1997, o EBV foi classificado pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer da Organização Mundial da Saúde (IARC, WHO), como um agente carcinogênico humano do grupo I. O vírus é associado ao LB, a doenças linfoproliferativas pós-transplante, a alguns linfomas de células T e natural killer (NK) e ao linfoma de Hodgkin. No entanto, uma consequência importante da infecção epitelial pelo EBV é o desenvolvimento de cânceres de origem epitelial, como o carcinoma de nasofaringe.

Como todo herpesvírus, o seu ciclo de vida inclui uma fase de replicação lítica com produção de partículas virais infecciosas e uma fase latente, em que o vírus permanece no núcleo celular na forma de episossomo e replica-se em sincronia com a célula (Kieff,

2001). A orofaringe é o primeiro sítio de infecção e replicação do EBV (Sixbey et al, 1984), garantindo a produção de novas partículas virais que são transmitidas pela saliva aos novos hospedeiros (Gerber et al, 1972; Kieff, 2001).

No curso da primeira infecção, o EBV infecta células B, estabelecendo infecção latente nas células B de memória. Existem diferenças na idade da infecção primária pelo EBV, entre países com pouco desenvolvimento sócio-econômico e países afluentes (Rickinson and Kieff, 2001). Nos primeiros, a primoinfecção geralmente ocorre nos primeiros anos de vida e é assintomática. Já nos países desenvolvidos, a primeira infecção ocorre freqüentemente na adolescência ou juventude podendo, em até 30% dos casos, produzir características clínicas de mononucleose infecciosa (Henle et al, 1969).

Estudos em regiões de incidência intermediária mostram que mais de 90% das crianças são soropositivas aos 6 anos de idade (Magrath et al, 1992). Um estudo da prevalência de anticorpos anti-EBV em crianças e jovens adultos realizado no município de Vitória, ES, caracterizou uma curva de soroconversão intermediária em relação à observada em países desenvolvidos e subdesenvolvidos (Figueira-Silva and Pereira, 2004).

Na região endêmica, uma idade muito precoce de soroconversão para a infecção com o EBV foi associada a um risco aumentado de desenvolver o LB (de The et al, 1978). Soroconversão precoce foi sugerido como um fator de risco para LB no Brasil (Klumb et al, 2004; Hassan et al, 2008).

As características biológicas do EBV que fazem com que, em certas condições, sua presença esteja associada ao desenvolvimento de neoplasias linfóides vêm sendo motivo de intensas investigações. Um modelo com bastante evidência experimental propõe que, com a finalidade de garantir a persistência, o EBV explora a biologia de uma célula B normal para ganhar acesso ao compartimento de células B de memória onde pode residir sem ser detectado por mecanismos de imunovigilância (Thorley-Lawson and

Babcock, 1999). Nesse contexto, a origem dos linfomas associados ao EBV é explicada pela subversão de alguns dos pontos de checagem da célula B, por proteínas virais (Thorley-Lawson and Gross, 2004).

Na infecção de células B naive pelo EBV, o conjunto completo de proteínas latentes são expressas, incluindo seis proteínas nucleares (EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C e EBNA3L), as proteínas latentes de membrana (LMP1, LMP2A e LMP2B) e os RNAs virais não traduzidos (EBER1, EBER2 e BART). Este padrão de expressão promove a proliferação celular e é chamado de “padrão de crescimento” ou latência tipo III. Esta habilidade de direcionar a célula ao crescimento celular exacerbado está na base das propriedades oncogênicas do EBV.

Nas células B do CG infectadas pelo EBV, a expressão de somente de EBNA1, LMP1 e LMP2, além dos RNAs EBERs, é conhecido como padrão de latência II. Por sua vez, as células de memória expressam um conjunto muito restrito de proteínas (EBNA1, LMP2 e EBERs), denominado latência I.

O EBV apresenta diferentes padrões de latência, nos diferentes tipos de câncer, o que permite inferir mecanismos patogênicos particulares (Kuppers, 2003). A latência III é característica das linfoproliferações pós-transplante, enquanto a latência II é observada na maioria das outras neoplasias, com exceção do LB, em que o vírus expressa um padrão de latência de tipo I. Nesta doença, o EBV expressa a proteína EBNA1, que é responsável pela replicação do epissomo viral e sua segregação na replicação celular, e os RNAs EBER. LMP1, a principal oncoproteína viral, não é expressa no LB (Kuppers, 2003).

O papel do EBV na patogênese do LB é controverso (Kuppers, 2003). O fato de que virtualmente 100% dos casos de LB nas áreas endêmicas da África estejam associados ao EBV indica um papel para o vírus na patogênese deste subtipo da doença. Entretanto,

as diferenças na frequência de associação em outras regiões geográficas, assim como o padrão restringido de expressão de proteínas e RNAs, nenhum dos quais com uma clara atividade transformadora, levaram alguns autores a argumentar contra um papel definitivo do EBV na patogênese do LB (Young and Rickinson, 2004).

Recentemente, um novo padrão de latência foi descrito em linhagens celulares derivadas de LBe, que inclui a deleção de EBNA2 e expressão de proteínas EBNA3 reguladas a partir do promotor Wp (latência Wp) (Kelly et al, 2002; Kelly et al, 2005; Kelly and Rickinson, 2007). Células infectadas pelo EBV com latência Wp exibiram proteção significativa contra a morte celular programada induzida por uma variedade de agentes citotóxicos (Leao et al, 2007; Anderton et al, 2008). Até o presente, este padrão de expressão não foi descrito em amostras primárias de tumor, sendo, portanto, difícil avaliar a frequência e extensão geográfica deste fenômeno.

Outra característica da associação do EBV com o LB ainda não bem definida é a presença do vírus em replicação lítica em uma fração de células neoplásicas. Isto foi descrito no LBe, com frequências entre 35% (Niedobitek et al, 1995) e 75% dos casos (Labrecque et al, 1999). Um resultado importante do estudo de Labrecque et al (1999) foi a correlação encontrada entre expressão de proteínas líticas e melhor resposta inicial à quimioterapia, indicando papéis potencialmente importantes das proteínas líticas na biologia e resposta terapêutica do LB.

2.1.3 Estadiamento, tratamento e desfecho clínico do LB

O LB é um tumor de crescimento rápido, no entanto, muito sensível à quimioterapia (Ziegler, 1972). É caracterizado por uma alta taxa proliferativa, com tempos de duplicação de 24-25 horas. Atendendo a estas características, o racional moderno dos tratamentos do LB é baseado no desenho de regimes poli-quimioterapêuticos intensivos

e de curta duração, que visam minimizar o surgimento de clones resistentes. Estes protocolos incluem quimioterapias em altas doses, principalmente ciclofosfamida, metotrexate e citarabina. Outras drogas como vincristina e doxorubicina são também incluídas em muitos regimes.

A intensidade do tratamento deve ser ajustada às características clínicas, como o volume do tumor (ressecabilidade, estadiamento, níveis de desidrogenase lática, LDH) e à resposta clínica durante o tratamento. Devido ao predomínio de acometimento de sítios extranodais, o estadiamento dos pacientes com LB é realizado usando o sistema do St. Jude/Murphy (Murphy, 1980).

Os protocolos de tratamento ajustados ao risco de falha terapêutica resultaram em uma taxa de sobrevida livre de doença (SLD) de 90 a 95% nos estádios precoces (Link et al, 1990; Patte et al, 2001) e de 80 a 90% nos estádios avançados (Bowman et al, 1996; Patte et al, 2001). Vários protocolos têm sido implementados, incluindo os nacionais e multicêntricos da França (LMB), Alemanha (BFM), Grã Bretanha (UKCCSG), e Estados Unidos (POG) (Cairo et al, 2003; Patte, 2002), sem evidências de uma vantagem clara de algum deles no tratamento do LB. Assim, como a melhora na taxa de sobrevida está associada a um risco aumentado de toxicidade, a escolha e o sucesso das diferentes opções terapêuticas depende também do contexto sócio-econômico e da existência de condições de suporte (Okebe et al, 2006).

O estudo alemão BFM (Berlin-Frankfurt-Munster) compreende 5 estudos consecutivos, visando o aumento da eficiência (BFM 81, 83, 86, 90, 95) (Reiter et al, 1995; 1999). No estudo BFM90, o tratamento foi estratificado de acordo a 3 grupos de risco (GR), descritos na tabela 2.1.

Tabela 2.1: Grupos de risco (GR) para ajuste do tratamento no protocolo BFM.

GR1	EI ou II. Lesão linfomatosa única completamente ressecável.
GR2	Doença primária extra-abdominal não ressecável (EII NR) ou tumor abdominal EIII e LDH < 2X valor normal
GR3	Tumor abdominal EIII e LDH \geq 2X valor normal, acometimento da MO, SNC ou doença óssea multifocal (EIV), LLA -L3

E: Estadiamento de acordo com o sistema de St. Jude/Murphy.

O tratamento consiste em cursos variáveis de dexametasona, metotrexate, ifosfamida, citarabina e etoposide (blocos A ou AA, de acordo à intensidade) alternados com ciclofosfamida e doxorubicina (blocos B ou BB). Pacientes que não atingem remissão completa após dois cursos recebem ciclos adicionais de Ara-C/VP16 em altas doses (bloco CC). Os pacientes no GR1 recebem 2 ciclos de quimioterapia, alternando blocos A e B; no GR2, 3 ciclos alternando A e B, e pacientes no GR3, recebem dois ciclos AA, BB e CC. O Serviço de Hematologia do INCA trata os pacientes com LB com um protocolo ajustado ao risco, baseado nos protocolos BFM86/90, no qual a dose de metotrexate foi reduzida de 5 mg/m^2 como preconizado no protocolo original para 2 mg/m^2 (Rotina Interna do INCA). Esta modificação teve como objetivo aumentar a percentagem de cura e diminuir a toxicidade associada à quimioterapia. Este protocolo foi avaliado recentemente (Klumb et al, 2004) mostrando uma sobrevida livre de eventos de 78% para todos os pacientes, sendo de 100% para os pacientes com estadios I/II e de 74% para os pacientes com estadios III/IV. Os resultados foram considerados comparáveis aos do estudo BFM90.

Apesar dos bons resultados observados na aplicação dos modernos protocolos de tratamento para o LB, um percentual de doentes não responde adequadamente e, para estes pacientes, há poucas opções terapêuticas. Assim, a procura por novos fatores prognósticos, principalmente nos estadiamentos mais avançados, é essencial à escolha

terapêutica mais adequada. Além disso, a identificação de marcadores biológicos associados à resposta terapêutica pode abrir oportunidades para o desenvolvimento de terapias alvo-específicas (Carbone, Gloghini and Dotti, 2008).

2.2 Interleucina-10: evidências de um envolvimento na tumorigênese

A interleucina-10 (IL-10) foi descrita inicialmente como uma citocina antiinflamatória produzida por linfócitos T CD4+, com diferenciação Th2 (*T helper 2*), e reconhecida por inibir a produção de INF- γ por células Th1 (Fiorentino, Bond and Mosmann, 1989). Diferentes tipos de células são capazes de produzir IL-10, principalmente monócitos, macrófagos, linfócitos T, linfócitos B e células neoplásicas, sendo que sua produção varia nos diferentes tipos de tecido ou durante as fases da resposta imune (Groux et al, 1998). Durante uma infecção, a IL-10 é capaz de controlar a resposta imune de células Th1, NK e macrófagos, o que resulta na amenização da imunopatologia (Moore, 2001). Em relação ao câncer, também é possível visualizar um papel dual desta interleucina (Figura 2.2). Por um lado, o efeito imunossupressor da IL-10 parece estar envolvido na patogênese de neoplasias, especialmente daquelas associadas a AIDS, através da inibição de macrófagos e da produção de IFN- γ , potentes mediadores antitumorais e antivirais (Fassone et al, 2000).

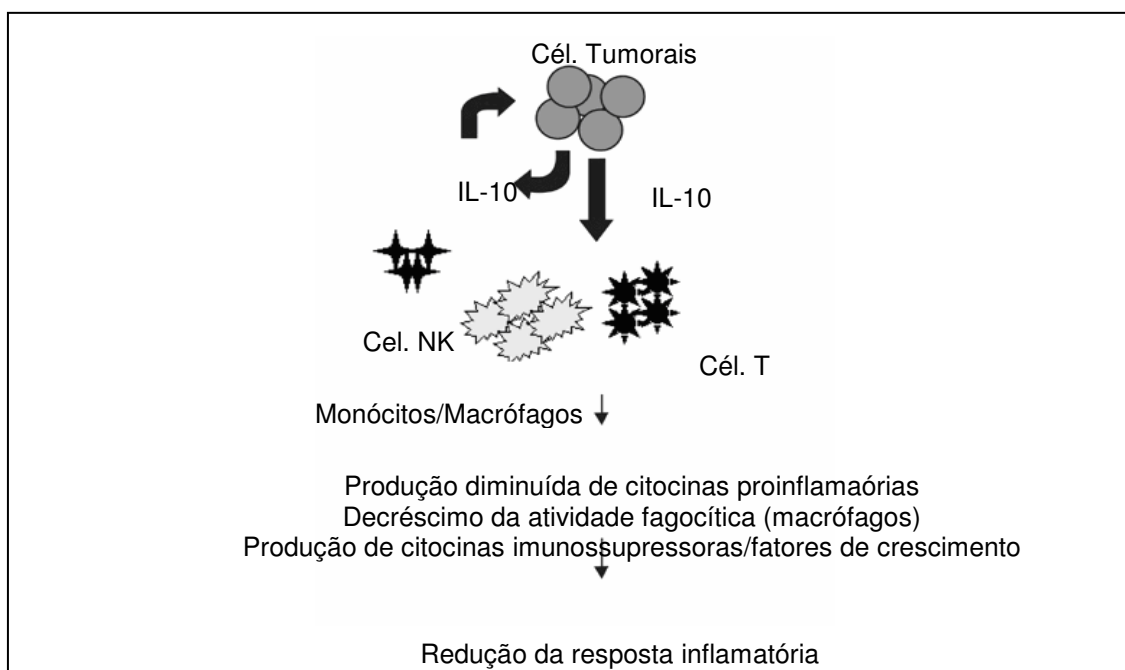


Figura 2.2: Representação esquemática da produção de IL-10 por células tumorais e seus efeitos em células do sistema imune e na resposta inflamatória. As células tumorais produzem IL-10, que atua como um fator autócrino/parácrino de maneira a promover crescimento celular e induzir produção de mais IL-10 para suprimir as funções de macrófagos e células T do microambiente tumoral. Adaptado de Ito et al, 2004.

A IL-10, portanto, pode contribuir para o desenvolvimento de um ambiente favorável a expansão de células neoplásicas e no potencial metastático das mesmas (Holland and Zlotnik, 1993).

Por outro lado, a IL-10 funciona como um potente fator de crescimento e diferenciação para linfócitos B humanos (Rousset et al, 1992). Esta propriedade pode contribuir nas neoplasias de células B, em particular as associadas com a infecção por EBV (Kossakowska et al, 1991; Guedez et al, 2001). Em pacientes com LNH, os níveis séricos de IL-10 estão significativamente aumentados quando comparados a indivíduos normais e pacientes com LNH em remissão (Blay et al, 1992).

Os efeitos da produção tecido-específica da IL-10 renderam resultados variáveis em diferentes sistemas tumorais. Além dos efeitos na angiogênese, proliferação celular e inibição de apoptose, a IL-10 pode afetar diferentes aspectos da imunidade anti-tumoral, como esquematizado na Figura 2.3.

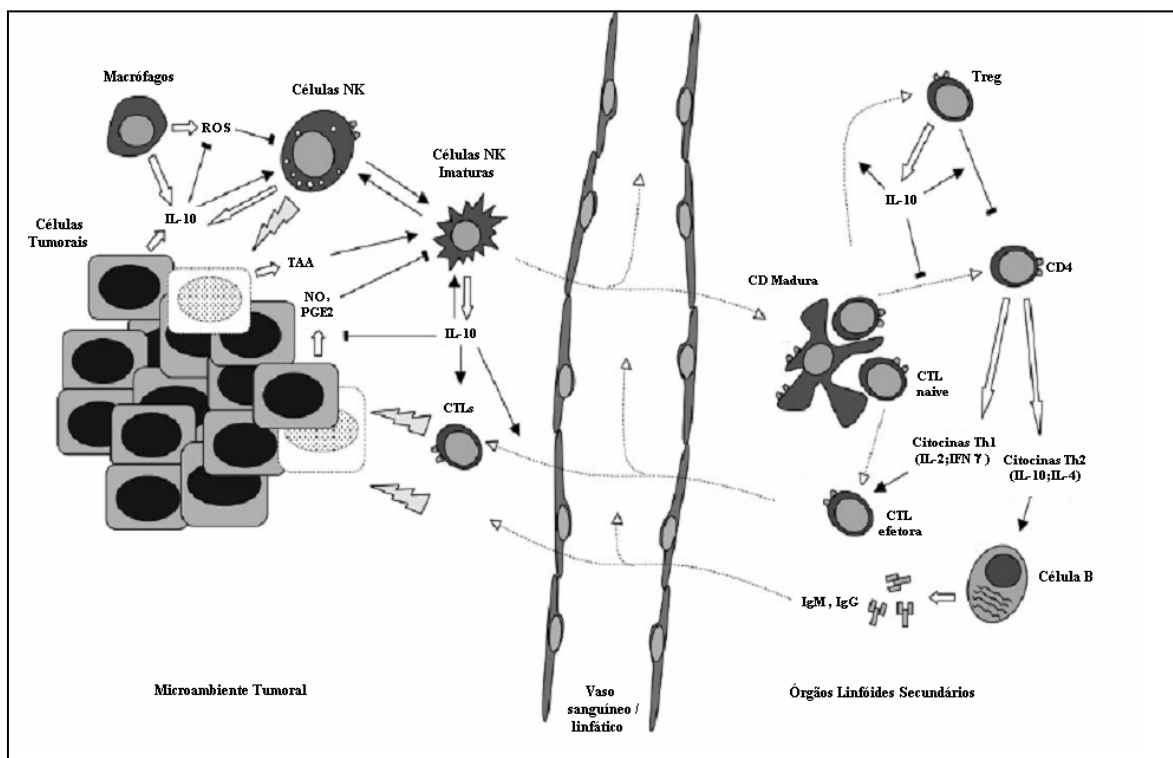


Figura 2.3: IL-10 e câncer. Painel à esquerda: Modelo de imunossupressão mediada por IL-10 através do aumento da captação de antígenos tumorais por células dendríticas. Painel à direita: Modelo de imunoestimulação mediada por IL-10 através da proliferação de células B e estimulação de células imunossupressoras como as T reg. CTL- linfócito T citotóxico; IL-10- interleucina-10; NK-natural killer; ROS- espécies reativas de oxigênio; TAA-antígeno associado ao tumor; Treg- célula T regulatória. Adaptado de Mocellin, Marincola and Young, (2005).

2.2.1 Interações Biológicas entre o EBV e a IL-10

O EBV é capaz de induzir a produção de IL-10, através de seus transcritos EBERS (Kitawaga et al, 2000). Estes RNAs são expressos em altos níveis por virtualmente todas as células, normais e tumorais, infectadas latentemente pelo EBV. Recentemente, foi proposto um mecanismo pelo qual o EBV utilizaria os mecanismos celulares antivirais mediados por interferon para induzir a produção de IL-10 (Samanta et al, 2008). Dessa forma, na célula infectada, o vírus faz uso de um mecanismo de defesa inata do hospedeiro para ativação da produção de IL-10 favorecendo sua persistência. Além disso, e apontando para a importância da IL-10 na biologia do EBV, foi demonstrada uma homologia de mais de 80% da IL-10 humana com o gene BCRF1 do EBV (Moore et al, 1990; Vieira et al, 1991). Este homólogo viral de IL-10 (vIL-10)

demonstrou várias das atividades biológicas da IL-10 humana, entretanto mostrou-se dispensável para a habilidade de transformação do EBV (Burdin et al, 1993; Swaminathan et al, 1993).

Outra evidência do papel da IL-10 na biologia da infecção pelo EBV foi antecipada por um estudo realizado com a população finlandesa, que mostrou que genótipos e haplótipos particulares do promotor do gene de IL-10 estavam associados à infecção tardia pelo EBV e ao risco de desenvolver doença sintomática (Helminen et al, 1999; 2001). De fato, foi mostrado que as variações genéticas no gene da IL-10 estão associadas à resistência de alguns herpesvirus comuns, à regulação da severidade de infecção e aos processos de reativação da infecção (Hurme et al, 2003).

2.2.2 Polimorfismos da IL-10

Polimorfismo genético é definido como a ocorrência de duas ou mais variantes alélicas determinadas por um *locus* genético simples, ocorrendo a variante ou alelo mais raro com uma frequência populacional igual ou superior a 1% ou 5%, de acordo com a rigorosidade do critério escolhido (Dobzhansky, 1975).

Os polimorfismos podem ser de tipo nucleotídeo simples (SNPs), seqüências repetitivas, inserções e deleções (Hamajima et al, 2001). As variantes mais comumente encontrada são SNPs bialélicos (Sachidanandam et al, 2001), encontrando-se no genoma humano um SNP aproximadamente a cada 300 pares de base (pb) (Lee et al, 2008). Foi também observada uma forte correlação entre alelos vizinhos, indicando que, em sua maioria, os SNPs proximamente localizados em um cromossomo são herdados juntos, através de gerações. Em termos genéticos, a associação física entre SNPs é chamada de desequilíbrio de ligação (DL) (Lewontin and Kojima, 1960). Os SNPs

organizam-se hierarquicamente sob forma de blocos no DNA, chamados haplótipos (Zhu et al, 2004).

Diversos estudos demonstraram que as proteínas do sistema imune têm em média uma maior taxa de evolução entre diferentes espécies de mamíferos, do que as outras proteínas (Cadavid et al, 1997; Hughes, 1997). Similarmente, genes do sistema imune, entre eles o gene da IL-10 mostraram maior diversidade genética nas regiões regulatórias (Hughes et al, 2005).

A IL-10 humana é codificada por um gene no cromossomo 1, região 1q31–1q32 (Eskdale et al, 1997) no qual foram identificados mais de cem SNPs, depositados no banco de dados dbSNP (NCBI, *National Center for Biotechnology Information*). Entre eles, 17 SNPs, 2 microssatélites, uma pequena deleção de 3 pb e 4 regiões Alu repetitivas (Número de acesso no *GenBank* X78437).

O promotor do gene da IL-10 foi extensamente caracterizado (Eskdale et al, 1997; Kube et al, 2001), tendo sido identificados 14 SNPs com frequência do menor alelo >5% nas diferentes populações. Estes polimorfismos mostraram DL muito alto entre eles, o que indica que são herdados em blocos (Lazarus et al, 2002).

Dentre os SNPs encontrados na porção distal do promotor, encontram-se -3575(T/A), -2849 (G/A) e -2763 (G/A) que constituem o haplótipo distal. Ainda nesta região, encontra-se o microssatélite ou STR IL10.R, formado por 8 a 13 repetições em tandem de (CA) e localizado a -4 Kb do sítio inicial da transcrição, +1 (Eskdale and Gallagher, 1995).

A 1,2 Kb do início do sítio de transcrição, na porção proximal do gene da IL-10, está localizado o STR IL10.G, que varia de 16 a 28 repetições de CA (Eskdale et al, 1996).

Três SNPs bem caracterizados na porção proximal do promotor do gene da IL-10 encontram-se nas posições -1082, -819 e -592 (Turner et al, 1997; Crawley et al, 1999).

Na posição -1082, ocorre a substituição nucleotídica de uma adenina (A) por uma guanina (G), dentro de um sítio de ligação ao fator de transcrição de Ets (Kube et al, 1995). Na posição -819, a substituição de uma citosina (C) por uma timina (T) ocorre em uma região de regulação positiva, e a substituição de uma C por A na posição -592 ocorre em um sítio de ligação a STAT-3 (Kube et al, 1995).

Existe um forte desequilíbrio de ligação entre os alelos -819C e -592C, o que resulta na ocorrência do haplótipo ACC ou GCC, quando existe uma A ou uma G, respectivamente, na posição -1082. No entanto, a combinação dos alelos -819T e -592A, só ocorre na presença do alelo -1082A resultando na formação do haplótipo ATA. Portanto, somente três dos quatro haplótipos possíveis foram encontrados na população caucasiana (Lazarus et al, 2002; Fife et al, 2006). Juntos os haplótipos ACC, ATA e GCC contribuíram para mais de 98% dos haplótipos presentes na população norte-americana, com uma pequena representação de um haplótipo raro “ATC” (Lazarus et al, 2002). Em populações asiáticas, além de o haplótipo GCC ter sido encontrado em menor frequência, foi observada a ocorrência de um outro haplótipos raro, “GTA” (Mok et al, 1998).

As frequências de haplótipos contendo os alelos de IL10.R, -1082, -819 e -592 foram determinadas na população alemã (Eskdale et al, 1999). Nesse estudo, a genotipagem de 166 cromossomos (83 indivíduos) nos quatro loci resultou em combinações que deram origem à classificação de quatro famílias de haplótipos mais frequentes: IL10.01 (R3-GCC), IL10.02 (R2-ACC), IL10.03 (R2-GCC) e IL10.04 (R2-ATA), (Tabela 2.2).

Apesar da maioria do grupo conter estes haplótipos mais frequentes, 12 dos 166 haplótipos apresentaram inconformidade com esse padrão, representado famílias minoritárias de haplótipos.

Tabela 2.2: Freqüências das famílias de IL-10 e combinações raras encontradas na população Européia (Eskdale et al, 1999).

Família	IL10.R	-1082	-819	-597	%
IL10.01	R3	G	C	C	31,9%
IL10.02	R2	A	C	C	27,1%
IL10.03	R2	G	C	C	19,2%
IL10.04	R2	A	T	A	14,4%
Total					92,8%
Combinações raras	IL10.R	-1082	-819	-597	
	R2	G	T	A	0,6%
	R3	A	T	A	2,4%
	R3	A	C	C	1,2%
	R4	G	C	C	2,4%
	R5	G	C	C	0,6%
Total					7,2%

2.2.3 Controle da expressão gênica por polimorfismos no gene da IL-10

A expressão gênica de IL-10 resulta em um RNA mensageiro de aproximadamente 2 Kb (Vieira et al, 1991) que é traduzido em uma proteína de 178 aminoácidos. Estudos familiares e de gêmeos indicam que entre 50-75% da variabilidade interindividual nos níveis de IL-10 podem ser atribuídas a variações genéticas (Westendorp et al, 1997; Reuss et al, 2002).

Os diferentes genótipos e haplótipos do gene da IL-10 foram associados, em estudos *in vitro* e *in vivo*, com uma produção diferencial da proteína (Eskdale et al, 1999). Estudos *in vitro* mostraram que a variabilidade individual pode atingir diferenças de até dez vezes na produção de IL-10 entre indivíduos portadores de genótipos de alta e baixa produção (Eskdale et al, 1998; 1999).

Na maioria dos trabalhos focados no estudo da expressão de IL-10, o genótipo -1082GG, assim como o haplótipo proximal GCC, foi relacionado a elevada expressão da proteína, enquanto que o inverso foi encontrado em relação ao genótipo -1082AA e o haplótipo ATA (Turner et al, 1997; Koss et al; 2000; Reuss et al 2002; Suárez et al, 2003; Mörmann et al, 2004; Miteva and Stanilova; 2008; Visentainer et al, 2008).

Outros autores encontraram que o genótipo -1082AA e haplótipo ATA são as variantes de alta produção de IL-10 (Kilpinen et al, 2002; Temple et al, 2003; Warlé et al, 2003). As controvérsias encontradas na literatura sugerem que as variantes alélicas do promotor da IL-10 podem ter efeitos diferentes na regulação da expressão desta molécula de acordo ao tipo celular.

2.3 Estudos de associação genética

Com a evolução do projeto genoma humano, foi reconhecido que este apresenta uma grande diversidade genética. Esta variabilidade, certamente substrato para as forças que operam na evolução da espécie, pode também ser reconhecida como fator de susceptibilidade para doenças comuns (Morley et al, 2004).

As pesquisas de associação genética estão muito ligadas com as metodologias da epidemiologia clássica (fatores de risco ambientais e genéticos) (Cordell and Clayton, 2005). Enquanto que a epidemiologia estabelece associações entre fatores ambientais e câncer, os estudos genéticos desempenham a função de elucidar diferenças funcionais entre variações genéticas e mecanismos biológicos na ocorrência do câncer. A Figura 2.4 esquematiza como os estudos epidemiológicos integrados às informações genóticas podem ser úteis no estabelecimento de associações entre genótipos, fatores ambientais e risco de desenvolvimento do câncer, além de fornecer evidências para a distinção de grupos de indivíduos mais susceptíveis dos menos susceptíveis e ajudar na compreensão dos mecanismos biológicos da carcinogênese (Perera, 2000).

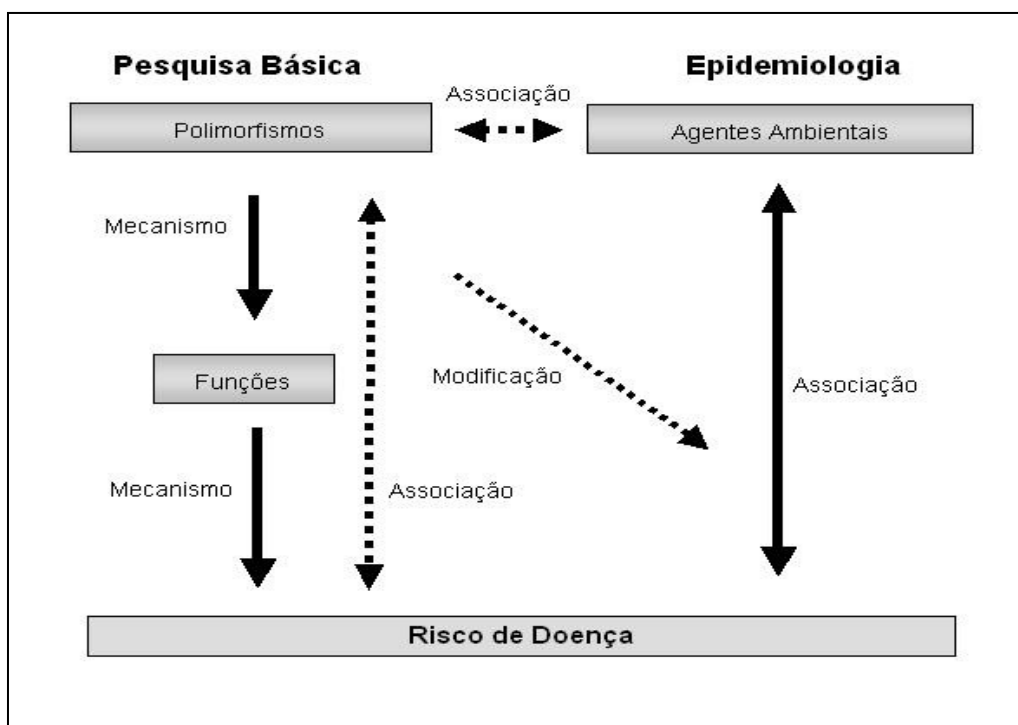


Figura 2.4: O papel da epidemiologia e da pesquisa básica nos estudos de associação genética. A figura mostra que os traços genéticos são capazes de modificar a força das associações. Com o advento do uso de ferramentas apropriadas para o estudo das associações genéticas agora disponíveis aos epidemiologistas, as informações genótípicas devem ajudar na identificação de indivíduos mais suscetíveis aos fatores ambientais.

Dado que o genoma humano contém mais de 15 milhões de SNPs, são raras as chances de se encontrar, ao acaso, um polimorfismo associado a doenças. As abordagens vão desde o estudo de polimorfismos em genes candidatos, escolhidos com base em plausibilidade biológica; passando pelo estudo de regiões completas com o intuito de identificar polimorfismos associados direta ou indiretamente ao risco; até as abordagens não supervisionadas, desenvolvidas recentemente, de estudo de polimorfismos de genomas inteiros, em que uma grande quantidade de SNPs ao longo de todos os cromossomos são avaliados, com a ajuda de métodos de alta performance (Plenge and Rioux, 2006; Wan et al, 2009).

Neste contexto, os polimorfismos no gene da IL-10 tornam-se fortes candidatos a um estudo de associação com o linfoma de Burkitt pediátrico, dada a importância central

desta molécula na biologia da célula B e a relação dos polimorfismos com a idade da infecção pelo EBV.

2.3.1 Uma preocupação quanto aos métodos estatísticos utilizados

Apesar dos estudos de associação genética existirem há muitos anos, existe pouco consenso quanto aos métodos estatísticos mais apropriados (Balding 2006). A primeira análise a ser feita com genótipos de SNPs é a testagem da hipótese nula do equilíbrio de Hardy-Weinber (EHW) (Plenge and Rioux, 2006). A teoria de Hardy-Weinberg descreve uma situação genética na qual, na ausência de mutações, fluxo gênico, deriva genética ou acasalamentos não-randômicos, as frequências genótípicas permanecem constantes de geração em geração e são um produto das frequências alélicas de uma população (Weinberg, 1908 apud Dobzhansky, 1975; Mayo, 2008). Ainda, desvios do EHW podem ocorrer quando um determinado genótipo é favorecido por um fator ambiental ou como resultado de erros de genotipagem (Balding, 2006; Lee et al, 2008). Os alelos de um SNP podem interagir de diferentes maneiras (dominante, recessivo, aditivo, multiplicativo) em relação ao risco de desenvolvimento de uma doença. A determinação de qual modelo genético melhor se ajusta a este risco se torna importante uma vez que o uso de uma abordagem estatística não condizente com o modelo genético em questão pode mascarar os reais riscos de associação (Lewis, 2002; Balding, 2006; Li, 2007).

Em relação a isto, os teste de χ^2 (Qui-quadrado) e Fisher são normalmente preferidos para as análises do status de caso-controle (Lewis, 2002), mas em casos de notórios efeitos aditivos, o poder estatístico destes testes diminui. Nestes casos, o teste de Cochran-Armitage (também chamado de teste de proporção de tendências) é o mais apropriado, pois é capaz de refletir uma tendência previsível (Balding, 2006).

Como uma consideração final sobre os estudos de associação, é importante ressaltar que o poder dos cálculos estatísticos é relevante para o ajuste das expectativas sobre a probabilidade de detectar um resultado verdadeiramente positivo. Os principais componentes do poder estatístico são: frequência do alelo de susceptibilidade, magnitude do efeito genético e tamanho amostral. Quanto mais freqüente o alelo raro, quanto mais forte o efeito genético e quanto maior o tamanho amostral, maior é o poder de se detectar uma associação (Lin, Chakravarti and Cutler, 2004).

Geralmente, um tamanho amostral reduzido é acompanhado de perda de poder estatístico. Como as variantes genéticas normalmente contribuem com efeitos modestos, estudos sugerem que tamanhos amostrais maiores e valores de p mais conservativos devem ser utilizados (Risch and Merikangas, 1996). No entanto, o uso de tamanhos amostrais tão grandes torna-se inviável para os estudos de genotipagem em nível populacional. De fato, a descoberta de genes associados a doenças sofrem um viés acerca do poder de associação, até mesmo em estudos que utilizam grandes tamanhos amostrais (Hirschhorn and Daly, 2005). Uma abordagem sugerida por Hirschhorn and Daly (2005) é capaz de reduzir o número de indivíduos genotipados, sem sacrificar o poder estatístico de uma associação. Propõe-se o uso de populações menores para a identificação de SNPs com possível associação com doença e depois re-testagem, em populações maiores, dos SNPs que foram associados positivamente com a doença (Hirschhorn and Daly, 2005). Os resultados dessa abordagem podem ser utilizados para distinguir as associações verdadeiramente positivas identificadas no primeiro estudo dos resultados falso-positivos que podem ocorrer ao acaso.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar o papel de polimorfismos do promotor do gene da IL-10 na susceptibilidade e resposta terapêutica do LB pediátrico, nos subgrupos EBV+ e EBV-.

3.2 Objetivos Específicos

1. Realizar um estudo caso-controle para identificar padrões de polimorfismos dos SNPs -1082A/G, -819C/T, -592C/A e dos microssatélites IL10.G e IL10.R que variam sistematicamente entre indivíduos com LB e indivíduos saudáveis, e poder inferir modelos de herança e efeitos de susceptibilidade genética.
2. Analisar a relação dos polimorfismos no promotor do gene da IL-10 com as características clínicas e demográficas do LB pediátrico.
3. Analisar a relação dos polimorfismos no promotor do gene da IL-10 com a presença do vírus Epstein-Barr nas células tumorais.
4. Analisar o possível papel dos fatores tumorais (características clínicas), dos fatores do hospedeiro (polimorfismos da IL-10) e de fatores ambientais (presença do EBV) na resposta à terapia dos pacientes com LB.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Considerações sobre o desenho do estudo

Um estudo de associação genética foi realizado em um grupo de crianças com LB, utilizando-se metodologias de caso-controle e série de casos (Cooper et al, 2002; Balding, 2006).

Foi investigada a presença de alelos, genótipos, haplótipos ou famílias de haplótipos no promotor da IL-10, que pudessem conferir susceptibilidade ao desenvolvimento do LB, em relação a um grupo controle de indivíduos saudáveis.

A seleção de casos foi por caso prevalente, ou seja, pacientes já diagnosticados quando entraram no estudo. O grupo controle incluiu indivíduos sem a doença, com a mesma origem geográfica dos pacientes com LB.

Este estudo foi desenhado de acordo com o Código Brasileiro de Ética Médica (1988), a declaração de Helsinque (1986) e nas Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos (Resolução 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde). A privacidade dos pacientes foi garantida durante e depois de finalizado o estudo. A aprovação pelo Comitê de Ética do INCA se encontra no Anexo I.A

4.2 Pacientes

Foram estudadas 92 amostras de 62 pacientes pediátricos (2 a 14 anos) portadores de LB diagnosticados no Serviço de Hematologia e na Divisão Integrada de Patologia (DIPAT) do Instituto Nacional do Câncer (INCA), Rio de Janeiro, entre 1993 e 2007. Os LB foram classificados segundo critérios morfológicos e imunohistoquímicos, de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) (Diebold et al,

2001), por hematopatologistas do DIPAT. Casos associados ao vírus da imunodeficiência humana (HIV) foram excluídos deste estudo.

4.3 Obtenção de dados clínicos

Os dados clínicos laboratoriais do diagnóstico e acompanhamento dos pacientes foram obtidos dos registros hospitalares do arquivo médico do INCA. A coleta de dados clínicos referentes aos pacientes com LB contou com a colaboração da Dra. Claudete Klumb, do Serviço de Hematologia do INCA. Um modelo de ficha clínica elaborado para a coleta de dados dos pacientes com LB é apresentado no Anexo I.B.

4.4 Controles

No presente trabalho, foi utilizado um grupo controle de conveniência que consistiu de 230 doadores saudáveis do CEMO-INCA. Foram estudadas amostras de sangue periférico (SP) de indivíduos matriculados no Laboratório Biologia Molecular do CEMO e, no caso dos controles de idade zero, bolsas de sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) provenientes do Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário.

Do total de controles, 71 foram crianças, incluindo 41 crianças com idades entre 2 e 16 anos e 30 amostras de SCUP, incluídas como controles de idade zero. Neste último grupo, a seleção dos controles foi baseada no pareamento de sexo com a classe de idade de 0-4 anos dos casos, assim como na procedência do Estado do Rio de Janeiro da progenitora.

Neste trabalho, foram estudadas amostras de SCUP que não atingiram contagem de células CD34+ suficiente para serem utilizadas como fonte de células-tronco para transplante. Os estudos moleculares foram realizados no Laboratório de Biologia

Molecular do CEMO, com a colaboração da Divisão de Genética da Coordenação de Pesquisas (CPQ) do INCA.

4.5 Amostras biológicas

Neste trabalho foram utilizadas amostras de SP, medula óssea (MO) (idealmente 5-10 ml, com o anticoagulante EDTA) ou SCUP. Além disso, foram estudadas biópsias cirúrgicas que consistiram de tecidos frescos ou congeladas a -80°C . Do total dos 62 casos com LB, 20 (32,25%) foram estudados a partir de tecido fixado e impregnado em parafina (FIP). O processamento das amostras biológicas foi realizado como descrito a seguir.

4.5.1 Separação das células mononucleares (CMN) por centrifugação em gradiente de densidade

As amostras de SP e MO foram diluídas em volumes adequados de solução balanceada de fosfato (PBS, Anexo I.E), e colocadas sobre um volume igual de Ficoll-Histopaque®-277 (Sigma). Após centrifugação a $400 \times g$ durante 30 minutos a 25°C , o anel de células mononucleares da interface foi extraído com uma pipeta Pasteur e transferido a um novo tubo tipo Falcon. Estas células foram lavadas duas vezes com PBS, alternando centrifugação a $250 \times g$ por 10 minutos a 4°C e finalmente foram ressuspendidas em 1 ml de PBS. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer.

4.5.2 Obtenção de células totais por lise celular

As amostras de sangue de cordão umbilical e placentário foram diluídas em tampão de lise de células vermelhas (RCBL, do inglês *Red Cell Buffer Lysis*, Anexo I.E) (pH 7,4). A mistura foi agitada durante 1 minuto e colocada em banho de gelo por 10 minutos.

Após centrifugação a 250 x g por 7 minutos a 4°C, desprezou-se o sobrenadante. Estas células foram lavadas duas vezes com PBS, alternando centrifugação a 250 x g por 10 minutos a 4°C e finalmente foram ressuspensas em 1 ml de PBS. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer.

4.5.3 Processamento de biópsias cirúrgicas

As amostras de tecido sólido proveniente de biópsias foram transportadas em meio RPMI-1640 com 10% de SFB. Os anexos conectivos foram desprezados e o tecido restante foi dissociado em placas de Petri com o auxílio de bisturis. Posteriormente, os fragmentos desagregados foram submetidos a procedimentos de extração de ácidos nucléicos.

4.6 Métodos de extração de DNA

4.6.1 Extração de DNA de alto peso molecular das suspensões celulares

Uma alíquota das suspensões celulares (CMN e células totais) contendo $1-2 \times 10^7$ células/ml foi ressuspensa em 1 ml do reagente DNAzol® (Invitrogen). O DNA foi precipitado a partir da adição de 500 µl de etanol absoluto (Merk) a 4°C, lavado 2 vezes com etanol 95%, solubilizado em 300 a 500 µl de NaOH 8mM e neutralizado com HEPES 0,1M, de acordo com as recomendações do fabricante.

4.6.2 Isolamento de DNA de alto peso molecular a partir de tecido a fresco

4.6.2.1 Digestão com proteinase K

Dependendo da concentração celular ou do tamanho do fragmento de tecido sólido, o material biológico foi ressuspensa em volumes variáveis de tampão de digestão (Solução A, anexo I.E). Após lise com 0,1 – 0,5% de dodecil sulfato de sódio (SDS)

(Sigma), a digestão enzimática foi realizada com 200 µg/mL (concentração final) de proteinase K (Invitrogen), a 65°C por 12-24 horas.

4.6.2.2 Extração orgânica com fenol-clorofórmio

À suspensão celular, foi adicionado um volume igual de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, Sigma) e a mistura foi agitada por 10 minutos em agitador mecânico. O material foi centrifugado por 20 minutos a 450 x g (2500rpm) a 4°C e o sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para um novo tubo, ao qual foi adicionado volume igual de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, Sigma). O tubo foi agitado novamente e centrifugado por 20 minutos a 450 x g (2500rpm) a 4°C. O sobrenadante foi então transferido para um novo tubo e o DNA foi precipitado com 1:10 (v/v) acetado de sódio 3M (pH5.2) e 2 volumes de etanol absoluto gelado. Finalmente, o DNA precipitado foi lavado em etanol 70%, deixado secar e ressuspendido em 50-100 µL de TE, para a obtenção de uma concentração aproximada de 500 ng/µl.

4.6.3 Extração de DNA a partir de tecidos FIP

Para obtenção de DNA a partir de tumor FIP, procedeu-se ao corte de aproximadamente 4 a 8 secções (4-6 µm de espessura) de cada bloco de parafina, utilizando um micrótomo Spencer (modelo 820). Os cortes foram transferidos para tubos de 1,5 ml estéreis, para posterior extração do DNA. Foram seguidos procedimentos rígidos a fim de evitar a degradação adicional do DNA pela ação de nucleases e a contaminação cruzada entre as amostras. Os procedimentos descritos a seguir foram realizados seguindo protocolos desenvolvidos previamente no laboratório de Biologia Molecular do CEMO (Stefanoff et al, 2003).

A desparafinização dos cortes foi realizada mediante a adição de 1 ml de xilol (Merk), seguido de centrifugação a 1200 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Após, duas lavagens com 1 ml de etanol absoluto foram seguidas de centrifugação nas condições citadas acima. O tecido foi então ressuspensionado em aproximadamente 500 µl de tampão não iônico NIB (Anexo I.E) e proteinase K a uma concentração final de 200 µg/ml. A mistura foi incubada a 65°C, por aproximadamente 12 horas. Após o tempo de digestão, a proteinase K foi inativada a 95°C por 8 minutos, seguindo de centrifugação a 6000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante transferido para novo tubo. A fim de minimizar o efeito de possíveis inibidores de PCR, foram utilizadas diluições dos extratos primários, em proporções 1:10 e 1:20, assegurando uma concentração aproximada de 200 ng/µl de DNA.

4.7 Avaliação qualitativa e quantitativa do DNA

A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8% com 0,5 µg/ml de brometo de etídeo (Invitrogen) a 5V/cm em tampão TAE (Anexo I.E).

A quantificação do DNA foi realizada em um espectrofotômetro NanodropTM 9000 (Thermo Scientific), por meio de leituras feitas no comprimento de onda de λ 260nm, considerando que uma unidade de densidade óptica (DO) corresponde a aproximadamente 50 µg/ml para DNA de dupla fita (Sambrook et al, 1989). A pureza das amostras foi estimada pela relação 260/280. Amostras com valores entre 1,8 e 2,0 foram consideradas com grau de pureza satisfatório.

4.8 Avaliação da amplificabilidade do DNA através de PCR para genes constitutivos

Com o objetivo de determinar a amplificabilidade do DNA e testar a presença de inibidores da PCR que pudessem levar ao aparecimento de falsos negativos, foram realizadas reações com iniciadores específicos para os genes constitutivos *ACTB* (β -actina) e *HBB* (β -globina) (Stefanoff et al, 2003). As reações de PCR foram desenvolvidas em uma etapa, em volumes finais de 30 μ l, com 35 ciclos e temperatura de “annealing” de 61°C para β -actina e 60 °C para β -globina, com 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen), concentração de 0,33 μ M de cada iniciador e 1U de Taq Polimerase (Invitrogen). Os tamanhos esperados dos produtos de PCR foram de 300 pb para a amplificação de β -actina e 150 pb para a amplificação de β -globina. Os produtos foram avaliados em géis de agarose 2% contendo brometo de etídeo.

4.9 Detecção e tipificação do genoma do vírus Epstein-Barr (EBV)

4.9.1 Método de hibridização *in situ* para EBERs (EBER-ISH)

A detecção do EBV nas amostras de tumor FIP foi realizada pela técnica de hibridização *in situ* (ISH) utilizando sondas biotinizadas para os RNA EBERs (Hassan et al, 2006) conforme descrito a seguir:

Os cortes foram desparafinizados por incubação com xilol (Merk) em estufa a 60°C por 30 minutos, seguido por 2 banhos em xilol de 10 minutos, cada um. Posteriormente, os cortes foram hidratados através de banhos sucessivos em etanol (Merk) de concentração descendente (etanol 100%, etanol 95%, etanol 70%) e água destilada, por 5 minutos em cada banho. Foi então realizada digestão com proteinase K (20 μ g/ml) a 65° C por 30 minutos e os cortes foram desidratados através de banhos sucessivos em etanol 70%, etanol 95% e etanol 100% e deixados secar a temperatura ambiente.

A etapa de hibridização foi realizada mediante incubação dos cortes com 10 µl da sonda biotinilada para EBERs (Kit de Hibridização *in situ* para o vírus Epstein-Barr, Novocastra) e incubação em estufa a 37° C por 2 horas. Após a hibridização, as lâminas foram lavadas em TBS (Anexo I.E) e acondicionadas em câmara úmida. O bloqueio de hibridização inespecífica foi realizado por incubação com 100µl de solução bloqueante (TBS 0,1%; Triton X-100; BSA 3%) por 10 minutos a temperatura ambiente. Foi adicionado o anticorpo anti-FITC conjugado com fosfatase alcalina (diluição 1:200) e incubado por 20 minutos. As lâminas foram lavadas duas vezes em TBS, por 3 minutos, seguido de incubação em solução de fosfatase alcalina (pH 9,0) por 5 minutos.

Para a detecção da marcação com os anticorpos, aplicou-se 100 µl de solução de detecção preparada no momento [1 ml de solução de fosfatase alcalina, 8 µl de solução do substrato de fosfatase alcalina (BCIP/NBT, Anexo I.E) e 1 µl de Levamisole] e a incubação procedeu por 16 horas à temperatura ambiente. A contracoloração foi realizada com solução de hematoxilina de Harris por 30 segundos. Após desidratação, realizou-se a montagem utilizando meio Glicergel (Dako). Para cada reação utilizou-se, como controle uma lâmina contendo corte de carcinoma de nasofaringe sabidamente positivo para a expressão de EBERs. A reação foi considerada positiva quando se observou a marcação nuclear acastanhada.

4.9.2 Tipificação do EBV por PCR para o gene EBNA2

Os resultados obtidos pelo método EBER-ISH foram confirmados por uma reação de PCR em ninho desenhada para a amplificação da região do gene EBNA2 que discrimina os subtipos EBV1 e EBV2, com condições previamente validadas no laboratório (Hassan et al, 2006).

4.9.3 Tipificação do EBV por PCR para o gene EBNA3C

A reação de tipificação viral foi realizada em volumes finais de 50 μ l com 35 ciclos e temperatura de “annealing” 57°C, 2,5 mM MgCl₂ (Invitrogen), concentração de 0,33 μ M de cada iniciador e 1U de Taq Platinum Polimerase (Invitrogen). A seqüência dos iniciadores encontra-se no anexo I.C. Os produtos da reação de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2%. A discriminação dos tipos virais foi realizada por inspeção de tamanho do produto de PCR, sendo esperado um fragmento de 153 pb para EBV1 e um fragmento de 246 pb para EBV2.

4.10 Caracterização dos polimorfismos do promotor do gene da interleucina-10 (IL-10)

Foram estudados 3 polimorfismos de base simples ou SNPs da região proximal do promotor do gene da IL-10: os SNPs -1082 A/G, -819 C/T e -592 C/A (Turner et al, 1997). Estes SNPs estão em desequilíbrio de ligação e apresentam combinações mais freqüentes na população, constituindo um haplótipo proximal (Eskdale et al, 1998). Além disso, foram estudadas duas regiões de microssatélites ou STR. Os microssatélites IL10.G e IL10.R do promotor da IL-10 são formados por repetições em tandem de (CA)*n*, onde *n* corresponde ao número de repetições dinucleotídicas, que variam de 16 a 28 no caso no STR IL10.G (Eskdale et al, 1996) e de 8 a 13 para o STR IL10.R (Eskdale and Gallagher, 1995).

4.10.1 Estratégia de genotipagem

Os experimentos para detecção dos polimorfismos da IL-10 foram realizados por etapas: A princípio, foi genotipada a posição -1082G/A, com duas reações de PCR realizadas em paralelo. Em seguida, a detecção dos alelos do microssatélite IL10.G por

PCR fluorescente teve como finalidade, além da genotipagem, a confirmação dos resultados do SNP -1082 devido a metodologia escolhida (vide abaixo). Posteriormente, realizaram-se os experimentos para a genotipagem da posição -592A/C. A genotipagem do SNP -819 foi realizada mediante a incorporação de um iniciador específico nas reações de haplotipagem experimental. A combinação dos genótipos dos dois SNPs foi confirmada por reações AS-PCR (do inglês, *Allele Specific Polymerase Chain Reaction*) cruzadas utilizando iniciadores específicos para as posições -1082, -819 e -592. Esta técnica foi realizada “às cegas” em relação aos resultados das PCRs simples para genotipagem dos SNPs -1082 e -592.

Por fim, foi realizada a detecção dos alelos do microssatélite IL10.R. Combinações entre os haplótipos e alelos de microssatélite foram feitas agrupando-os em famílias. Todos os dados foram computados em tabelas e analisados com programas estatísticos.

4.10.2 Genotipagem dos SNPs -1082 A/G e -592C/A

Para a genotipagem por AS-PCR foram realizadas duas reações em paralelo. Um dos iniciadores é comum para ambas as reações e o outro é desenhado em duas versões que diferem no nucleotídeo situado no extremo 3', possibilitando a discriminação entre as variantes alélicas A ou G (Cavet et al, 1999; Kube et al, 2003).

Foram realizadas duas reações independentes, com as seguintes combinações de iniciadores: JW-F/B1 para amplificar o alelo G e JW-F/B2 para amplificar o alelo A da posição -1082. Para a identificação dos alelos -592A e -592C, as combinações de iniciadores usadas foram 592/592A e 592/592C, respectivamente. As seqüências dos iniciadores para ambas as reações encontram-se descritas no anexo I.C.

As reações finais para genotipagem de ambos os SNPs foram realizadas em volumes finais de 30 µl, com 30 ciclos e temperatura de “annealing” de 60°C para o SNP-592 e

59°C para o SNP-1082. As reações de PCR continham tampão de reação 10 mM KCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 0,2 mM de cada dNTP, 0,33 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1U de *Taq Polimerase Platinum* (Invitrogen). Foram usados 50 ng de DNA genômico como substrato para as reações de PCR.

Os produtos das reações de AS-PCR foram visualizados em géis de poliacrilamida 8% corados com nitrato de prata. O tamanho esperado dos produtos de amplificação variou entre 134 pb e 150 pb para a posição -1082, devido à existência de uma região de microsatélite flanqueada pelos iniciadores utilizados na reação (vide abaixo), e foi de 200 pb para a posição -592.

4.10.3 Haplotipagem experimental

Foi utilizada a abordagem de haplotipagem experimental para que as combinações entre os alelos dos SNPs -1082A/G, -819C/T e -592C/A, que definem o haplótipo proximal no promotor gênico da IL-10, pudessem ser definidas em cada cromossomo de todos os indivíduos analisados. Isto foi possível devido ao forte desequilíbrio de ligação entre as posições -819 e -592 (Eskdale et al, 1996). Considera-se que quando existe uma citosina em -819, também há uma citosina em -592. O mesmo ocorre para os alelos -819T/-592A. Como esses polimorfismos arranjam-se linearmente em um mesmo cromossomo, três AS-PCRs cruzadas foram realizadas simultaneamente usando-se combinações de iniciadores para as posições -1082A/G, -819C/T e -592C/A (Moñux-Ducajú et al, 2006).

As combinações de iniciadores utilizadas foram: -1082A com -592C; -1082A com -819T e -1082G com -819C a fim de se amplificar fragmentos relativos aos haplótipos ACC, ATA e GCC, respectivamente (figura 4.1).

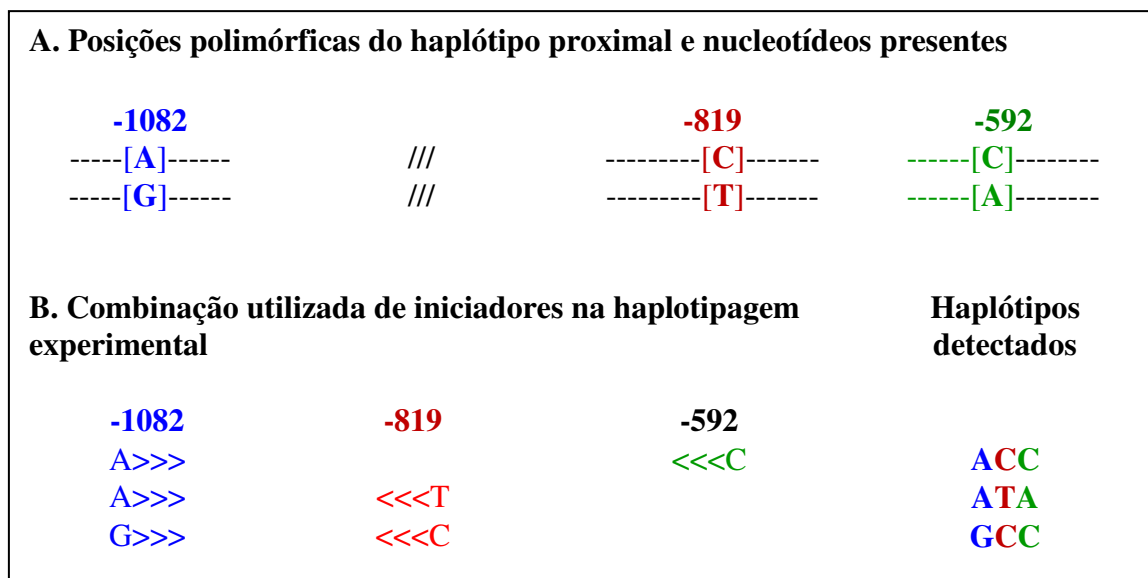


Figura 4.1: Haplotipagem experimental. A.) Nucleotídeos presentes nas posições polimórficas proximais do promotor do gene da interleucina-10. B.) Estratégia de combinação de iniciadores específicos para cada reação de PCR a fim de se detectar os três haplótipos proximais mais frequentes na população. Direção do iniciador: >>> (5' - 3'); <<< (3' - 5').

As reações dos três haplótipos foram realizadas em volumes finais de 25 µl, com tampão de reação 10 mM KCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1U de Taq Polimerase Platinum (Invitrogen), usando como substrato 50 ng de DNA genômico. Os iniciadores utilizados nas reações de PCR encontram-se listados na tabela C1 do anexo I.C.

Os fragmentos produzidos foram de 490 pb para o haplótipo ACC e 263 pb para os haplótipos ATA e GCC.

4.10.4 Genotipagem dos microssatélites IL10.G e IL10.R

Os microssatélites ou STRs consistem de repetições de uma seqüência curta. Para determinar o número de repetições, ou seja, identificar os alelos, os iniciadores são desenhados em regiões que flanqueiem os STR específicos. A detecção dos alelos, cujos tamanhos diferem no número de repetições da unidade, pode ser realizada com base nas diferenças de tamanho do produto de PCR.

As condições da PCR dos microssatélites foram padronizadas com o objetivo de minimizar a presença de artefatos de amplificação. Para isto, foi usado o tampão específico STRGold (Promega) com a adição de DMSO 1% (Sigma); foi incorporada no perfil térmico da reação uma etapa de extensão final de 45 minutos a 60°C e a concentração do DNA adicionada em cada reação foi estritamente controlada (50 ng).

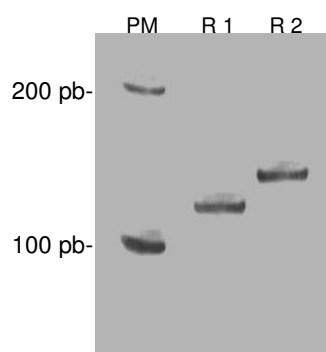
O microssatélite IL10.G, está localizado na região flanqueada pelos iniciadores do SNP - 1082, o que permite a utilização da mesma estratégia de amplificação (Figura 4.2). A adição do fluorocromo 6-carboxi-fluoresceína (6-FAM) marcando a região 5' do iniciador JW-F, permite a detecção dos alelos no sistema de genotipagem do seqüenciador automático MEGABACE 1000. O tamanho esperados dos alelos variou entre 134 pb para o menor alelo, (CA)₁₈, e 152 pb para o alelo maior, (CA)₂₈.

As condições de reação para o microssatélite IL10.R consistiram de uma etapa com 35 ciclos e temperatura de "annealing" 60°C e uma extensão final 60°C durante 45 minutos. Os volumes finais foram de 30 µl, com 1,75 mM de MgCl₂, 0,4 µM de cada um dos iniciadores, 2 mM de dNTP e 1U de Taq DNA polimerase Platinum (Invitrogen). Os iniciadores para esta reação encontram-se descritos na tabela C1, Anexo I.C. O tamanho esperado dos alelos variou entre 195 pb para o alelo menor, (CA)₈, e 203 pb para o alelo maior, (CA)₁₃.

A. Reações de PCR para detecção dos alelos do SNP -1082 e do microsatélite IL10.G.

Reação	Iniciador 1	Sequencia 5'-3'	IL10.G (CA) _n	Sequencia 5'-3'	Iniciador 2	Alelo específico
1	JW-F	gcaacactcctcgccgc	(CA) ₂₀	Ggggaagtagggatagg	B1	G
2	JW-F	gcaacactcctcgccgc	(CA) ₂₄	Agggaagtagggatagg	B2	A

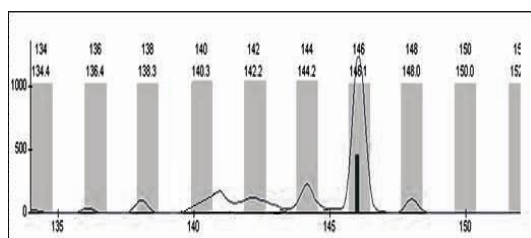
B. Visualização dos produtos das reações de PCR em gel de poliacrilamida 8% corado com NO₃Ag e detecção dos resultados.



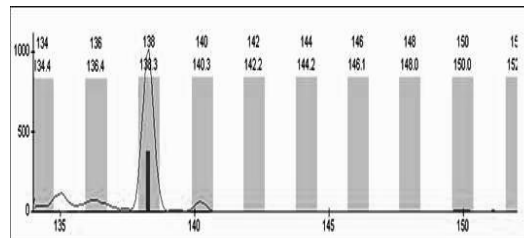
Reação	Resultado	Alelo	Genótipo
1	B1 Positivo	G	GA
2	B2 Positivo	A	

C. Detecção dos alelos do microsatélite IL10.G.

Reação 1: 138 pb; (CA)₂₀; IL10.G8



Reação 2: 146 pb; (CA)₂₄; IL10.G12



Electroferogramas obtidos com o programa Genetic Profiler em um seqüenciador automático MegaBace 1000.

Figura 4.2: Representação esquemática da estratégia utilizada para genotipagem do SNP IL-10 -1082 pela técnica de AS-PCR e os alelos do microsatélite IL10.G por STR-fluorescente. A. Iniciadores utilizados em duas reações realizadas em paralelo para a detecção específica dos alelos do SNP -1082A/G (Alelo G: JWF/B1; Alelo A: JWF/B2). B) Após amplificação os produtos da reação de PCR, são visualizados em géis de poliacrilamida 8% e corados com nitrato de prata. C) A genotipagem é confirmada pelo seqüenciador automático onde são gerados electroferogramas para a detecção dos alelos do microsatélite IL10.G também amplificados pela reação de PCR.

4.10.5 Detecção das famílias de IL-10

Os alelos do microssatélite IL10.R e os SNPs proximais combinam-se formando 4 famílias de haplótipos no locus da IL-10 humana (Eskdale et al, 1999). As famílias de haplótipos já identificadas foram: IL10.01: R3-G-C-C; IL10.02: R2-A-C-C; IL10.03: R2-G-C-C; IL10.04: R2-A-T-A (Eskdale et al, 1999).

Neste estudo, as famílias de haplótipos no promotor do gene da IL-10 foram computadas de acordo com a presença dos alelos do STR IL10.R e dos haplótipos proximais em cada indivíduo como exemplificado na tabela 4.1. Algumas combinações mais raras na população foram encontradas outros estudos (Eskdale et al, 1999) e foram classificadas por nós como: IL10.05 (R3-ATA), IL10.06 (R3-ACC) e IL10.07 (R4-GCC), (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Combinação dos alelos do STR IL10.R e haplótipos proximais em famílias.

Grupo de famílias de IL-10 de maior frequência		
Genótipo IL10.R	Combinação de Haplótipos	Família IL-10
R2/R2	GCC/GCC	03/03
R2/R3	ATA/GCC	01/04
R2/R2	ACC/ATA	02/04
Grupo de famílias de IL-10 de menor frequência		
Genótipo IL10.R	Combinação de Haplótipos	Família IL-10
R2/R3	ATA/ATA	04/05
R3/R3	ACC/GCC	01/06
R2/R4	ATA/GCC	04/07

4.11 Confirmação da genotipagem no promotor do gene da IL-10

Com o propósito de diminuir a incidência de erros de genotipagem, foram abordadas diversas estratégias para a confirmação dos resultados:

- a) Como estratégia de replicação, amostras previamente genotipadas de 100 controles foram incluídas novamente nos diferentes experimentos de genotipagem ao longo deste estudo. Concordância entre replicatas e duplicatas foi entre 97-99% para todos os ensaios.
- b) Todas as reações foram repetidas pelo menos duas vezes em cada caso. Os homozigotos foram objeto de especial atenção, no intuito de eliminar o viés por sub-detecção de alelos.
- c) A utilização da metodologia para amplificação da posição -1082 e do microsatélite IL10.G permitiu a dupla checagem dos resultados por métodos diferentes, AS-PCR e genotipagem fluorescente.
- d) Os resultados da haplotipagem experimental foram confrontados com os resultados dos SNPs e no caso de haver discordâncias, as reações foram repetidas.
- e) Para cada experimento, amostras de genótipo conhecido foram usadas como controles, incluindo, 2 homozigotos do alelo de maior frequência, 2 do alelo variante, 2 heterozigotos e 2 controles sem DNA.
- f) A hipótese do equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W) foi periodicamente testada através das análises das frequências genóticas pelo teste do χ^2 . Desvios do equilíbrio H-W são considerados evidência de erros de genotipagem (Balding, 2008).
- g) Nos casos em que um resultado não foi obtido por falta de amplificação da amostra (“missing data”), foram realizados testes estatísticos não paramétricos para cada posição genotipada, em que o dado ausente foi incluindo como variável e comparado com os dados obtidos, a fim de detectar eventuais padrões de não amplificação associados ao tipo de amostra. O resultado esperado foi a não rejeição

da hipótese nula de não diferença entre os dados ausentes vs. presentes (Balding, 2006).

- h) Em um grupo de 30 pacientes foi possível obter DNA tanto de tumor a fresco quanto de FIP. Nestes casos, as reações de PCR foram realizadas nas duas amostras com o objetivo de se testar a amplificabilidade das amostras FIP.

4.12 Eletroforese e avaliação dos produtos de PCR

4.12.1 Preparação de géis de agarose

Os géis de agarose foram confeccionados com tampão TAE e quantidades variáveis de agarose (0,8-2,5%) de acordo com o tamanho dos fragmentos a serem resolvidos (Sambrook et al, 1989). Para permitir a visualização sob luz UV foi adicionado 0,5 µg/ml brometo de etídeo (Sigma). Como marcadores de peso molecular foram usados “100 bp ladder” e “50 bp ladder”, (Invitrogen).

4.12.2 Preparação e coloração de géis de poliacrilamida

Géis não desnaturantes com concentração de 8% de acrilamida foram preparados a partir de uma solução de acrilamida-bisacrilamida 30% (Anexo 1.E) e tampão TAE. Como catalisadores da polimerização foram adicionados persulfato de amônio (Biosolve) e TEMED (Sigma) a uma concentração de 0,001% (v/v) e 0,067% (v/v), respectivamente.

Os produtos separados nos géis de poliacrilamida foram revelados mediante a coloração com nitrato de prata. Os géis foram fixados por 10 minutos em solução aquosa contendo 10% (v/v) metanol (Merk) e 0,5% (v/v) ácido acético glacial (Merk). Foram então incubados por 10 minutos em solução aquosa 3% (v/v) metanol, 0,15% (v/v) ácido acético glacial e 0,7% (p/v) de NO₃Ag (Vetec). Os produtos foram finalmente revelados

até o aparecimento nítido das bandas com solução aquosa de 30% (v/v) NaOH (Vetec) e 0,3% (v/v) formaldeído (Merk).

4.12.3 Eletroforese

Para eletroforese em géis de agarose, foram utilizadas cubas submarinas de tipo de tipo Horizon 11,14 (cuba de 11 x 14 cm) e Horizon 58 (minigel, 6.5 x 8 cm) com fonte de corrente contínua Life Tech Model 250 (Life Technology). Os resultados das corridas eletroforéticas foram visualizados com a ajuda de um transiluminador UV de onda curta (TFX-20M, Vilber Lourmat).

Para eletroforese em géis de poliacrilamida foram utilizados sistemas verticais modelo V16 com fonte de corrente contínua. As corridas eletroforéticas procederam a uma velocidade de 5 V/cm a uma potência de aproximadamente 190 volts.

4.12.4 Avaliação de ampliações de microssatélites com iniciadores fluorescentes

Uma avaliação preliminar dos produtos amplificados foi realizada em géis de agarose 2%. Subsequentemente procedeu-se a análise no seqüenciador MegaBACE 1000. Para isto, uma alíquota de 2µl de diluição aquosa 1:10 foi misturada a 0,3 µl de marcador de peso molecular MegaBACE ET 400-Rox (Amersham Biosciences) e 7,7 µl de Tween 20 (Sigma), 0,1%. As amostras foram desnaturadas a 95°C por 3 minutos e mantidas em banho de gelo até eletroforese.

As corridas eletroforéticas em MegaBACE 1000 foram realizadas na modalidade “genotipagem MegaBACE”. Foi utilizado o tampão LPA a matriz Long Read Matrix (Kit MegaBACE™ Long Read Matrix; Amersham Biosciences), com filtro GT Dye Set 2 (ET-ROX, FAM, NED, HEX) compatível com o fluorocromo utilizado. O tempo para injeção das amostras nos capilares foi de 45 segundos a 3Kv e o tempo de corrida de 75

minutos a 10 Kv. Os resultados foram analisados com o programa MegaBACE Genetic Profiler v. 2.0 (Amersham Biosciences 2002[®]).

Na análise do eletroferograma gerado pelo seqüenciador automático, os resultados foram considerados válidos quando os picos dos alelos tiveram intensidade igual ou maior que 1000 (unidade).

4.13 Análises estatísticas

As freqüências gênicas e genótípicas foram calculadas pelo método de contagem direta.

Para cada posição polimórfica, as freqüências genótípicas observadas foram comparadas com as esperadas segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg, mediante testes de χ^2 .

4.13.1 Estudo caso-controle

As diferenças nas freqüências gênicas, genótípicas e haplotípicas foram avaliadas com os testes de χ^2 de Pearson e Exato de Fisher.

Para cada SNP foram realizadas regressões logísticas não condicionais para calcular riscos, na forma de *odds ratios* (OR) com intervalos de confiança de 95% (IC 95%).

Três diferentes modelos genéticos de risco foram testados, incluindo o modelo dominante (comparação de freqüências de homozigotos do alelo mais freqüente vs. freqüência de portadores do alelo variante); o modelo recessivo (comparação de freqüências de homozigotos do alelo variante vs. freqüência de portadores do alelo mais freqüente) e o modelo aditivo (Teste de Tendências de Cochran Armitage) (Lewis, 2002; Balding, 2006; Li, 2008). O modelo multiplicativo foi testado por diferenças nas freqüências alélicas, somente se as freqüências genótípicas de casos e controles encontravam-se em equilíbrio H-W (Lewis, 2002). O modelo com o menor valor de *p* foi considerado o que melhor explica o modelo de herança e o risco conferido por cada

posição. Para a modelagem genética foi utilizado o programa R (R Development Core Team, 2006, <http://cran.r-project.org>). Os comandos utilizados na programação R para a elaboração de um modelo genético-estatístico de associação dos genótipos dos SNPs - 1082 e -592 com o LB encontram-se no Anexo I.D.

Para as comparações múltiplas não independentes foi utilizada a simulação de Montecarlo com 10.000 iterações e nível de significação de 99%.

O presente estudo tem um poder de 65% (α 0,05) para detectar “odds ratio” (OR) de duas nas análises praticadas, estimado pelo programa “Genetic Power Calculation” (Purcell et al, 2003) (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc/>).

4.13.2 Análise do desequilíbrio de ligação

Os métodos estatísticos mais utilizados são baseados nas frequências alélicas dos locus estudados e têm como componente básico, a diferença entre as frequências de haplótipos observada e esperada pelo parâmetro de DL, ou D, segundo a equação 1 (Lewontin, 1964).

$$D = p_{12} - p_1p_2 \quad (1)$$

(p e q são frequências alélicas)

Assim, as estatísticas empregadas em estudos de DL se diferenciam no modo em que empregam essa diferença. O primeiro modelo é o de desequilíbrio gamético simples, conhecido por D', que constitui na medida normalizada de D que estabelece que os alelos do locus sejam idênticos (Daly et al, 2001). O desequilíbrio gamético simples é baseado nas frequências alélicas observadas e pode ser descrito conforme as equações 2A e 2B.

$$D' = D/D_{MAX}, \text{ quando } D \geq 0 \quad (2A)$$

$$D' = D/D_{MIN}, \text{ quando } D < 0 \quad (2B)$$

Já o segundo modelo, conhecido como R^2 constitui a probabilidade de que dado dois alelos em um determinado loco sejam idênticos por descendência, então dois alelos em um segundo loco serão idênticos por descendência pela mesma via. A equação matemática que descreve essa relação utiliza o quadrado da equação 1 em relação ao quociente dos produtos das frequências alélicas observadas, conforme a equação 3 (Hill, 1974).

$$R^2 = D^2/p_1p_2q_1q_2 \quad (3)$$

Como a medida de D' não é uma medida quantitativa do DL, o teste de Fisher foi utilizado a fim de se verificar a magnitude das associações. Uma tabela foi gerada a partir da contagem de cada combinação alélica observada nos controles. As medidas de desequilíbrio de ligação D , D' e R^2 foram calculadas a partir de uma tabela de contingência 2x2 gerada de acordo com a presença ou não de cada um dos alelos (Lewontin, 1964).

4.13.3 Estudo de série de casos

A existência de associações entre polimorfismos e características clínico-patológicas e virais foi avaliada utilizando o teste exato de Fisher.

Análise da regressão logística foi usada para definir as relações de idade, status do EBV, genótipos e haplótipos. A magnitude dessas associações foi estimada com o cálculo da OR com intervalos de confiança de 95%.

4.13.4 Análise de sobrevivência

A análise de sobrevivência foi realizada pelo método de Kaplan-Meier e comparação por Log-Rank (Kaplan and Meier, 1958; Mantel 1966). A sobrevivência Global (SG) foi considerada como o período (em meses) compreendido, entre o diagnóstico e o óbito ou último seguimento do estudo. A sobrevivência livre de doença (SLD) foi considerada como

o período, em meses, compreendido entre a documentação da ausência de tumor (resposta completa) e a recaída, óbito ou último seguimento.

A fim de determinar o valor prognóstico independente das variáveis que obtiveram significação estatística com o teste de Log-Rank, análise multivariada foi realizada usando o método de regressão de risco proporcional de Cox (Cox, 1972).

As bases de dados foram criadas nos programas Excel (Microsoft). O software SPSS (Statistical Product and Services Solutions, SPSS Inc, Chicago, IL, USA) versão 13.0. foi utilizado para a análise dos dados. As hipóteses nulas (não associação) foram rejeitadas com um nível de significação $< 5\%$ (valores de $p < 0.05$).

5. RESULTADOS

5.1 Apresentação dos resultados dos polimorfismos da IL-10

Um estudo de associação genética foi realizado em um grupo de pacientes com LB utilizando-se a metodologia de caso-controle e série de casos. Foi investigada a presença de alelos, genótipos, haplótipos ou famílias de haplótipos no promotor do gene da IL-10, que pudessem conferir susceptibilidade ao desenvolvimento do LB em relação a um grupo controle de indivíduos saudáveis. A análise dos polimorfismos foi realizada através da genotipagem e haplotipagem de 3 SNPs (-1082A/G, -819C/T e -592C/A) e 2 microssatélites (IL10.G e IL10.R) localizados no promotor do gene da IL-10.

Neste capítulo, são apresentados os resultados da análise do grupo controle utilizado, seguido da caracterização dos pacientes com LB. Após, é apresentada a análise de caso-controle, seguido de uma análise de tipo série de casos, em que associações de características biológicas e clínicas dos pacientes com LB e os polimorfismos foram investigadas.

5.2 Caracterização do grupo controle

O grupo controle consistiu de um grupo de conveniência de 230 doadores de medula óssea e de sangue de cordão umbilical do Banco de Cordão Umbilical e Placentário do CEMO. Do total, 71 foram crianças, sendo 41 com idades entre 2 e 16 anos e 30 SCUP, consideradas como controles de idade zero. A idade do grupo controle total variou de 0 a 61 anos. Para efeitos de comparação com os grupos de pacientes, o grupo de crianças foi ajustado por sexo, através da seleção de amostras SCUPs. No entanto, devido à dificuldade de se obter amostras de crianças saudáveis, o pareamento por idade foi prejudicado. As características do grupo controle são apresentadas na tabela 5.1.

Tabela 5.1: Características do grupo controle

Grupos (idade em anos)	N (%)	Mediana de idade (anos)	Moda de idade (anos)	Razão de sexo (M:F)
Crianças (2-16)	41 (17,8)	11	13	1,5:1
SCUPs (0)	30 (13,1)	0	0	4:1
Total crianças (0-16)	71	11	13	2,2:1
Adultos (17-61)	159 (69,1)	36	25	1,14:1
Total (0-61)	230	28	0	1,2:1

5.3 Análise dos polimorfismos de IL-10 no grupo controle

5.3.1 Frequências alélicas e genótípicas dos SNPs do grupo controle

A detecção dos polimorfismos de IL-10 foi realizada em 230 indivíduos para o SNP -1082 e em 217 indivíduos para os SNPs -819, -592 e haplótipos. As frequências genótípicas e alélicas são descritas na tabela 5.2. A hipótese nula de que as frequências genótípicas do grupo controle encontravam-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W) não foi rejeitada (SNP -1082: $\chi^2=0,06$; gl = 1; $p = 0,79$; SNP -592: $\chi^2=0,04$; gl = 1; $p = 0,82$).

Tabela 5.2: Frequências genótípicas e alélicas dos SNPs -1082 e -592 dos controles

-1082G/A	N (%)	-592A/C**	N (%)
Genótipos		Genótipos	
A/A	107 (46,5)	C/C	93 (42,9)
G/A	101 (43,9)	A/C	97 (44,7)
G/G	22 (9,6)	A/A	27 (12,4)
Total	230 (100)		217 (100)
Alelos	Frequência	Alelos	Frequência
A	0,68	C	0,65
G	0,32	A	0,35

** O SNP -819C/T está em desequilíbrio de ligação =1 com -592A/C e tem os mesmos valores de associação.

O grupo controle foi composto não somente por crianças. Com o objetivo de descartar a presença de estratificação etária e poder comparar conjuntamente frequências gênicas e genótípicas de crianças e adultos, foram realizados testes estatísticos para verificar

possíveis associações entre grupos de idade e os polimorfismos de IL-10. A população de crianças encontrava-se em equilíbrio de H-W tanto na posição -1082G/A ($\chi^2 = 0,43$; $gl = 1$; $p = 0,51$) quanto nas posições -819C/T e -592C/A ($\chi^2 = 0,38$; $gl = 1$; $p = 0,53$), assim como a população de adultos para a posição -1082G/A ($\chi^2 = 3,1$; $gl = 1$; $p = 0,9$) e para as posições -819C/T e -592C/A ($\chi^2 = 0,4$; $gl = 1$; $p = 0,5$). As análises, descritas na tabela A.1 do Anexo II mostram que não houve associação de nenhum dos polimorfismos com adultos ou crianças no grupo controle, tornando-o apto para ser utilizado em comparações como um todo.

5.3.2 Análise dos haplótipos proximais do promotor de IL-10 no grupo controle

A combinação entre os genótipos dos SNPs em haplótipos foi confirmada experimentalmente através de 3 PCRs alelo específicas por indivíduo. Os haplótipos ACC, ATA e GCC foram detectados em homozigose e heterozigose (Figura 5.1).

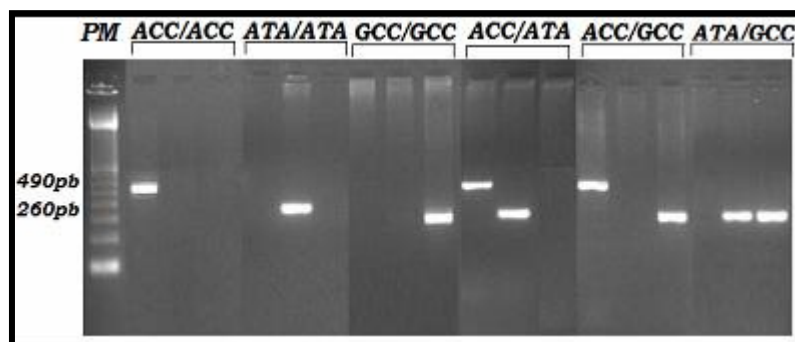


Figura 5.1: Detecção dos haplótipos de IL-10 em homo e heterozigose, por AS-PCRs cruzadas. Gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídeo. PM: Marcador de peso molecular 100 pb.

As frequências haplotípicas encontram-se descritas na tabela 5.3. As frequências haplotípicas discriminadas por grupo de idade estão listadas na tabela A.1 do Anexo II.

Tabela 5.3: Frequências haplotípicas do grupo controle

Haplótipos	Controles (%)
-1082/-819/-592	
A C C	147 (33,9)
A T A	151 (34,8)
G C C	136 (31,3)
Total (2n)	434 (100)
Combinações	N (%)
ACC/ACC	17 (7,8)
ATA/ATA	27 (12,4)
GCC/GCC	22 (10,1)
ACC/ATA	59 (27,2)
ACC/GCC	54 (24,9)
ATA/GCC	38 (17,5)
Total	217 (100)

5.3.3 Análise dos microssatélites IL10.G e IL10.R no grupo controle

Os alelos do microssatélite IL10.G variaram devido ao número de repetições CA, correspondendo o alelo G6 a 18 repetições (134 pb) e o alelo G14 a 26 repetições (150 pb). Nove alelos foram encontrados nos 168 indivíduos analisados (276 cromossomos), sendo o alelo G8 (138 pb) o mais freqüente e o alelo G14 (150 pb) o menos freqüente (Tabela 5.4). Devido ao grande número de genótipos formados por alelos de IL10.G, a tabela das frequências genotípicas do microssatélite IL10.G observadas no grupo controle é apresentada no Anexo II (Tabela A2).

Tabela 5.4: Frequências alélicas do microsatélite IL10.G nos controles

Alelos IL10.G	N (%)
G6	10 (3,6)
G7	26 (9,4)
G8	88 (31,8)
G9	15 (5,4)
G10	41 (14,8)
G11	19 (6,8)
G12	48 (17,4)
G13	27 (9,7)
G14	2 (0,7)
Total	276 (100)

O microsatélite IL10.R está localizado a -4Kb do início do sítio de transcrição da IL-10 e possui alelos variando entre 8 (alelo R1) e 11 (alelo R4) repetições de CA (Figura 5.2).

Quatro alelos de IL10.R foram encontrados em 203 indivíduos analisados (406 cromossomos). O alelo R2 (CA₁₃), representado por 197 pb, foi o mais freqüente (81,3%) e o alelo R1, de 195 pb, o menos freqüente (0,5%). Quando analisadas as freqüências genóticas, o alelo R2 em homozigose foi o mais representado (67,5%). Não foram encontrados indivíduos homozigotos para o alelo R1 nem para o alelo R4. As freqüências alélicas e genóticas do microsatélite IL10.R observadas para o grupo controle estão listadas na tabela 5.5.

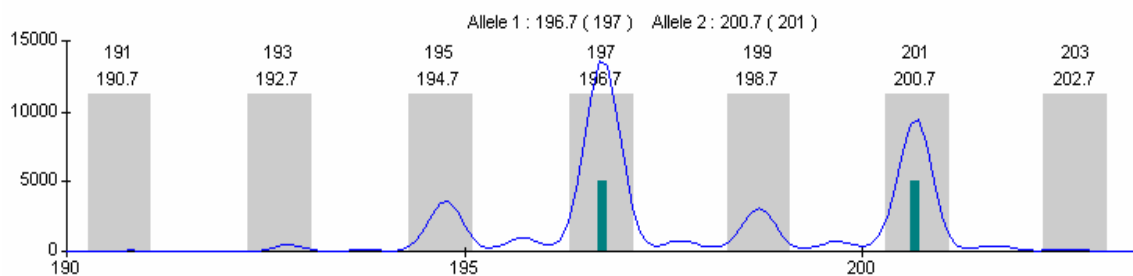


Figura 5.2: Detecção dos alelos do microsatélite IL10.R. Electroferograma obtido com o programa Genetic Profiler, em um seqüenciador automático MegaBace 1000. É mostrado um caso heterozigota para os alelos R2 (197 pb) e R4 (201 pb).

Tabela 5.5: Frequências alélicas e genóticas do microsatélite IL10.R nos controles

Alelos IL10.R	N (%)
R1	2 (0,5)
R2	330 (81,3)
R3	66 (16,2)
R4	8 (2,0)
Total	406 (100,0)
Genótipos IL10.R	N (%)
R1/R2	1 (0,5)
R1/R3	1 (0,5)
R2/R2	137 (67,5)
R2/R3	47 (23,2)
R2/R4	8 (3,9)
R3/R3	9 (4,4)
Total	203 (100,0)

5.3.4 Análise de ligação entre os alelos dos microsatélites IL10.R/IL10.G

As frequências das combinações observadas entre os alelos de IL10.R e IL10.G no mesmo cromossomo puderam ser calculadas nos casos em que os alelos de um dos loci dos microsatélites (IL10.R ou IL10.G) encontravam-se em homozigose. As combinações de alelos foram obtidas baseadas no alelo R2 em homozigose, escolhido para a avaliação do DL devido a sua maior frequência. Desta forma, foram calculadas as frequências da combinação IL10.R/IL10.G de 234 cromossomos.

Observou-se uma maior frequência da combinação de alelos R2G8 (24,2%), e menor frequência das combinações R4G7, R4G8, R3G9 e R3G13 (0,4%) (Figura 5.3).

A tabela 5.6 mostra as frequências das combinações de R2/IL10.G, bem como os valores de D' e R^2 . A metodologia empregada na obtenção destes valores é apresentada na tabela B.1 do Anexo II.

Observou-se um desequilíbrio de ligação perfeito ($D'=1$) do alelo R2 com os alelos G6, G11, G12 e G14 nos controles (tabela 5.6).

Tabela 5.6: Freqüências de IL10.R/IL10.G observadas no grupo controle

IL10.R/IL10.G	N	%	D'	R ²	p#
R2G6	7	3,0	1,00	0,005	0,35
R2G7	17	7,3	0,21	0,0007	0,1
R2G8	57	24,4	-0,16	0,12	0,32
R2G9	10	4,3	0,50	0,002	0,49
R2G10	29	12,4	0,27	0,002	0,47
R2G11	20	8,5	1,00	0,016	0,03
R2G12	46	19,7	1,00	0,04	0,00047
R2G13	22	9,4	0,77	0,11	0,09
R2G14	2	0,9	1,00	0,0016	0,63
Total	234	100			

Teste Exato de Fisher

Uma associação estatisticamente significativa do alelo R2 com G11 ($p= 0,03$) e com G12 ($p= 0,00047$) foi confirmada no grupo controle. A partir do DL perfeito e estatisticamente significativo encontrado entre R2 e G12, há uma tendência indicando que os 12 indivíduos classificados como C8 (Tabela B.2, Anexo II), segregavam estes dois alelos como um haplótipo (no mesmo cromossomo). A medida de D' provavelmente encontra-se superestimada nos alelos mencionados com perfeito DL, mas sem associação estatisticamente significativa, devido ao pequeno número de alelos analisados.

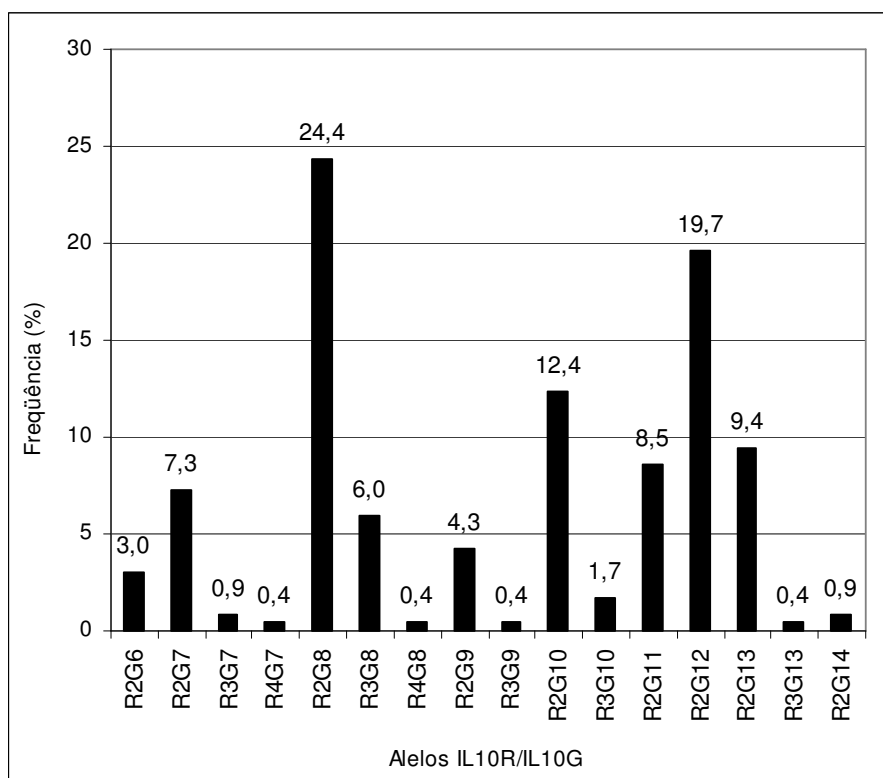


Figura 5.3: Frequências alélicas IL10.R/IL10.G nos controles

5.3.5 Desequilíbrio de ligação entre IL10.G e -1082 nos controles

O microsatélite IL10.G encontra-se à 118 pb da posição -1082. No intuito de se analisar como os alelos dos dois loci se comportam na população saudável, foi analisado o DL entre eles.

O DL entre os alelos de IL10.G e os alelos de IL10-1082A/G pôde ser calculado já que a região amplificada especificamente pelos iniciadores utilizados na reação de AS-PCR flanqueia também o microsatélite IL10.G permitindo a identificação simultânea dos alelos de IL10.G e -1082A/G localizados em *cis*.

Foram calculadas as frequências de cada combinação dos alelos de IL10.G/-1082 bem como as medidas de desequilíbrio de ligação D' , R^2 e Fisher (tabela B.3, Anexo II). Os valores de D' mostraram que há desequilíbrio de ligação entre os alelos G9 ($D'=0,38$), G10 ($D'=0,33$) e o alelo -1082G (Teste exato de Fisher, $p=0,006$ e $p=0,0003$,

respectivamente). Por outro lado, G12 e G13 estiveram mais ligados ao alelo -1082A ($p=0,01$; $p=0,02$, respectivamente) (Figura 5.4).

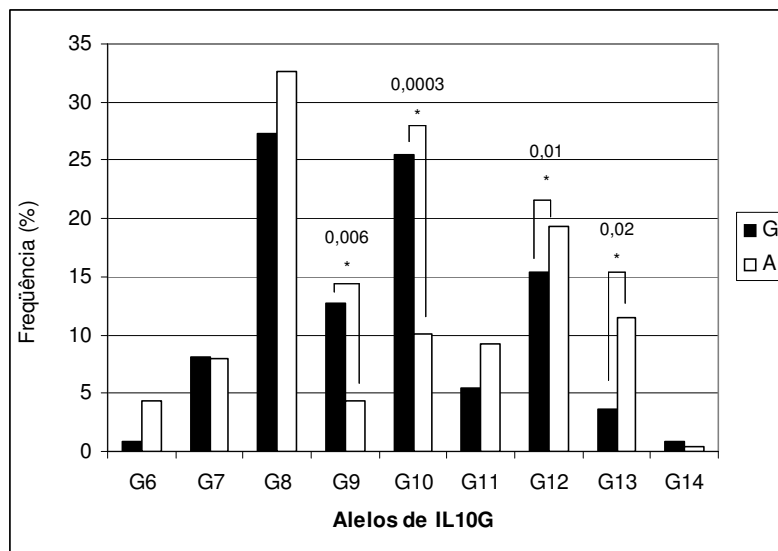


Figura 5.4: Frequências dos alelos de IL10.G ligados aos alelos do SNP-1082.

5.4 Estudos de associação entre polimorfismos do promotor de IL-10 e o linfoma de Burkitt

5.4.1 Caracterização dos pacientes estudados

Foram incluídos 62 pacientes com LB, com idades entre 2 e 16 anos, 43 (69,4%) do sexo masculino e 19 (30,6%) feminino (Razão entre sexos M:F, 2,26). Os pacientes foram classificados de acordo com a faixa etária em: grupo de idade I (Gr I), crianças de 1 a 4 anos (41,9%); II de 5 a 9 anos (45,2%) e III de 10 a 14 anos (12,9%). A mediana de idade foi de 5 anos (2-14 anos).

Informação clínica foi obtida para 54 pacientes, sendo a doença avançada mais freqüente, com 38 (70,3%) pacientes nos estadios III/IV e 32 (59,3%) no grupo de risco 3 (GR3) (Tabela 5.7).

Tabela 5.7: Caracterização dos pacientes com LB.

Variável	Categoria	N (%)
Sexo	Masculino	43 (69,4)
	Feminino	19 (30,6)
Idade	0-4 (I)	26 (41,9)
	5-9 (II)	28 (45,2)
	10-14 (III)	8 (12,9)
Sub-total		62 (100)
Estadiamento	I	6 (11,1)
	II	10 (18,5)
	III	24 (44,4)
	IV	14 (25,9)
Grupo de Risco	1	3 (5,6)
	2	19 (35,2)
	3	32 (59,3)
Total		54 (100)

5.4.2 Detecção e tipificação do vírus Epstein-Barr

O EBV foi detectado por EBER-ISH em 33 (54,1%) dos 61 pacientes com LB analisados (figura 5.5).

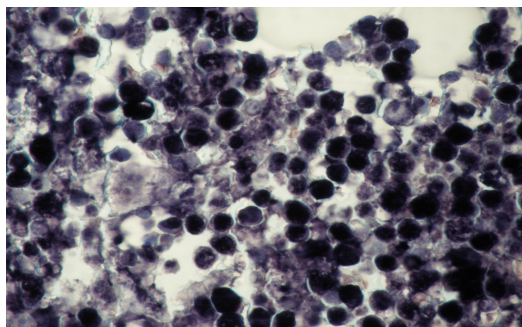


Figura 5.5: Detecção do EBV na célula tumoral de Burkitt por hibridização in situ para os RNAs virais.

Uma análise da presença do EBV com relação aos grupos de idade no LB mostrou maior frequência de associação do vírus com o grupo de crianças de 0 a 4 anos (19/26, 73%), assim como uma baixa frequência na classe de idade de 10-14 anos (1/8, 12,5%) ($p=0,008$) (Figura 5.6).

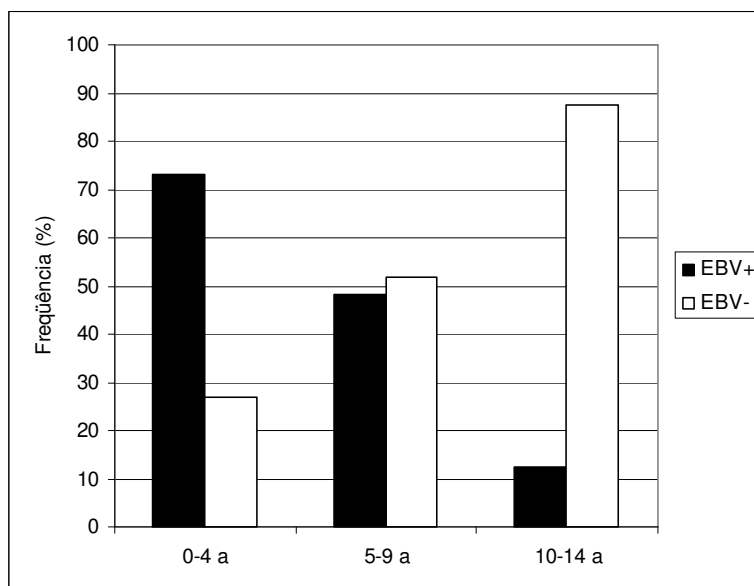


Figura 5.6: Associação do EBV com classes de idade no linfoma de Burkitt.

A tipificação viral foi realizada por PCRs para os genes EBNA2 e EBNA3C. O EBV1 foi o mais prevalente, sendo encontrado em 24/30 (80%) dos casos de LB. Superinfecção (apresentação dos dois tipos virais em uma mesma amostra tumoral) não foi observada nas amostras estudadas. Não foi observada associação entre a presença do EBV e tipos virais com sexo, estadiamento clínico e níveis anormais de LDH nos casos estudados.

5.4.3 Estudo de caso-controle

5.4.3.1 Frequências alélicas e genotípicas dos SNPs -1082, -819 e -592

Uma comparação das frequências genotípicas e alélicas das posições -1082, -819 e -592 em pacientes com LB e controles encontra-se na tabela 5.8. A análise das frequências dos polimorfismos citados acima mostrou que a população de pacientes encontrava-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg tanto na posição -1082A/G ($\chi^2 = 1,81$; gl = 1; $p = 0,17$) quanto nas posições -819C/T e -592C/A ($\chi^2 = 0,02$; gl = 1; $p = 0,86$).

As frequências genóticas do SNP -1082A/G foram significativamente diferentes entre casos e controles, com uma super-representação do genótipo -1082GG nos pacientes com LB (Teste exato de Fisher, $p=0,006$). Isto foi associado a um risco 3 vezes maior de desenvolvimento de LB ($p= 0,003$).

De fato, os resultados da modelagem genética realizada com o programa R, baseado na comparação de um modelo dominante (efeito de dose do alelo mais freqüente A), recessivo (efeito de dose do alelo menos freqüente G) e aditivo (a contribuição de cada alelo ao risco de doença é similar), mostram que o modelo recessivo é o que melhor explica o risco conferido pela posição -1082 (Tabela 5.8). Uma comparação entre LB e o grupo controles somente de crianças, apresentada no Anexo II, tabela C1, replicou os valores de associação estatística observados para a posição -1082, indicando que os resultados obtidos não foram devido a uma possível heterogeneidade do grupo controle total, não detectada com as análises iniciais.

Na posição -592C/A, as frequências genóticas, embora diferentes, não mostraram diferenças significativas entre casos e controles (Tabela 5.8). Para esta posição, as contribuições para o risco de desenvolvimento de LB se adequaram melhor ao modelo de risco aditivo dos genótipos, que mostrou maior poder estatístico (teste de Cochran-Amitage, $p = 0,045$; OR = 1,59; IC95% 1,01-2,51).

A posição -819C/T está em perfeito desequilíbrio de ligação com a posição -592A/C (DL=1) e apresenta as mesmas frequências genóticas do SNP-592A/C (Tabela 5.8).

Tabela 5.8: Comparação das frequências alélicas e genotípicas dos SNPs -1082 e -592 entre pacientes com LB e controles e avaliação do modelo genético de risco

	LB (%)	Controles (%)	P	OR (IC 95%)
-1082A/G				
A/A	21 (34,4)	107 (46,5)	0,006	0 (referência)
G/A	25 (41)	101 (43,9)		1,26 (0,66-2,39)
G/G	15 (24,6)	22 (9,6)		3,47 (1,55-7,78)
Total	61 (100)	230 (100)		
Alelos				
A	0,55	0,68	0,08	
G	0,45	0,32		
Modelo Dominante				
AA	21	107	0,11	1,65 (0,92-2,98)
GA/GG	40	123		
Modelo Recessivo				
AA/GA	43	208	0,0017	3,08 (1,49-6,40)
GG	15	22		
Modelo Aditivo				
Teste de Cochran – Armitage			0,005	
-592C/A*				
C/C	34 (56,7)	93 (42,9)	0,131	0 (referência)
C/A	22 (36,7)	97 (44,7)		1,61 (0,88-2,95)
A/A	4 (6,7)	27 (12,4)		2,46 (0,80-7,57)
Total	60 (100)	217 (100)		
Alelos				
C	0,75	0,65	0,3	1,6 (0,87-2,97)
A	0,25	0,35		
Modelo Dominante				
AA	4	27	0,25	0,5 (0,17-1,50)
CA/CC	56	190		
Modelo Recessivo				
AA/CA	26	124	0,057	1,74 (0,98-3,1)
CC	34	93		
Modelo Aditivo				
Teste de Cochran – Armitage			0,045	

*O SNP -819C/T está em desequilíbrio de ligação =1 com -592A/C e tem os mesmos valores de associação.

Assim, foram verificadas diferenças no modelo genético de ambas as posições (-1082 e -592) no que diz respeito às interações alélicas associadas a risco (Figura 5.7).

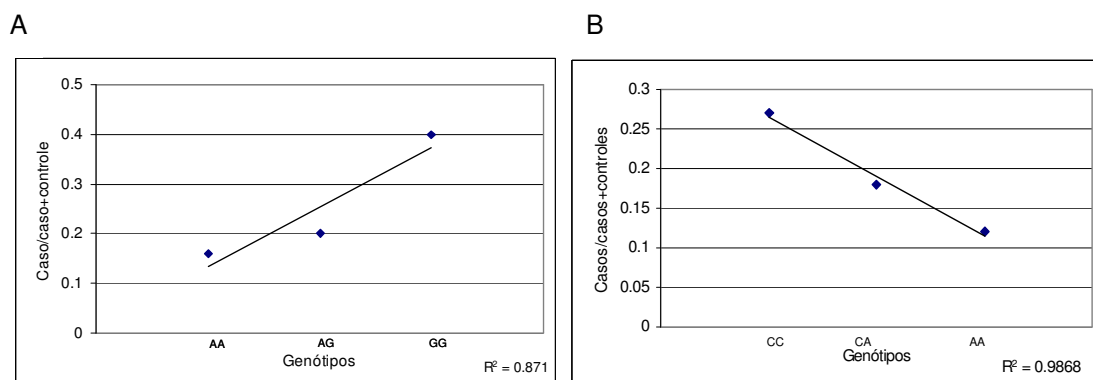


Figura 5.7: Análise da contribuição de efeitos aditivos ao risco conferido pelos SNPs proximais de IL10. Gráfico do teste de Cochran-Amitage. (A) SNP -1082 e (B) SNP -592. Os pontos indicam a proporção de casos, entre casos e controles combinados, em cada um dos três genótipos, ajustados pela linha de mínimos quadrados.

5.4.3.2 Análise dos haplótipos proximais do promotor de IL-10

Ao todo, foram analisados 552 cromossomos, sendo 118 de pacientes e 434 de controles. As frequências haplotípicas do grupo de pacientes foram: ACC = 29,7%; ATA = 24,6%; GCC = 45,7%. Quando comparados, os casos mostraram maior representação do haplótipo GCC que os controles ($p = 0,011$), tabela 5.9.

A comparação das frequências das combinações de haplótipos também mostrou diferenças significativas entre casos e controles ($p = 0,037$) devido a maior representação de GCC/GCC nos pacientes (25,4%) do que nos controles (10,1%), em concordância para o modelo recessivo proposto para a posição -1082 (Tabela 5.9).

Tabela 5.9: Comparação das frequências de haplótipos proximais de IL-10 e suas combinações entre pacientes com linfoma de Burkitt e controles

Haplótipo	LB (%)	Controles (%)	<i>p</i> *
-1082/-819/-592			
A C C	35 (29,7)	147 (33,9)	0,011
A T A	29 (24,6)	151 (34,8)	
G C C	54 (45,7)	136 (31,3)	
Total (2n)	118 (100)	434 (100)	
Combinações			
ACC/ACC	6 (10,2)	17 (7,8)	0,037
ATA/ATA	4 (6,8)	27 (12,4)	
GCC/GCC	15 (25,4)	22 (10,1)	
ACC/ATA	10 (16,9)	59 (27,2)	
ACC/GCC	13 (22)	54 (24,9)	
ATA/GCC	11 (18,6)	38 (17,5)	
Total (n)	59 (100)	217 (100)	

*Teste Exato de Fisher

Análise de regressão logística das combinações de haplótipos presentes por indivíduo permitiu verificar que a presença de GCC/GCC esteve associada a um aumento do risco de desenvolvimento do linfoma de até três vezes (OR 3,02 95%IC 1,45-6,29, $p=0,004$). A figura 5.8 representa a diferença observada na frequência de GCC/GCC entre pacientes e controles.

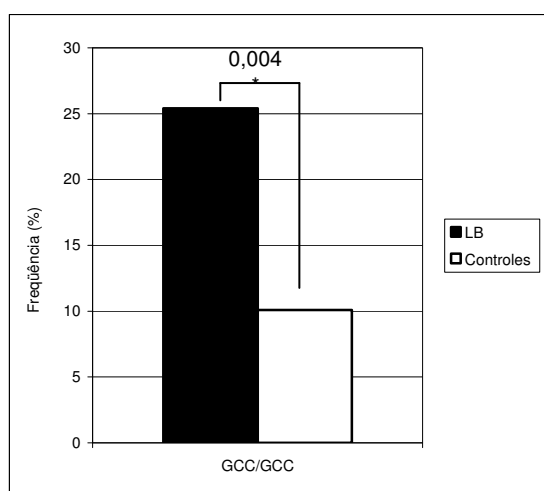


Figura 5.8: Comparação das frequências de GCC/GCC em casos e controles.

5.4.3.3 Análise dos microssatélites IL10.G e IL10.R

IL10.G

As frequências dos alelos de IL10.G nos casos LB e controles encontram-se descritas na tabela 5.10. Não houve diferenças estatísticas entre os pacientes com LB e controles ($p=0,69$, simulação de Monte Carlo).

Tabela 5.10: Comparação das frequências alélicas do microssatélite IL10.G

Alelos IL10.G	Controles (%)	LB (%)	P*
G6	11 (3,1)	2 (1,8)	0,69
G7	26 (7,5)	4 (3,7)	
G8	106 (30,6)	31 (28,7)	
G9	27 (7,8)	13 (12)	
G10	51 (14,7)	14 (12,9)	
G11	29 (8,3)	8 (7,4)	
G12	61 (17,6)	21 (19,4)	
G13	33 (9,5)	14 (12,9)	
G14	2 (0,6)	1 (0,9)	
Total (2n)	346 (100)	108 (100)	

*Significação exata com 99% de nível de confiança, obtida por simulação de Montecarlo, baseado em 10.000 replicações.

IL10.R

Três alelos (R2, R3 e R4), do microssatélite IL10.R, foram detectados nos pacientes em que foi encontrada maior frequência do alelo R2 (83,3%). O alelo R2 esteve presente em todos os pacientes, seja em homozigose (66,7%) ou heterozigose (33,4%).

As frequências dos alelos de IL10.R nos casos com LB e controles encontram-se descritas na tabela 5.11. As comparações das frequências de alelos e genótipos de IL10.R entre casos e controles não mostraram diferenças significativas ($p = 0,75$ e $p = 0,64$, respectivamente).

Tabela 5.11: Comparação das frequências alélicas e genóticas do microssatélite IL10.R

Alelos	LB (%)	Controles (%)	P*
R1	0 (0)	2 (0,47)	0,75
R2	85 (83,3)	345 (81,7)	
R3	14 (13,7)	67 (15,8)	
R4	3 (2,9)	8 (1,8)	
Total (2n)	102 (100)	422 (100)	
Genótipos			
R1/R2	0 (0)	1 (0,5)	0,641
R1/R3	0 (0)	1 (0,5)	
R2/R2	35 (67,3)	137 (67,5)	
R2/R3	14 (26,9)	47 (23,2)	
R2/R4	3 (5,8)	8 (3,9)	
R3/R3	0 (0)	9 (4,4)	
Total	52 (100)	203 (100,0)	

*Significação exata com 99% de nível de confiança, obtida por simulação de Montecarlo, baseado em 10.000 replicações.

A análise de ligação entre os microssatélites IL10.G e IL10.R não foi realizada, no grupo de pacientes, devido ao baixo número amostral, que impôs limitações estatísticas a este tipo de estudo.

5.4.3.4 Análise das famílias de IL-10

As famílias de IL-10 foram reconstruídas de acordo com Eskdale et al, (1999) baseado na combinação dos haplótipos proximais (ACC, ATA ou GCC) com os alelos do microssatélite IL10.R. Essas famílias são: IL10.01: R3-GCC, IL10.02: R2-ACC, IL10.03: R2-GCC e IL10.04: R2-ATA. Todas elas foram identificadas nos indivíduos estudados (casos e controles). As frequências das famílias de IL-10 foram analisadas em 50 pacientes e 188 controles (100 e 376 cromossomos em cada grupo, respectivamente). A distribuição de frequências nos dois grupos está descrita na tabela 5.12, mostrando que não foram observadas diferenças significativas ($p=0,079$). A família IL10.03 esteve super-representada no LB (30% vs. 19% nos controles), porém sem diferenças significativas ($p=0,054$).

Assim como Eskdale et al (1999), nós também identificamos combinações mais raras na população e as classificamos como IL10.05 (R3-ATA), IL10.06 (R3-ACC) e IL10.07 (R4-GCC). Essas famílias foram excluídas da análise caso-controle, mas suas frequências foram calculadas (tabela 5.12). Somente a família IL10.06 (R3-ACC) não foi encontrada nos pacientes. Ainda, é importante mencionar que, no grupo controle, 7 indivíduos não puderam ser classificados quanto as famílias de IL-10. Dos 7 indivíduos inclassificáveis no grupo controle, 5 foram portadores dos genótipos R2/R3-ACC/ATA, 1 portador de R1/R2-ACC/ATA e 1 portador de R1/R3 – ACC/GCC.

Tabela 5.12: Comparação das frequências das famílias de IL-10 em casos e controles

Famílias de IL-10	Controles (%)	LB (%)	P*
IL10.01	46 (12,23%)	12 (12%)	0,079
IL10.02	124 (32,97%)	31 (31%)	
IL10.03	71 (18,88%)	30 (30%)	
IL10.04	120 (31,91%)	23 (23%)	
Total (2n)	361/376	96/100	
Famílias raras			
IL10.05	6 (1,6%)	1 (1%)	
IL10.06	2 (0,5%)	0	
IL10.07	7 (1,8%)	3 (3%)	
Total (2n)	15/376	4/100	

*Teste Exato de Fisher

5.4.4 Estudo de série de casos: Análise dos polimorfismos de IL-10 em relação às características clínico-epidemiológicas dos pacientes com LB

5.4.4.1 Polimorfismos de IL-10 e EBV

Os pacientes com LB foram classificados nos sub-grupos EBV+ (N=32) e EBV- (N=28), e comparados entre si e com o grupo controle em relação aos genótipos de -1082. As frequências observadas por genótipo para cada sub-grupo e para os controles são apresentadas na tabela 5.13 e na figura 5.9.

A comparação estatística indicou que não houve diferenças significativas entre as frequências genotípicas dos casos EBV+ e EBV-. Quando estes sub-grupos foram comparados com os controles, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o sub-grupo EBV+ e os controles. Tais diferenças se deveram não apenas à maior frequência do genótipo GG nos pacientes (25% vs. 9,6%), mas também à menor frequência de AA (28,1% vs. 46,5%, Teste exato de Fisher, $gl=1$, $p=0,018$). A frequência do genótipo GG foi igual nos dois sub-grupos (25%), entretanto, o sub-grupo EBV- mostrou maior frequência de AA (39,3%) que o grupo EBV+.

Tabela 5.13: Comparação das frequências genotípicas de -1082 A/G entre linfomas de Burkitt EBV+ e EBV- e controles

-1082 A/G	EBV +	EBV -	Controles
AA	9 (28,1%)	11 (39,3%)	107 (46,5%)
AG	15 (46,9%)	10 (35,7%)	101 (43,9%)
GG	8 (25,0%)	7 (25,0%)	22 (9,6%)
Total	32	28	230

Comparações entre grupos*	
EBV+ vs. EBV-	$p = 0,605$
EBV+ vs. Controles	$p = 0,018$
EBV- vs. Controles	$p = 0,051$

* Teste de χ^2 , 2 gl

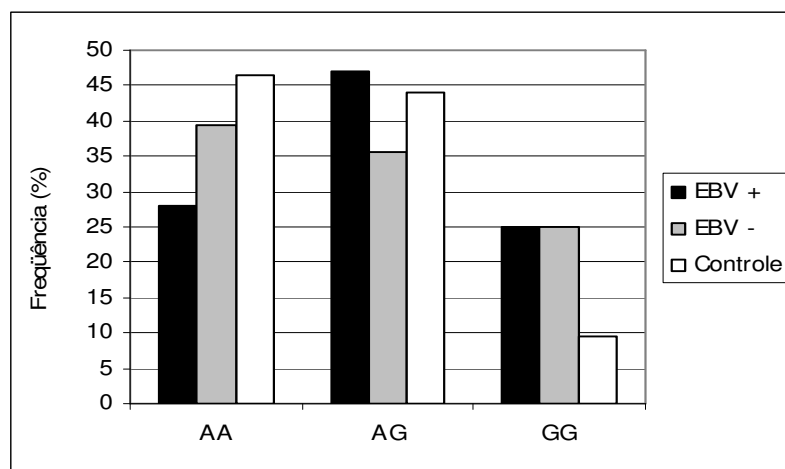


Figura 5.9: Frequências genotípicas de -1082 dos linfomas de Burkitt EBV+ e EBV- comparados aos controles

A análise dos demais polimorfismos também não mostrou diferenças significativas entre os subgrupos analisados.

5.4.4.2 Polimorfismos de IL-10 e estrutura etária do LB

Como mostrado anteriormente, uma das características do grupo com LB é o predomínio de associação do EBV com crianças de idades menores. Esta característica mostrou a necessidade da avaliação dos polimorfismos de IL-10 não somente com relação à presença do EBV, mas também à estrutura etária do grupo com LB. A análise mostrou que os genótipos do SNP -1082A/G encontraram-se distribuídos não ao acaso nos grupos de idade, com -1082GG mais freqüente em crianças maiores de 10 anos (6/8, 75%) (Teste de χ^2 , 2gl, $p=0,001$) (Figura 5.10).

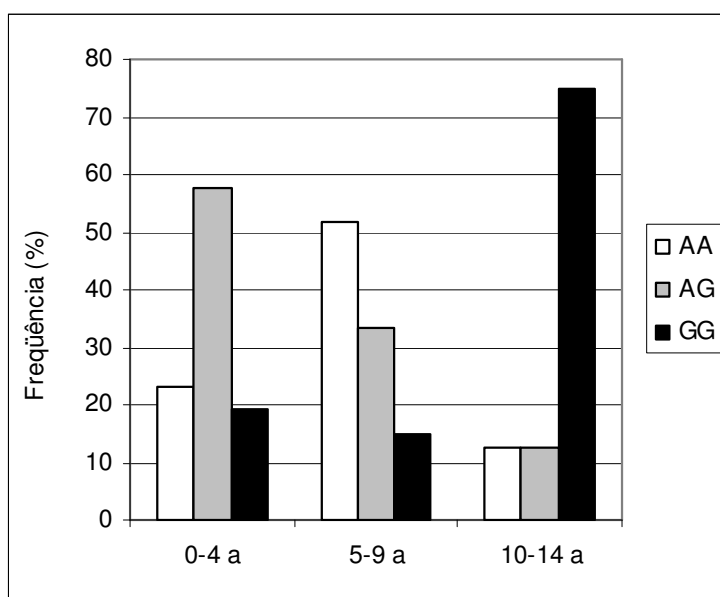


Figura 5.10: Frequências genotípicas de -1082 de acordo com classe de idade no Linfoma de Burkitt

Além disso, as frequências dos haplótipos também mostraram diferenças com relação aos grupos etários (Tabela 5.14). Enquanto que ACC teve distribuição similar nos grupos 0-4 anos (16/52, 30,7%) e de 5-9 anos (19/50, 38%), nenhum haplótipo ACC foi

encontrado em crianças maiores de 10 anos (0/16) ($p=0.01$). A presença do haplótipo GCC e a combinação GCC/GCC seguiram distribuições similares às do genótipo -1082GG nos diferentes grupos de idade, com frequência significativamente maior nas crianças >10 anos (13/16, 81,3%; 6/8, 75%, respectivamente).

Tabela 5.14: Frequências haplotípicas em relação aos grupos de idade.

Haplótipo	0 – 4 a (%)	5 – 9 a (%)	10 – 14 a (%)	P*
-1082/-819/-592				
A C C	16 (30,7%)	19 (38%)	0 (0%)	0,021
A T A	11 (21,1%)	13 (26%)	3 (18,7%)	
G C C	25 (44,3%)	18 (36%)	13 (81,3%)	
Total (2N)	52 (100%)	50 (100%)	16 (100%)	

*Teste Exato de Fisher

Com esses resultados decidimos investigar a interação entre o EBV e os genótipos de IL-10 e sua possível influência na estrutura etária do grupo estudado. A principal limitação para esta análise é que 30/31 LB EBV+ apresentaram idades até 10 anos, e somente 1 foi >10 anos. Já no grupo EBV-, houve 20 crianças \leq 10 anos e 7 > 10 anos. Isto é, dos 8 casos >10 anos, 7 eram EBV-. Isto limitou o poder estatístico das técnicas utilizadas.

Em geral, as análises não paramétricas combinadas por subtipo viral, classe de idade e genótipos/haplótipos mostraram que o grupo EBV+ era bastante homogêneo quanto à distribuição dos genótipos por idade (inclusive considerando a classe unitária de >10 anos), enquanto que a maior variação foi observada no grupo EBV-, para ACC e GCC/GCC.

Assim, seguindo o modelo genético determinado (dominância do alelo -1082A), as distribuições de ACC (2N= 29) e GCC/GCC (N=15) nos subtipos EBV+ e EBV- em relação às classes de idade foram analisadas. Foi observada uma distribuição desigual

destes polimorfismos em relação à idade e EBV (Figura 5.11 A e B). Análises multivariadas (vide abaixo) determinaram um papel para EBV e GCC/GCC na estruturação etária do LB (Figura 5.11 C e D, Figura 5.12 e Tabela 5.15). A combinação destes fatores permitiu a classificação correta de 98% dos casos com idade ≤ 10 anos (EBV+ e GCC/GCC-) e 75% dos casos com idade até 10 anos (EBV- e GCC/GCC+) (tabela de classificação da regressão logística multinomial mostrada na Tabela 5.15). A inclusão de ACC não melhorou o modelo preditivo de idade.

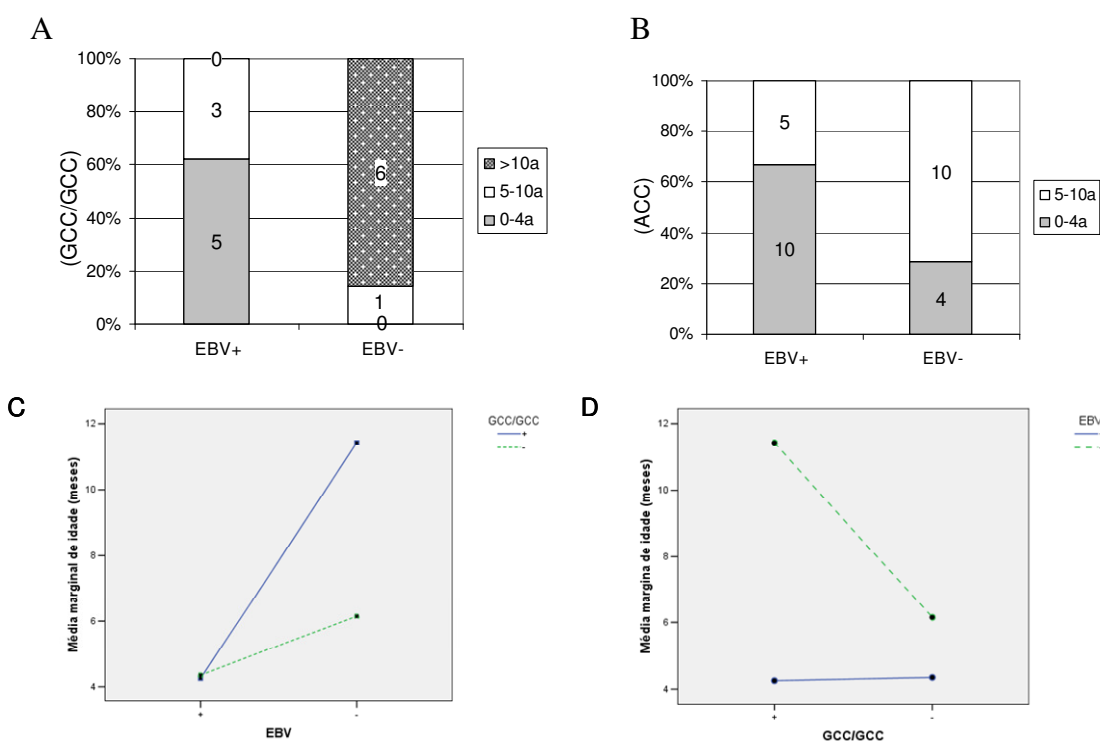


Figura 5.11: Análise da estruturação etária dos LB em relação ao EBV, polimorfismos de IL-10 e idade. **A.** Freqüências de GCC/GCC por subgrupo EBV e classe de idade: 62.5% dos portadores de GCC/GCC EBV+ vs. 0% GCC/GCC EBV- encontram-se na classe de menor idade (0-4), enquanto que 86% dos portadores de GCC/GCC EBV- vs 0% GCC/GCC EBV+ encontram-se na classe de >10 anos. **B.** Freqüências de ACC, por subgrupo EBV e classe de idade, mostrando que este haplótipo não está representado na classe de idade >10 anos e se encontra mais representada entre as crianças de 0-4 anos nos casos EBV+ (67%) e entre as crianças de 5-10 anos no grupo EBV- (71%). **C. e D.** Variação da média de idade dos pacientes com LB de acordo com a presença ou ausência conjunta de EBV e GCC/GCC. A variação não paralela das retas indica interação entre os fatores. Note-se que não houve diferença de idade entre portadores e não portadores de GCC/GCC no grupo EBV+, mas a diferença foi marcante entre portadores de GCC/GCC EBV- (média 11,4 vs 6,1 nos GCC/GCC-). A característica paramétrica desta análise (ANOVA) limita o valor estatístico do teste de significação.

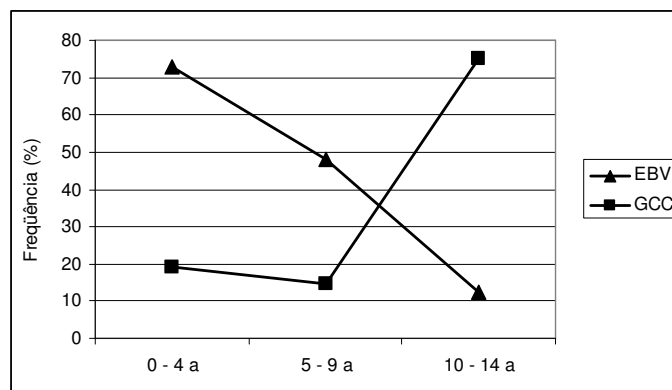


Figura 5.12: Distribuição das frequências dos casos com LB com relação ao status do EBV e a presença do genótipo GCC/GCC, por grupos de idade.

A contribuição relativa do EBV e de GCC/GCC na estruturação etária do LB foi modelada mediante regressão logística multinomial, com idade $\leq/ > 10$ anos como variável dependente. A tabela 5.15 mostra como a presença de EBV e de GCC/GCC influenciam a estrutura etária do grupo LB.

Tabela 5.15: Análise multivariada dos fatores influenciando a estrutura etária do LB

	Coefficiente β	HR	IC 95%	p
<i>Idade >10 anos</i>				
EBV+	-3,074	0,046	0,004 – 0,574	0,017
EBV-	0			
GCC/GCC+	3,255	25,9	3,13 – 214,5	0,03
GCC/GCC-	0			
<i>Idade ≤ 10 anos</i>				
EBV+	3,074	26,3	3,3 - 200	0,017
EBV-	0			
GCC/GCC+	-3,255	0,046	0,003 - 0,58	0,03
GCC/GCC-	0			

Nenhuma outra associação foi encontrada com relação às características clínicas dos pacientes e os genótipos de -1082A/G bem como os genótipos de -592C/A e -819 C/T, que também não mostraram associação com a estrutura etária e com EBV.

5.4.4.3 Avaliação da resposta terapêutica nos pacientes com LB

A análise de sobrevida foi restrita a um grupo de 39 pacientes tratados uniformemente como o protocolo LNH-98 (Klumb et al, 2004).

As características clínico-demográficas, assim como a análise de sobrevida, encontram-se descritas na tabela 5.16. O grupo esteve composto por uma maioria de crianças em estádios avançados (27/39, 69,2%). O tempo de acompanhamento variou de 12 a 126 meses (mediana de 72 meses).

A sobrevida global (SG) foi de 84,6%, variando de 137 a 177 meses e a sobrevida livre de doença (SLD) foi de 79,5%, variando de 121 a 165 meses (Figura 5.13 A e B). Dos 39 pacientes estudados, 5 progrediram durante o tratamento, 3 recaíram ao término do tratamento e 31 encontram-se em remissão completa até a data do último seguimento.

Dos 8 pacientes que sofreram recaída, 6 foram a óbito. Uma descrição dos eventos (recaída, óbito) de acordo ao estadiamento e grupo de risco é apresentada na Tabela D1, do Anexo II.

Nenhuma das características clínicas analisadas foi associada a um impacto prognóstico significativo no grupo estudado. O grupo de risco foi o que melhor distinguiu os pacientes com melhor e pior resposta terapêutica ($p=0.097$). Os pacientes no GR2 tiveram maior SG e SLD, quando comparados com o GR3 (Tabela 5.16). O GR1 foi excluído da análise devido ao baixo número de pacientes.

Tabela 5.16: Análise de sobrevida nos pacientes com LB.

Variável (N)	SG	Eventos/N	Tempo (Meses)*	p	SLD	Eventos/N	Tempo (Meses)*	p
Gr. Idade (39)								
≤10 a	85,3%	5/34	158,7	0,71	82,4%	6/34	147,9	0,25
>10 a	80%	1/5	97		60%	2/5	77	
Sexo (39)								
Masculino	82,1%	5/28	152,7	0,48	75%	7/28	134,9	0,25
Feminino	90,9%	1/11	112		90,9%	1/11	109,2	
Estad. (39)								
I/II	91,7%	1/12	116,8	0,39	83,3%	2/12	106,4	0,624
III/IV	81,5%	5/27	151,6		80,8%	6/27	139,7	
GR (37)#								
2	92,9%	1/14	172,2	0,25	92,9%	1/14	166,5	0,097
3	78,3%	5/23	96,7		69,6%	7/23	81,3	
EBV (38)								
Positivo	95,7%	1/23	177,2	0,017	91,3%	2/23	163,6	0,021
Negativo	66,7%	5/15	86,3		60%	6/15	77,7	
Família (32)								
IL10.01+	50%	4/8	63	0,005	50%	4/8	60,7	0,042
IL10.01-	91,7	2/24	112		83,3%	4/24	96,3	
IL10.G								
G12+	77,8%	2/9	98,6	0,56	55,6%	4/9	73,8	0,059
G12-	85,2%	4/27	107,6		85,2%	4/27	103,7	

*Estimação limitada ao maior tempo de sobrevida quando censurado. SG: sobrevida global; SLD: sobrevida livre de doença. Estad, estadiamento, de acordo ao sistema do St. Jude (Murphy , 1980). #GR, Grupo de Risco, de acordo com Klumb et al, 2004. Para a análise de sobrevida, somente os GR2 e GR3 foram incluídos na comparação.

Quando a resposta à terapia dos pacientes com LB foi avaliada em relação à infecção pelo EBV, foi observado que a presença do vírus esteve associada a um desfecho favorável tanto na SG (95,7% vs. 66,7%, $p=0,017$) quanto na SLD (91,3% vs. 60% $p=0,021$) (Tabela 5.16 e Figura 5.13 C e D). Quando a análise foi estratificada por grupo de risco, foi observado que a SLD não foi diferente nos pacientes EBV+ e EBV- com GR2 (N=14, 91% vs. 100%, respectivamente; $p=0,60$). Entretanto, no GR3, a SLD

dos casos EBV+ foi de 91,7% (1/12 eventos), comparada com 45,5% nos casos EBV- (6/11 eventos), ($p=0,02$).

Um fenômeno similar foi observado para a SG, onde os casos EBV+ tiveram 100% de sobrevida (0/12 eventos), comparada com 54,5% dos casos EBV- (5/11 eventos), ($p=0,01$). A SG não foi diferente nos pacientes EBV+ e EBV- com GR2 (N=14, 90% vs. 100%, respectivamente; $p=0,60$).

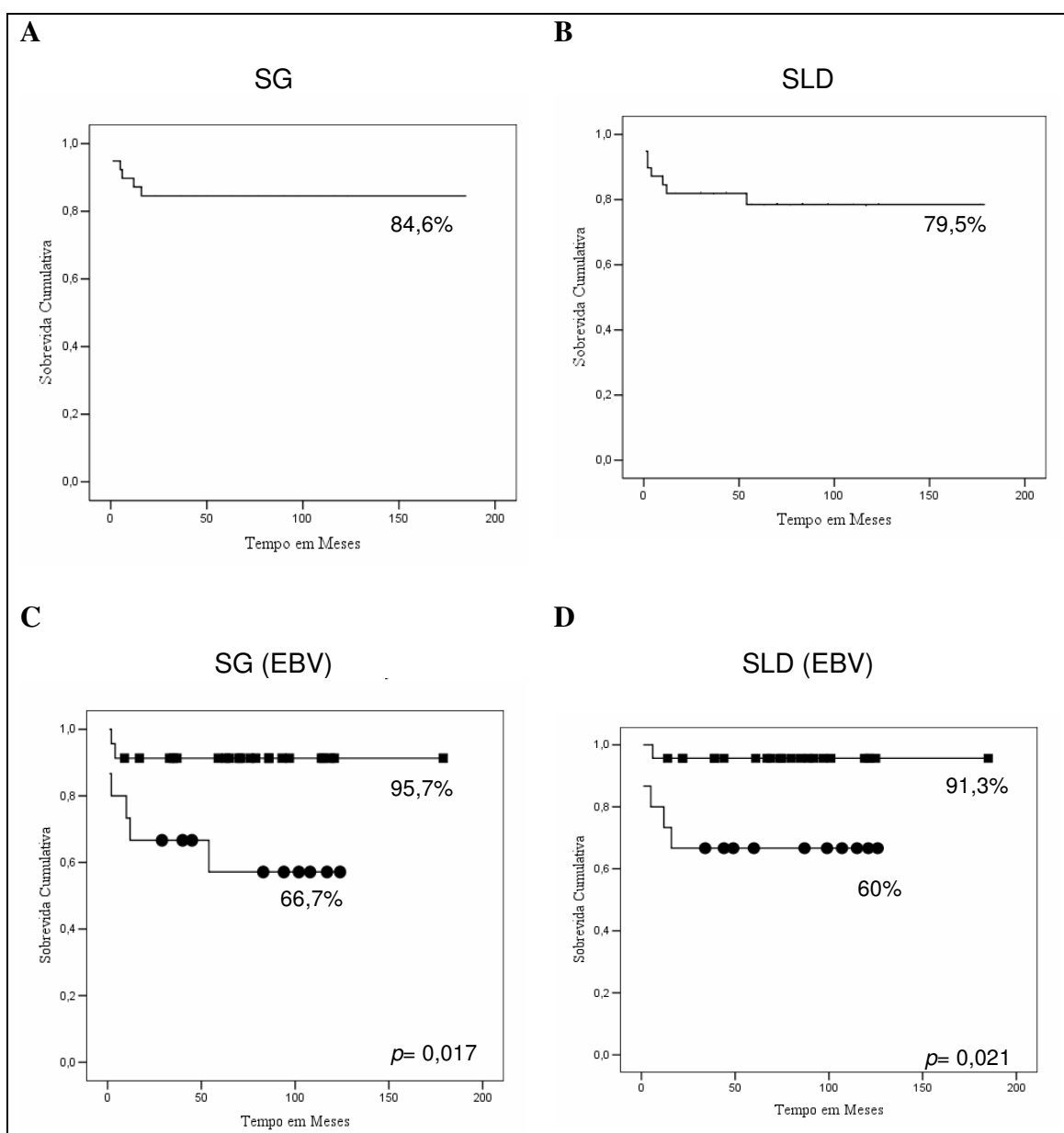


Figura 5.13: Curvas de SG e SLD dos pacientes com LB. A. Sobrevida Global (SG) dos pacientes com LB; B. Sobrevida Livre de Doença (SLD) dos pacientes com LB; C. Impacto prognóstico do EBV na SG e; D. na SLD. ■ = positivo, ● = negativo

A resposta terapêutica foi também analisada com relação aos polimorfismos no promotor da IL-10. Nenhum dos genótipos dos SNPs -1082 e -592 ou haplótipos proximais teve uma associação significativa com o prognóstico dos pacientes. Os polimorfismos que tiveram associação estatisticamente significativa com a resposta terapêutica foram a família IL10.01 e o alelo G12 do microsatélite IL10.G.

A presença da família de alta expressão de IL-10, IL10.01, caracterizada pelo haplótipo R3-GCC, foi associada a pior SG (50% vs. 91,7%, $p=0,005$), assim como pior SLD (50% vs. 83,3%, $p=0,042$) (Tabela 5.16 e Figura 5.14 A e B). Mais uma vez, a análise estratificada por grupo de risco mostrou diferenças no impacto da presença da família IL10.01. Para o GR3, a diferença foi marcante (3/4 eventos, 25% SLD para os portadores vs. 4/16, 75% SLD para os não portadores; $p = 0,01$). No GR2, a SLD foi de 75% para os portadores vs. 100% para os não portadores; $p = 0,18$. O mesmo foi observado para a SG (No GR2, SG similar a SLD; no GR3, 25% para os portadores da família IL10.01 vs. 87,5% para os não portadores; $p = 0,02$).

Quanto ao microsatélite IL10.G, a presença do alelo G12 mostrou uma tendência de associação com a resposta terapêutica. Pacientes portadores do alelo G12, em homo ou heterozigose mostraram uma pior SLD (55,6%), quando comparados com os pacientes não portadores deste alelo (85,2%), ($p=0,059$) (Tabela 5.16 e Figura 5.14 C). Este efeito não foi observado para a SG no grupo completo. A análise de sobrevida após estratificação por grupo de risco mostrou que no GR2 a SLD dos pacientes portadores não variou da SLD dos não portadores do alelo G12 (100% vs. 90%, $p= 0,65$). Entretanto, no GR3 os portadores do alelo G12 tiveram 33,3% de SLD (4/6 eventos) comparados com os não portadores, que mostraram 81,3% de SLD (3/16 eventos) ($p= 0,034$) (Figura 5.14 D). Novamente, não houve impacto do alelo G12 na SG. A tabela

D.2 (Anexo II) apresenta a análise dos demais polimorfismos de IL-10 em relação à resposta terapêutica.

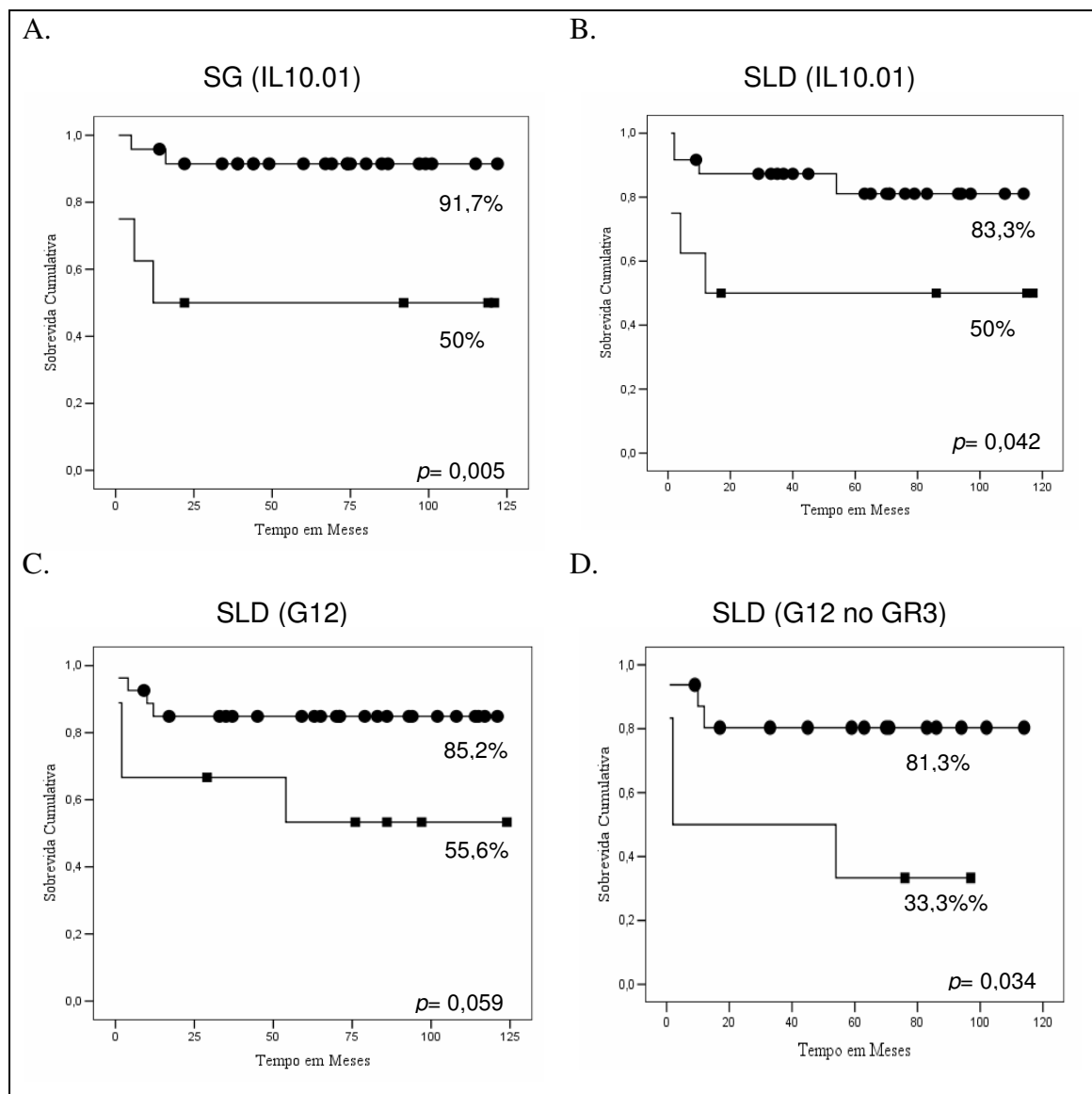


Figura 5.14: Curvas de sobrevida dos pacientes com LB de acordo a presença dos polimorfismos de IL-10. A. Impacto prognóstico da presença da família IL10.01 na SG e; B. na SLD; C. Curvas de SLD dos pacientes com LB de acordo com a presença do alelo G12; D. Curva de sobrevida livre de doença de acordo com a presença de G12 nos pacientes com grupo de risco 3 (GR3). ■ = positivo, ● = negativo

5.4.4.4 Proposta de um modelo genético-ambiental no prognóstico do LB pediátrico

A partir das variáveis significantes para a SLD na análise univariada, foi possível construir um modelo de resposta terapêutica utilizando a análise multivariada de Cox. O EBV (HR 6; 95% IC 1,14-31,7, $p=0,035$) e a família IL10.01 (HR 0,21, 95% IC 0,05-

0,96, $p=0,045$) mostraram impacto independente; sendo a presença do EBV um fator prognóstico favorável, enquanto que a presença da família IL10.01 conferiu um prognóstico desfavorável. A presença do alelo IL10.G12 mostrou um efeito prognóstico desfavorável com significação limítrofe. Entretanto, o modelo de exclusão progressiva e retrógrada de variáveis (tipo “backward”) mostrou que a presença desta variável é essencial para o modelo preditivo que inclui o EBV e a família IL10.01. Quando a análise multivariada foi ajustada para grupo de risco, o único fator que manteve significação foi a presença da família IL10.01 ($p= 0,016$), enquanto os outros mostraram efeito marginal (Tabela 5.17).

Tabela 5.17: Análise multivariada de fatores prognósticos para recaída no LB, ajustada por grupo de risco

Fator	Coefficiente β	HR	IC 95%	p
EBV	1,414	4,11	0,76 – 21,99	0,099
IL10.01	-2,139	0,118	0,021 – 0,676	0,016
G12	-1,505	0,222	0,045 – 1,091	0,064

Dado que o EBV, mesmo com os seus efeitos prognóstico restritos ao GR3, foi o único fator capaz de identificar um grupo de pacientes com desfecho favorável, foi investigado preliminarmente o possível efeito sinérgico dos fatores prognósticos EBV e IL10.01 no LB. Assim, dos 31 pacientes avaliados neste modelo foram agrupados:

Grupo 1. 4 casos EBV+ e portadores da família IL10.01 (EBV+/IL10.01+)

Grupo 2. 4 casos EBV- e portadores da família IL10.01 (EBV-/IL10.01+)

Grupo 3. 14 casos EBV+ e não portadores de IL10.01 (EBV+/IL10.01-)

Grupo 4. 9 casos EBV- e não portadores de IL10.01 (EBV-/IL10.01-)

A avaliação deste modelo na sobrevida mostrou que pacientes do grupo 3 (EBV+/IL10.1-) apresentaram melhor resposta terapêutica (SLD 92,9%). Pacientes do grupo 2 (EBV-/IL10.01+) constituíram o grupo com pior resposta terapêutica (SLD 25%). Dentro de uma faixa de sobrevida intermediária encontravam-se os pacientes que possuíam um dos fatores prognósticos, ou seja, grupo 1 (EBV+/IL10.01+) ou grupo 4 (EBV-/IL10.1-) (SLD = 75% e 66,7%, respectivamente) (Figura 5.15). O poder estatístico do modelo não mudou quando estratificado por grupo de risco mostrando sua adequação para prever prognóstico no GR3 ($p= 0,003$).

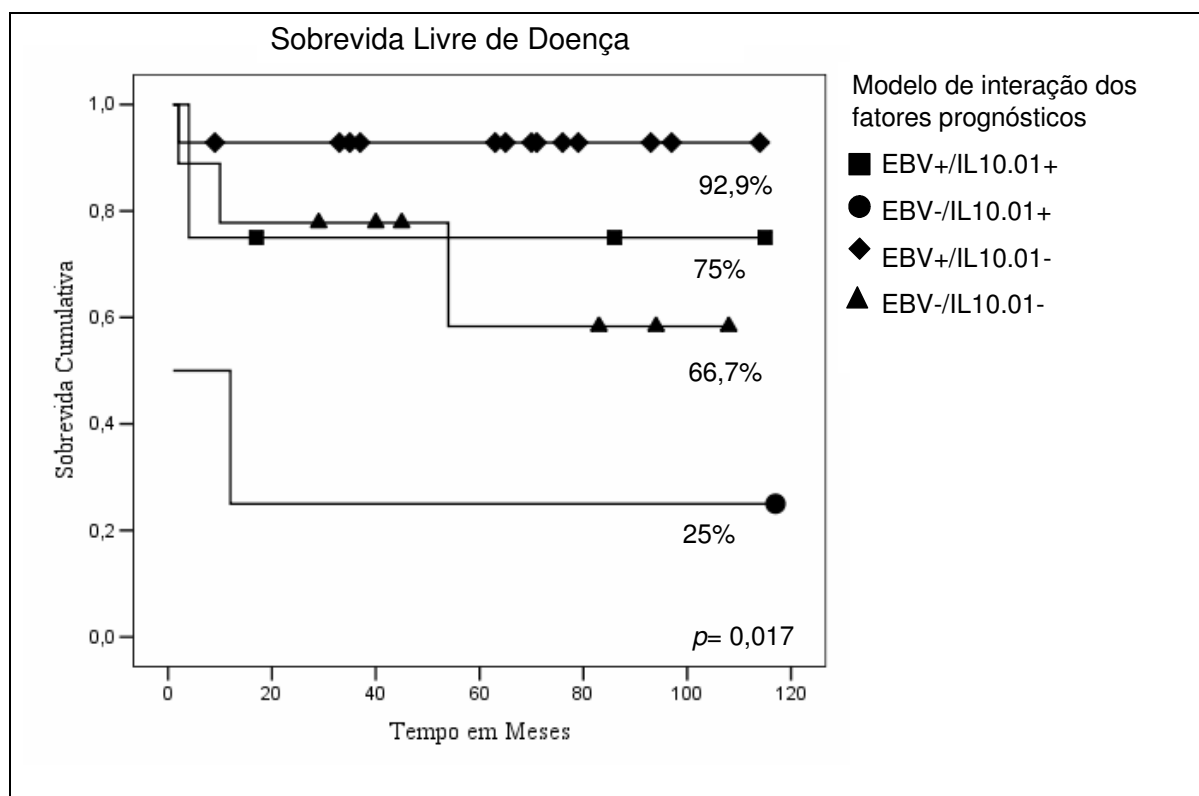


Figura 5.15: Análise conjunta da presença do EBV e da família IL10.01 como fator prognóstico de recaída nos pacientes com LB.

6. DISCUSSÃO

Uma das características mais marcantes do LB é a sua heterogeneidade geográfica quanto à incidência e apresentação clínico-biológica (Magrath 1990; Diebold et al, 2001). O LB tem como fator genético primário e comum a todos os subtipos epidemiológicos a translocação do oncogene *MYC* para um dos genes de imunoglobulina. No entanto, é possível que outros fatores, como as interações entre o sistema imune do hospedeiro e diferentes agentes ambientais sejam os principais responsáveis pelas diversas formas epidemiológicas em que se encontra o LB. Embora o LB endêmico esteja melhor compreendido do ponto de vista patogênico (de-The et al, 1987; de-The 1995; Rochford, 2005), a natureza e o papel dos fatores ambientais, assim como o risco conferido por eles, não são claros nas outras condições epidemiológicas em que o LB se desenvolve (por exemplo, LB esporádico e “intermediário”). Mais ainda, não existem abordagens conclusivas sobre o papel da constituição genética do indivíduo que desenvolve LB e sua norma de reação em nível individual e populacional. Neste trabalho, um estudo caso-controle foi realizado com 62 crianças com LB pareadas geograficamente com indivíduos saudáveis. Foram determinadas as frequências gênicas e genóticas dos 3 SNPs do haplótipo proximal (-1082A/G, -819C/T e -592C/A) e 2 microssatélites (IL10.R e IL10.G) do promotor da IL-10. Uma frequência significativamente maior do genótipo -1082 GG e o haplótipo GCC foi observada nos casos, quando comparados com os controles, implicando para os portadores destas variantes um risco aproximadamente 3 vezes maior de desenvolver o linfoma, comparado com aqueles sem estes genótipos/haplótipos. Quanto à associação com o EBV, 54% mostraram a presença do vírus nas células tumorais, com predomínio na classe de menor idade (2-4 anos). Os subgrupos EBV+ e EBV- não foram

significativamente diferentes em relação aos polimorfismos da IL-10 estudados. Entretanto, uma forte e significativa estruturação etária foi observada neste grupo, em relação não somente à frequência de associação com o EBV, mas também quanto à representação dos genótipos/haplótipos proximais de IL-10 (GCC e ACC) nas diferentes classes de idade, abrindo a possibilidade de formular hipóteses quanto as interações patogênicas idade-dependentes e fatores associados ao controle genético da infecção pelo EBV. Finalmente, um estudo realizado com um grupo de pacientes homogeneamente tratados com o protocolo institucional LNH-98 mostrou que a presença do EBV e de polimorfismos de IL-10 (R3-GCC e IL10G.12) mostraram ter um impacto prognóstico (favorável e desfavorável, respectivamente) na resposta terapêutica, principalmente no grupo de risco desfavorável.

As principais limitações deste estudo são o tamanho amostral reduzido, assim como a incorporação potencial de viés estatístico devido a deficiências no pareamento dos controles. No primeiro caso, uma das conseqüências seria à diminuição do poder estatístico do estudo caso-controle, que poderia impedir a identificação de efeitos das variantes genéticas (Hirschhorn and Daly, 2005). Desta forma, foi realizada uma modelagem genética, visando o melhor aproveitamento do poder estatístico dos testes, e foi identificado um efeito de susceptibilidade da variante -1082G, de caráter recessivo, com nível de significação aceitável para um estudo caso-controle ($p=0,0017$) (Risch and Merikangas, 1996). O pequeno número amostral, entretanto, foi um fator limitante na possibilidade de entender melhor o papel das variantes de IL-10 em relação ao EBV, dada a marcada estratificação etária do grupo estudado.

A segunda limitação, pareamento dos controles, diz respeito à possibilidade de estabelecer falsas associações positivas (Li, 2007). Em relação ao pareamento das crianças, a utilização de controles de crianças não pareadas por sexo com os casos foi

outra situação adversa com a qual nos deparamos devido à dificuldade de se coletar amostras de crianças saudáveis. Essa situação foi contornada em parte através da adição de amostras de cordão umbilical como controles de idade zero pareados por sexo. Como apresentado no Anexo II, tabela C1, a comparação dos casos somente com as crianças do grupo controle mostrou resultados com níveis de significação semelhantes aos obtidos na comparação com o grupo controle total.

Outro aspecto que não foi levado em conta foi o pareamento por “etnia” auto-declarada. Isto foi decidido na fase de desenho do estudo, devido ao alto grau de miscigenação da população brasileira e ao fato de estudos prévios terem mostrado claramente que no Brasil, cor da pele é um indicador pobre de ancestralidade, a qual é melhor definida por marcadores moleculares (Parra et al, 2003; Pimenta et al, 2006).

Os resultados de Moraes et al (2003), que compararam polimorfismos de IL-10 em uma população do Rio de Janeiro e outra da Holanda, corroboram a não necessidade de um estudo pareado por raça. As diferenças entre as duas populações foram significativas, mostrando composição genética particular para cada população. Os indivíduos brasileiros foram classificados como Afro- ou Euro-brasileiros, mas não foram encontradas diferenças entre eles quanto a genótipos e haplótipos de IL-10. Mais ainda, a comparação entre holandeses e Euro-brasileiros mostrou diferenças altamente significativas. Quando pesquisados haplótipos previamente descritos somente em Afro-Americanos, estes não foram encontrados nos holandeses, mas curiosamente, quase exclusivamente nos Euro-brasileiros. Assim, neste estudo com uma população similar à estudada por nós (de fato, os indivíduos eram doadores saudáveis do CEMO), Afro- e Euro-Brasileiros não puderam ser identificados baseados nos polimorfismos de IL-10. Ressalta-se que as mesmas variantes genéticas associadas ao risco de LB no estudo caso-controle foram também associadas às características clínicas importantes no estudo

de série de casos, cujos resultados não dependem do pareamento com controles. Isto sugere que os resultados encontrados não se devem ao acaso e nem por falta de pareamento dos controles.

Entretanto, a existência de uma estrutura populacional crítica causada por mistura inter-étnica, levando a associações genéticas espúrias não pode ser descartada totalmente (Pritchard et al, 2000; Li, 2007). Uma solução seria ajustar a análise de variantes do gene candidato, mediante o uso de marcadores polimórficos de ancestralidade (Pritchard et al, 2000; Parra et al, 2003, Pimenta et al, 2006). Além de eliminar possíveis vieses nos resultados, esta abordagem permitiria obter conhecimentos importantes sobre a dinâmica populacional e potenciais forças seletivas das variantes de um gene de importância principal na resposta a infecções.

Do ponto de vista do entendimento do modelo biológico subjacente, uma limitação do estudo foi não ter avaliado a expressão da IL-10 nas amostras tumorais, devido à falta de disponibilidade de material biológico adequado na maioria dos casos. Alternativas para complementar este estudo incluem avaliação da expressão protéica por IHQ ou da expressão de RNA por ISH (Herbst et al, 1996). A escolha de métodos *in situ* tem como objetivo identificar padrões de expressão em células tumorais vs. células do microambiente (vide abaixo).

IL-10 e LB: na busca de um modelo

Neste trabalho, a maior incidência do genótipo -1082GG foi identificada como o fator de predisposição genética ao desenvolvimento do LB pediátrico. O risco de até 3 vezes de desenvolvimento do LB, na presença do haplótipo GCC em homozigose, sugere fortemente que este genótipo/haplótipo pode contribuir com o contexto genético em que surge o LB.

Os polimorfismos estudados apresentam marcado efeito funcional, em que variações de até dez vezes na produção de IL-10 foram encontradas de acordo com os genótipos do SNP -1082A/G (Turner et al, 1997; Eskdale et al, 1998; Reuss et al, 2002; Mörmann et al, 2004; Rieth et al, 2004). Neste estudo não foram feitos ensaios de quantificação de IL-10 em relação às variantes polimórficas. De fato, ainda há discordância na literatura sobre a relação entre fenótipos de alta/baixa expressão e genótipos ou haplótipos de IL-10, principalmente devido à diversidade de modelos experimentais utilizados; e, não de menor importância, às diferenças de regulação da expressão de IL-10 dependendo do tipo celular estudado (Suárez et al, 2003; Temple et al, 2003). Entretanto, a maioria dos estudos apóia um modelo em que o alelo -1082G em homozigose está associado a um fenótipo celular de alta expressão (Turner et al, 1997; Koss et al; 2000; Reuss et al 2002; Suárez et al, 2003; Mörmann et al, 2004; Miteva and Stanilova; 2008; Visentainer et al, 2008). Os nossos próprios resultados da modelagem genética confirmam um modelo de transmissão recessiva do alelo -1082G.

Na patogênese do LB, o papel da IL-10 está provavelmente mais relacionado as suas propriedades proliferativas, visto que esta citocina possui potencial estimulatório nos linfócitos B (Rousset et al, 1992). Por outro lado, a inibição da secreção de IL-10 por células tumorais promove morte celular e está implicada na redução da expressão da proteína anti-apoptótica BCL2 (Alas et al, 2001). Portanto, presume-se que o efeito estimulatório de crescimento celular no LB parece ser alcançado também através das propriedades anti-apoptóticas da IL-10 (Guedez et al, 1998).

Entretanto, algumas evidências na literatura apontam para um papel mais complexo da IL-10 na patogênese do LB. Nesta doença, os macrófagos representam o maior componente inflamatório intratumoral e mostram sensibilidade funcional aos níveis de IL-10 secretada no microambiente tumoral (Mantovani et al, 2002; Gordon, 2003). Os

macrófagos respondem uniformemente aos altos níveis locais de IL-10 aumentando a capacidade fagocítica de corpos apoptóticos e com isto a diferenciação imunossupressiva associada a esta função (Sica et al, 1999), além de secretarem altos níveis BAFF/BLys (importante fator de sobrevivência de célula B da família TNF). Evidências experimentais apóiam um papel de BAFF induzida por IL-10 como um fator anti-apoptótico no LB (Ogden et al, 2005). A produção de BAFF pelas células tumorais parece ser heterogênea, mas não foi extensamente estudada em material tumoral primário. Assim, as evidências experimentais favorecem um modelo de interação parácrina, em que a produção de IL-10 por células tumorais ativaria um circuito que, passando pela ativação e diferenciação da capacidade imunossupressiva dos macrófagos, volta para a célula tumoral como um estímulo anti-apoptótico mediado por BAFF. O papel dos polimorfismos funcionais do promotor de IL-10 não foi analisado neste modelo, mas poderia ser levantada a hipótese de que os principais efetores das diferenças de expressão inter-individual seriam os macrófagos intratumorais. Uma forma direta de testar esta hipótese, seria através da correlação dos polimorfismos de IL-10 com a expressão in situ de IL-10 e BAFF por células tumorais vs. macrófagos. A análise dos padrões observados, utilizando técnicas estritamente controladas, poderia indicar o caminho para experimentação mais específica.

Os resultados publicados com grupos de pacientes com LNH podem ajudar a interpretar os resultados obtidos neste trabalho. Contrariamente aos nossos resultados, um estudo com linfomas não-Hodgkin de adultos identificou o genótipo -1082AA e o haplótipo ATA como fatores de risco para doença agressiva (Cunningham et al, 2003). Um segundo estudo sugeriu o genótipo -1082GG como fator de risco para a linfomagênese em pacientes com AIDS (Breen et al, 2003). No linfoma difuso de grandes células B, o alelo -1082G foi um fator de risco em um nível marginal de significância (Lech-

Maranda et al, 2004), resultado que não foi replicado em um estudo com um número alto de pacientes com este tipo de linfoma B (Kube et al, 2007). Finalmente, um estudo desenvolvido pelo *InterLymph Consortium* realizado com o maior número de pacientes com LNH já estudados, não encontrou associação dos genótipos de -1082 com o desenvolvimento de LNH (Rothman et al, 2006).

Os dados conflitantes parecem refletir a complexidade das funções biológicas da IL-10, tanto como uma citocina antiinflamatória, quanto como anti-angiogênica. Diferentemente de alguns tipos de câncer em que a IL-10 produzida por células T regulatórias atua no microambiente como uma citocina imunossupressora da resposta anti-tumoral (Marshall et al, 2007), no LB a IL-10 atua como um potente ativador de células B agindo como um fator autócrino de crescimento do tumor (Kossakowska et al, 1991; Voorzanger et al, 1996; Klein et al, 1999). Isso mostra que as propriedades biológicas da IL-10 se apresentam com conseqüências distintas nos diferentes sistemas tumorais.

A direção futura deste trabalho é um estudo de replicação, visando reproduzir os resultados em um grupo de pacientes independentes, mas que apresentem similares características epidemiológicas. Neste sentido, o modelo genético de interações alélicas dos SNPs -1082 e -592 é um marco relevante porque permite desenhar um estudo de associação com modelo genético conhecido, servindo-se de aproximações estatísticas de tipo bayesiana, que podem aumentar o poder estatístico de um estudo, mesmo utilizando tamanhos amostrais praticáveis no campo de estudo dos linfomas pediátricos (Freidlin et al, 2002).

Associações entre o linfoma de Burkitt, o EBV e os polimorfismos da IL-10: uma questão de idade?

O LB no Sudeste Brasileiro pode ser considerado como em uma situação epidemiológica intermediária entre o LB endêmico e esporádico (Klumb et al, 2004; Hassan et al, 2008; Pizza et al, 2008). Isso oferece a possibilidade de analisar um fator ambiental relevante (presença/ausência do EBV) e sua relação com fatores genéticos, em casos originados na mesma região sócio-geográfica.

Este estudo amplia resultados prévios com pacientes desta instituição (Klumb et al, 2004; Hassan et al, 2008), e confirma uma frequência de associação do LB com o EBV de 50-60% na região Sudeste do Brasil (Pizza et al, 2008; Queiroga et al, 2008).

Uma correlação entre baixa idade e presença do EBV foi também confirmada neste estudo com um número maior de casos ($p=0,008$), reforçando a idéia de que a idade de soroconversão pode ser um fator de risco para o desenvolvimento do LB (Hassan et al, 2008).

Dado o papel da IL-10 na biologia do EBV e um possível sinergismo das IL-10s humana e viral, poder-se-ia hipotetizar um papel diferenciado dos polimorfismos desta interleucina na patogênese dos LB EBV+ e EBV-. Entretanto, os dois grupos não exibiram composições genéticas diferentes quanto à IL-10, principalmente no que diz respeito ao genótipo -1082GG, responsável pela diferença significativa no estudo caso-controle, que apresentou frequências similares (25%) em ambos. Assim, em uma primeira aproximação, os resultados deste estudo sugerem que os genótipos de IL-10 estão envolvidos na patogênese do LB independentemente do *status* do EBV da célula transformada.

A análise do LB por classes de idade, no entanto, revelou uma marcada estruturação etária tanto dos genótipos como da associação com o EBV, sugerindo uma interação mais complexa, idade-dependente, entre estes fatores.

A característica mais marcante do grupo estudado foi uma acumulação, na classe >10 anos, de portadores dos genótipos -1082GG e GCC/GCC, na sua grande maioria (87,5%) não associada ao EBV. Nesta classe de idade, o haplótipo ACC não esteve representado. No grupo EBV- houve diferenças significativas na mediana de idade dos portadores de GCC/GCC quando comparados aos não portadores desta combinação, o que não foi observado no grupo EBV+. De fato, o grupo EBV+ mostrou ser bastante homogêneo quanto à distribuição dos genótipos por idade. Entretanto, mostrou menor frequência do genótipo -1082AA que o grupo EBV-, diferença que atingiu significação quando a comparação foi realizada entre pacientes EBV+ e controles sadios.

Uma explicação para estas observações poderia ser que as diferenças entre os grupos etários do LB refletem o efeito da constituição genética individual na predisposição à infecção pelo EBV. Um estudo sobre a população sadia adulta na Finlândia, sugeriu que o genótipo IL-10 -1082GG exerceria um efeito protetor contra a infecção pelo EBV (Helminen et al, 1999). Para a idade adulta, considera-se que mais de 90% da população mundial é infectada pelo EBV. Nos países desenvolvidos, a soroconversão ocorre majoritariamente no adulto jovem, comparado aos países sub-desenvolvidos ou em desenvolvimento, em que a primo-infecção ocorre nos primeiros anos de vida. Aproximadamente 5% dos adultos permanecem EBV soronegativos durante toda a vida. Acredita-se que esses indivíduos sejam imunologicamente diferentes do resto da população mundial (Jabs et al, 1996). Segundo o estudo citado (Helminen, 1999) e outros posteriores, o genótipo -1082GG de IL-10, assim como variantes do complexo

IL-1/IL-1R contribuiriam para a refratariedade à infecção pelo EBV (Hurme et al, 1998).

Em um estudo posterior incluindo desta vez crianças saudáveis, Helminen et al (2001) descreveram uma situação dinâmica em que o haplótipo IL10 ATA foi associado à infecção tardia pelo EBV (e portanto encontrado com maior frequência nas crianças EBV-), e por isto, promovendo o desenvolvimento de mononucleose infecciosa (Helminen et al, 2001). Desta forma, o alelo -1082A estaria retardando a infecção pelo EBV, mas sem impedir que ela aconteça. Igualmente verificaram que o genótipo GCC em homozigose e a ausência de ACC foram relacionados a indivíduos EBV negativos, na idade adulta.

Assim, pelo menos parte do grupo de LB >10 anos estudados por nós, poderia apresentar características particulares quanto a sua capacidade de manejar a infecção pelo EBV, definido pela sua constituição genética, não somente em relação à IL-10, mas também a outras interleucinas que parecem participar no controle da infecção por este vírus (Helminen et al, 1999; 2001; Hurme et al, 2003).

Entretanto, 9/15 portadores de GCC/GCC foram detectados no grupo \leq 10 anos, 8 deles associado ao EBV, e destes, 5 na classe de 0-4 anos. A pergunta que surge da análise destes dados é se os portadores de GCC/GCC EBV+ e EBV- são diferentes geneticamente ou, dado a baixa idade dos primeiros em geral, existe uma interação entre genótipo e idade de infecção primária, determinando, por exemplo, um risco diferente de acordo à idade (como um *proxy* da maturidade do sistema imune).

Aqui é muito importante lembrar que o modelo sobre controle genético da infecção pelo EBV procede de um país desenvolvido onde a soroconversão precoce é rara (Helminen et al 1999; 2001). Nas regiões onde a soroconversão é precoce e a incidência da mononucleose é baixa, necessita-se completamente de um modelo de interação

genético-ambiental. Por exemplo: Qual é o papel que a constituição genética do indivíduo em geral e os genótipos de IL-10 em particular, jogam frente à infecção precoce pelo EBV? Existem soroconversores tardios definidos geneticamente? Existe uma relação entre a carga do EBV na primoinfecção (baixa nos países desenvolvidos, maior nos outros) e reação do sistema imune de acordo à composição genética? São outros fatores genéticos, como alelos do sistema maior de histocompatibilidade (MHC) importantes no manejo da infecção primária pelo EBV, como descrito para os países desenvolvidos (Moss et al, 2001). E finalmente: definem estes fatores e/ou suas interações, riscos mensuráveis idade-dependentes para o desenvolvimento de linfomas da infância?

Os nossos resultados preliminares em uma patologia associada ao EBV e caracterizada pelo acometimento de crianças de baixa idade, parecem indicar situações diferenciadas nas idades $< e > 10$ anos. As limitações desse estudo, a saber, a falta de determinação do estado sorológico do EBV nos pacientes em que o vírus não foi detectado na célula tumoral e o baixo número de pacientes maiores que 10 anos, não permitem extrair conclusões definitivas sobre o significado biológico do grupamento de variantes polimórficas por idade.

Estudos em curso sobre a composição genética do LB em relação aos polimorfismos de IL-1a, IL-1b e IL-1R poderão determinar se o grupo de LB >10 anos GCC/GCC EBV- é geneticamente diferente que o grupo ≤ 10 anos GCC/GCC EBV+, permitindo elucidar o envolvimento de fatores de suscetibilidade ao EBV na estruturação etária do LB nesta região geográfica. Contudo, dado que não existem modelos formais para sustentar uma relação patogênica entre soroconversão tardia ou refratariedade à infecção pelo EBV e o desenvolvimento do LB, a determinação de se estas características estão também

envolvidas na patogênese do LB nesta faixa etária particular deverá aguardar estudos de maior complexidade.

Assim, neste trabalho observamos que a combinação de variantes como idade, status do EBV e os polimorfismos da IL-10 (Figura 6.1) sugerem a existência de risco associado à idade, mostrando a necessidade de incluir este conceito no desenho de estudos futuros.

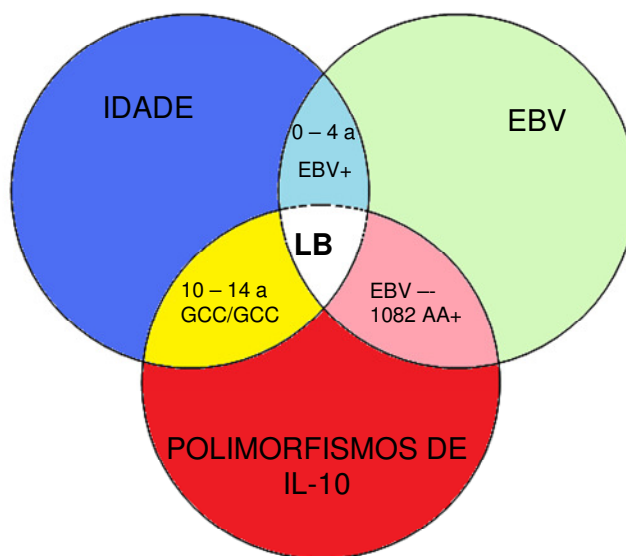


Figura 6.1: Interação entre fatores genéticos e ambientais no LB pediátrico.

Neste ponto, é importante ressaltar que esse tipo de estudo de susceptibilidade seja realizado em crianças, já que a informação sobre susceptibilidade genética idade-dependente não poderia ser obtida a partir de trabalhos incluindo somente pacientes adultos, como a maioria dos relatados na literatura para os LNH. Os resultados deste estudo também podem ser interpretados como uma advertência contra a tendência de que os conhecimentos obtidos a partir de estudos em linfomas de adultos sejam estendidos diretamente aos linfomas de crianças.

A influência do EBV e dos polimorfismos de IL-10 na resposta terapêutica dos pacientes com linfoma de Burkitt

A introdução de regimes multiquimioterápicos, intensivos e de curta duração representou uma mudança qualitativa na resposta ao tratamento dos LNH da infância, que alcançou aproximadamente 80% a 90% de cura em séries internacionais (Reiter et al, 1999; Paté et al, 2001). O protocolo institucional LNH98 do INCA foi avaliado recentemente mostrando ser bastante eficiente no tratamento de LNH-B da infância com resultados comparáveis aos do grupo BFM90 (Klumb et al, 2004).

Como parte deste estudo, nós avaliamos a sobrevida dos 39 pacientes incluídos no presente estudo e uniformemente tratados com o protocolo institucional do INCA, visando identificar fatores genéticos e/ou ambientais que pudessem modificar o prognóstico conferido pelos fatores de risco clássicos. A presença do EBV nas células tumorais foi relacionada ao menor risco de recaída e maior sobrevida global, especialmente no grupo de risco desfavorável. De forma contrária, a presença da família IL10.01 e o alelo IL10.G12 foram associados a uma resposta terapêutica desfavorável.

Impacto prognóstico do EBV

Uma causa importante da falha à quimioterapia na maioria dos cânceres e também no LB é a resistência à apoptose (Magluta and Klumb, 2008). Portanto, parece natural, na tentativa de explicar a associação observada entre EBV e resposta favorável à terapia, que sejam avaliadas as interações do EBV com a maquinaria de apoptose. Na célula de Burkitt, o EBV expressa um conjunto limitado de proteínas e RNAs latentes que não parecem estar relacionados com a apoptose. NF-kB, principal via manipulada pelo vírus em latência II e III não é interferida pelo EBV em latência I (Samanta et al, 2008). Recentemente, um novo padrão de latência foi descrito no LBe, que inclui a deleção de

EBNA2 e expressão de proteínas EBNA3 reguladas a partir do promotor Wp (latência Wp) (Kelly et al, 2002; Kelly et al, 2005; Kelly and Rickinson, 2007). Células infectadas pelo EBV com latência Wp exibiram proteção significativa contra a morte celular programada induzida por uma variedade de agentes citotóxicos (Leao et al, 2007; Anderton et al, 2008). Embora não tenhamos investigado diretamente a presença deste padrão de latência nos casos com LB, a utilização do gene EBNA2 como alvo da tipificação do EBV permitiu descartar preliminarmente a presença desta deleção em um número expressivo de casos. Mais ainda, a interação do EBV com as vias celulares de apoptose, através de proteínas de latência parecem estar associadas aos efeitos de resistência (Snow et al, 2006), que não poderiam explicar a associação com resposta favorável.

Poucos estudos abordaram o papel prognóstico do EBV no LB, principalmente pela pouca frequência dos casos EBV+ no LBs e EBV- no LBe. Em nenhum dos estudos foi encontrado um efeito prognóstico da presença do EBV (Israel and Kenney, 2003; Pizza et al, 2008).

Uma pista para interpretar nossos resultados vem de um estudo com LBe, com todos os casos EBV+, mostrando que uma melhor resposta terapêutica dos pacientes esteve associada à presença, na população de células tumorais, de uma fração de células com o EBV em ciclo lítico (Labrecque et al, 1999).

De fato, a indução viral lítica, associada ao tratamento quimioterápico é uma estratégia terapêutica proposta para os cânceres associados ao EBV (Israel and Kenney, 2003; Kurokawa et al, 2005). Estes protocolos visam, em geral, ativar o genoma do EBV dentro do tumor, a fim de alterar propriedades fenotípicas do próprio tumor para colaborar na lise de células tumorais, bem como de tirar vantagem do sistema imune do paciente (Feng et al, 2004; Kenney, 2006).

Após indução do ciclo lítico, a proteína BZLF1, principal transativador precoce do ciclo lítico, é expressa, ativando a cascata completa de expressão gênica lítica. Neste processo, o vírus é replicado por uma polimerase viral e novos virions são liberados através de lise da célula hospedeira (Rickinson and Kieff, 2001). Assim, pensa-se que o vírus, numa tentativa de sobrevivência frente à indução de apoptose pelos agentes antineoplásicos, procura infectar células adjacentes (Rickinson and Kieff, 2001; Israel and Kenney, 2003). Este processo de lise celular, mesmo em um número pequeno de células, poderia exercer um efeito sinérgico com a quimioterapia, explicando a resposta favorável dos pacientes EBV+.

Assim, nós hipotetizamos que o EBV forneça um mecanismo de destruição da célula tumoral, através da indução do ciclo lítico, em resposta ao ataque de drogas quimioterápicas nas células em que se encontra. É possível que a probabilidade de indução lítica aumente na presença de uma alta carga tumoral ou disseminação do tumor, explicando o efeito do EBV no grupo de risco desfavorável.

A expressão de BZLF1 nos casos estudados não é ainda conhecida. Um estudo preliminar com RT-PCR e IHQ de 8 casos mostrou que o RNA e a proteína são expressos em uma fração importante dos casos (5/8), embora em um número baixo de células (Hassan, 2005, dados não publicados). A extensão do trabalho de caracterização do ciclo lítico do EBV no LB poderia fornecer dados importantes para entender as bases moleculares da resposta terapêutica desta doença, desenvolver novas estratégias de tratamento e possibilitar a identificação de novos marcadores prognóstico no LB EBV+.

Um trabalho recente realizado com casos diagnosticados com LB em São Paulo não foi capaz de encontrar diferenças significativas na sobrevida de pacientes EBV+ e EBV- (Pizza et al, 2008). Os pacientes foram tratados com duas versões do protocolo Brasileiro de tratamentos de linfomas da infância (GBTLI-1987 e 1996). A SLD foi de

86.5% (média 175 meses) e a SG foi de 74.5% (média 154 meses). Para os casos EBV+, a sobrevida foi de 175 meses (147-203) vs. 121 (81-161) nos casos EBV- (p=0.23). A análise de sobrevida não foi ajustada por estadiamento ou grupo de risco.

As diferenças com os nossos resultados em relação ao impacto prognóstico do EBV podem ser devidas a vários fatores. Por exemplo, a análise de sobrevida não foi ajustada por protocolo ou data do tratamento, tendo em conta que os pacientes foram acompanhados por um período em que a melhora dos protocolos e condições de suporte poderiam influenciar os resultados. No mesmo período, a avaliação dos protocolos empregados no INCA comparado a um estudo de ínterim publicado previamente demonstrou uma melhora significativa das taxas de sobrevida (Klumb et al, 2004).

Uma outra característica importante é que metotrexate (MTX), utilizado em menores doses para tratar os pacientes com LNH no INCA, é quimioterápico capaz de induzir o ciclo lítico completo no EBV, incluindo a formação de virions (Feng et al; 2002; 2004). Em relação a isto, o estudo de Labrecque et al, 1999 com o LBe, mostrou que, mesmo nos poucos casos em que a expressão de BZLF1 não leva aos eventos tardios do ciclo lítico pôde-se encontrar associação com a resposta favorável, sugerindo que a expressão desta proteína altamente imunogênica sirva como sinal para “engatilhar” os mecanismos de imunovigilância. Como as células de Burkitt não expressam MHC de tipo I necessário para apresentar epitopos de BZLF1 para as CTLs (Hislop et al, 2007), e os macrófagos do microambiente apresentam em geral um perfil supressor, é possível que a contribuição deste mecanismo não seja muito relevante, em relação à indução do ciclo lítico completo.

A testagem destas hipóteses requer o desenho cuidadoso de estudos *in vitro* e ensaios *ex vivo*, combinados com modelos animais. O entendimento dos mecanismos moleculares subjacentes à resposta favorável associada à presença do EBV na célula tumoral do LB,

certamente possibilitará a identificação de novos alvos para desenvolvimento de drogas e aplicação de terapias coadjuvantes no LB.

Impacto prognóstico dos polimorfismos no promotor do gene da IL-10

Enquanto que a presença do EBV na célula tumoral foi associada uma resposta favorável à terapia, a presença de determinadas variantes genéticas de IL-10 foram relacionadas a pior resposta terapêutica neste grupo de pacientes. A família IL10.01, que parece estar associada com alta expressão de IL-10, composta pela combinação do haplótipo GCC e o alelo R3 do microsatélite IL10R, foi associada a pior resposta terapêutica dos pacientes.

Evidências apontam para um papel do padrão e do nível da produção de citocinas no prognóstico de diversos tipos de câncer (revisado em Seruga et al 2008). Os altos níveis séricos de IL-10 foram relacionados aos estadios mais avançados de doença e com pior resposta à terapia dos pacientes com LNH (Blay et al, 1993).

Com relação aos polimorfismos de IL-10 e a resposta clínica de pacientes com câncer, o haplotipo ATA (-1082 A, -819 T, -592 A), associado a baixa produção de IL-10, foi capaz de prever independentemente de outros fatores uma sobrevida aumentada em pacientes com melanoma avançado (mas também elevado risco de susceptibilidade para o desenvolvimento desta patologia) (Vuoristo, 2007). O mesmo resultado foi observado para os LNH de célula T (Lee et al, 2007).

Ainda com relação aos polimorfismos proximais da IL-10, o alelo -1082G (genótipos AG e GG) foi relacionado à melhor sobrevida no LNH (Lech-Maranda et al, 2004). Mas este efeito não pode ser replicado em outro trabalho com um grupo distinto de pacientes com LNH (Kube et al, 2007). A controversa relação dos polimorfismos de IL-10 com o

prognóstico talvez reflita a heterogeneidade de funções exercidas por esta citocina nos diferentes estágios e tipos de câncer.

A IL-10 é capaz de aumentar os níveis de BCL2 e de proteger as células B da apoptose induzida por doxirrubicinas e glicocorticóides (Noble et al, 1999). Portanto, é possível que nos portadores da família IL10.01 com alta expressão, o pior prognóstico possa estar relacionado com um efeito autócrino/parácrino de resistência a apoptose por mecanismos similares. Estes efeitos não foram ainda testados nas células de Burkitt, em que seria importante investigar a relação da IL10 com os membros BH3 da família BCL2 (BIM, BAX, PUMA, NOXA), cuja importância no balanço apoptótico do LB vem sendo apontada por estudos recentes (Harada et al, 2004).

A presença do alelo IL10.G12 também foi associado a pior resposta terapêutica dos pacientes. Estudos de estimulação *in vitro* mostram que IL10G12 encontra-se entre os alelos (G10, G12 e G14) capazes de induzir altos níveis de IL-10 (Mörmann et al, 2004). Entretanto, dado que esta é uma variante altamente representada na população normal, é possível que seus efeitos só adquiram relevância biológica no contexto de um microambiente neoplásico, participando de etapas mais avançadas da doença. É importante lembrar que esta região polimórfica está influenciada pela variante na posição -1082, além de ter sido sugerido o efeito de elementos 5' no promotor gênico que poderiam estar modulando a capacidade regulatória da posição IL10G (Mörmann et al, 2004). Neste estudo foi possível identificar DL entre o SNP -1082 e o microsatélite IL10.G. Entretanto o pequeno número amostral não permitiu completar uma análise do impacto prognóstico destas combinações. Novos estudos com maior número de casos poderiam elucidar estas interações gênicas e seus efeitos na biologia da doença.

Interações entre EBV e polimorfismos do gene da IL-10 na resposta terapêutica dos pacientes

Em relação à interação entre o EBV e os fatores genéticos que influenciam a resposta terapêutica, este estudo preliminar sugere que o EBV é um fator independente de bom prognóstico, cuja associação com fatores de prognóstico desfavorável (IL10.01) pode ocasionar uma moderada diminuição da sobrevida. Entretanto, é no grupo EBV- onde a presença dos fatores genéticos parece ser capaz de modular a resposta de maneira mais clara, oferecendo a possibilidade do desenvolvimento de indicadores para sub-estratificação de risco.

Com a melhora do tratamento quimioterápico, o LB é curado em 70% a 80% de todos os casos. No entanto uma parcela de casos continua não responsiva ao tratamento e não atinge cura. Apesar de estudos futuros serem necessários para esclarecer os mecanismos responsáveis pelos efeitos do EBV na resposta clínica dos pacientes, este estudo oferece um marcador potencial de aplicação clínica no tratamento dos tumores de LB. É importante mencionar que os resultados gerados a partir do pequeno número de pacientes analisados neste estudo devem ser extrapolados com cautela. Finalmente, esses resultados preliminares sugerem que os polimorfismos da IL-10 podem estar envolvidos em processos de diferenciação tumoral do LB e podem ser usados como marcadores prognósticos dos pacientes.

Polimorfismos de IL-10: uma reflexão sobre a população saudável

Além dos resultados obtidos através do estudo dos fatores genéticos e ambientais associados à patogênese e sobrevida no LB, o número significativo de indivíduos saudáveis utilizados nas análises de caso-controle possibilitou uma reflexão sobre o papel dos polimorfismos de IL-10 em populações saudáveis.

As frequências do haplótipo proximal de IL-10 têm sido bem descritas mundialmente com estudos realizados na Itália (Lio et al, 2002 e Pratesi et al, 2006), Escócia (Munro et al, 2003), Alemanha (Nieters et al, 2006), Estados Unidos (Lazarus et al, 2002), África (van den Bigelaar et al, 2007), China (Wei et al, 2007), Japão (Nakashima et al, 1999) e Brasil (Albuquerque et al 2004 and Moraes et al, 2003), e em alguns casos associados a patologias (Zheng et al, 2001; Breen et al, 2003; Pratesi et al, 2006).

As frequências genóticas do SNP -1082A/G da população controle do presente estudo diferiram da população saudável chinesa descrita por Wei et al (2007), aproximando-se às descritas por um estudo anterior realizado com a população saudável brasileira (Moraes et al, 2003).

Na população de indivíduos saudáveis, a frequência do haplótipo GCC foi menor do que as frequências de ACC e ATA. Estudos mostram frequências de 20% a 34% de GCC em populações européias (Lio et al, 2002; Nieters et al, 2006; Pratesi et al, 2006), enquanto que neste trabalho, foi encontrada uma frequência relativamente menor deste haplótipo (10.1%).

Esse padrão distinto de distribuição entre populações geograficamente diversas dá suporte ao papel evolutivo desempenhado pela IL-10. No Brasil, a exposição a agentes patogênicos é mais recorrente do que em populações de países desenvolvidos. As infecções precoces tornam o indivíduo menos responsivo imunologicamente, diminuindo a necessidade de produção de moléculas anti-inflamatórias como a IL-10. Dessa forma, a população brasileira se beneficia da seleção da baixa frequência de genótipos de alta expressão de IL-10 uma vez que a baixa produção dessa citocina anti-inflamatória facilita a eliminação de patógenos. Por outro lado, em países desenvolvidos onde a exposição aos agentes patogênicos é menos frequente, a resposta imune frente a um agente infeccioso torna-se exacerbada. Por isso, populações residentes de países

afluentes se beneficiam da maior frequência dos genótipos alta expressão de IL-10, a qual estaria atuando como um controlador da resposta imune (alta produção de IL-10 previne a imunopatologia).

A natureza da relação patógeno-hospedeiro é reconhecida como um processo co-evolucionário dinâmico no qual o sistema imune requer adaptação constante e melhoramento no combate a infecção (Ferrer-Admetlla et al, 2008). A IL-10 possui um papel central em calibrar a balança entre a situação patológica e a inflamação (Moore, 2001). O sistema imune de um hospedeiro infectado tem o desafio de responder com intensidade e duração suficientes para o controle e eliminação da infecção e, ao mesmo tempo, minimizar a resposta inespecífica ao tecido lesado. Em diversos modelos animais, os baixos níveis de IL-10 aumentam a resistência da doença enquanto que os altos níveis aumentam a susceptibilidade a patógenos intracelulares (Moore, 2001).

As evidências de que a IL-10 possui um papel em doenças infecciosas em humanos vêm de que os níveis de mRNA de IL-10 estão aumentados em diversas doenças como leishmaniose, malária, filariose e lepra (Ouma et al, 2008; Pereira et al, 2008; Mitre et al, 2008; Reis et al, 2009). Em suma, existem fortes evidências em modelos animais, e significativa confirmação em humanos, de que a produção de IL-10 impõe limites na eficácia da resposta imune a patógenos.

Em relação às questões oncológicas, estes preceitos dão suporte à idéia de que as populações com baixa frequência dos haplótipos de alta expressão de IL-10 poderiam se beneficiar de um ambiente menos imunossupressor e, conseqüentemente, mais imunologicamente competente no reconhecimento e destruição das células neoplásicas.

Os resultados deste estudo reforçam esta idéia: genótipos e haplótipos relacionados à alta produção de IL-10 foram associados tanto ao desenvolvimento do linfoma quanto a pior sobrevida dos pacientes.

7. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi investigado o papel de polimorfismos do promotor do gene da IL-10 na susceptibilidade e resposta terapêutica do LB pediátrico, tendo sido identificado um efeito significativo da variante IL10 -1082G no risco de desenvolver LB, não associado à presença do EBV. A resposta clínica das crianças com LB foi influenciada favoravelmente pela presença do EBV, e desfavoravelmente pela presença da família de haplótipos IL10.3 e o alelo IL10.G12.

Os resultados do estudo caso-controle indicaram um modelo de herança recessivo em que o genótipo -1082 GG e o haplótipo GCC em homozigose contribuíram de maneira significativa ao risco de desenvolvimento de LB ($p=0,0017$ e $p=0,004$, respectivamente). Estes genótipos estiveram super-representados entre os casos e representaram um risco aumentado em 3 vezes de desenvolver a doença.

O grupo de pacientes com LB foi composto por crianças de baixa idade (mediana 5 anos) com proporção de sexos M:F 2,26; sendo a doença avançada (estágios III/IV) mais freqüente (70,3%). Os polimorfismos da IL-10 não apresentaram associações preferenciais com características de apresentação clínica do LB. Entretanto, a combinação de haplótipos GCC/GCC encontrou-se super-representada na classe de idade > de 10 anos ($p = 0,021$), indicando um papel da IL-10 na estruturação etária do grupo estudado.

A distribuição das freqüências alélicas, genotípicas e haplotípicas dos polimorfismos de IL-10 não mostrou diferenças significativas quando os grupos LB EBV+ e EBV- foram

comparados entre si. Quando comparado ao grupo controle, o sub-grupo EBV+ apresentou menor frequência do genótipo -1082AA além da maior frequência de -1082GG observada para o grupo total ($p=0,018$). Foi observada um predomínio de associação com EBV nas crianças menores de 4 anos ($p = 0,008$).

A contribuição relativa do EBV e do genótipo GCC/GCC na estruturação etária do grupo de pacientes foi investigada por métodos multivariados, mostrando o impacto da presença de EBV em crianças menores e de GCC/GCC em crianças maiores de 10 anos. Isto sugere a existência de interações patogênicas idade-dependentes, assim como um efeito do controle genético da infecção pelo EBV.

A resposta à terapia dos pacientes com LB foi analisada quanto às características clínicas, presença do EBV e dos polimorfismos da IL-10. O grupo de risco foi o que melhor distinguiu os pacientes com melhor e pior resposta terapêutica na análise de SLD (92,9% para o GR2 e 69,6% para o GR3, $p=0,097$). A presença do EBV esteve associada a um desfecho favorável (SLD 91,3% vs. 60%; $p=0,021$) e a presença da família IL10.01, caracterizada pelo haplótipo R3-GCC, foi associada a pior sobrevida (SLD 50% vs. 83,3%, $p=0,042$).

A presença do alelo G12 do microssatélite IL10.G mostrou uma pior SLD quando comparados com os pacientes não portadores deste alelo (55,6% vs. 85,2%; $p=0,059$). Seu efeito foi significativo no GR3 em que os portadores do alelo G12 tiveram 33,3% de SLD comparados com os não portadores, que mostraram 81,3% de SLD ($p= 0,034$).

A análise da sobrevida dos pacientes estratificados por grupo de risco, tanto do EBV quanto da família IL10.01, mostrou que o prognóstico conferido por esses fatores refletia a resposta terapêutica do grupo de risco avançado, GR3 e não do GR2.

A interação dos fatores prognósticos EBV e família IL10.01 foi investigada mediante um modelo em que os pacientes foram categorizados em base à presença dos fatores de bom e mau prognóstico. Pacientes EBV+/IL10.01- apresentaram melhores respostas terapêuticas (SLD 92,9%) quando comparados aos pacientes EBV-/IL10.01+ (SLD 25%). Estes resultados mostram o efeito sinérgico dos fatores genéticos e ambientais, indicando a relevância de se validar prospectivamente, em um grupo independente de casos, um “*score*” de risco de recaída considerando a presença destes dois fatores ao diagnóstico.

8. REFERÊNCIAS

1. ALAS, S.; EMMANOUILIDES, C.; BONAVIDA, B. Inhibition of interleukin 10 by rituximab results in down-regulation of bcl-2 and sensitization of B-cell non-Hodgkin's lymphoma to apoptosis. **Clin Cancer Res**, v. 7, p.709-723, 2001.
2. ALBUQUERQUE, A.G. et al. Tumor necrosis factor and interleukin-10 gene promoter polymorphisms in Brazilian population and in Terena Indians. **Transplant Proc**, v. 36, p.825-6, 2004.
3. ANDERTON, E. et al. Two Epstein-Barr virus (EBV) oncoproteins cooperate to repress expression of the proapoptotic tumour-suppressor Bim: clues to the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. **Oncogene**, v. 27, p. 421-433, 2008.
4. ARAÚJO, I. et al. Expression of Epstein-Barr virus gene products in Burkitt's lymphoma in northeast Brazil. **Blood**, v. 87, p.5279-5286, 1996.
5. BALDING, D.J. A tutorial on statistical methods for population association studies. **Nat Rev Genet**, v. 7, p. 781-791, 2006.
6. BALDING, D.J. et al. Genome-wide significance for dense SNP and resequencing data. **Genet Epidemiol**, v. 32, p. 179-85, 2008.
7. BLAY, J.Y. et al. Serum interleukin-10 in non-Hodgkin's lymphoma: a prognostic factor. **Blood**, v. 82, n. 7 p. 2169-2174, 1993.
8. BOWMAN, W.P. et al. Improved survival for children with B-cell acute lymphoblastic leukemia and stage IV small noncleaved-cell lymphoma: a pediatric oncology group study. **J Clin Oncol**, v. 14, p. 1252–1261, 1996.
9. BREEN, E.C. Non-Hodgkin's B cell lymphoma in persons with acquired immunodeficiency syndrome is associated with increased serum levels of IL10, or the IL10 promoter -592 C/C genotype. **Clin Immunol**, v. 109, n. 2, p. 119-129, 2003.
10. BURDIN, N. et al. Epstein-Barr virus transformation induces B lymphocytes to produce human interleukin 10. **J Exp Med**, v. 177, n. 2, p. 295-304. 1993.
11. BURKITT, D.P. Determining the climatic limitations of a children's cancer common in Africa. **Br Med J**, v. 2, p. 1019-1023, 1962.
12. CADAVID, L.F. et al. Evolutionary instability of the major histocompatibility complex class I loci in New World primates. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 94, p.14536-14541, 1997.
13. CAIRO, M.S. et al. Childhood and adolescent large-cell lymphoma (LCL): a review of the Children's Cancer Group experience. **Am J Hematol**, v.72, p. 53-63, 2003.

14. CARBONE, A.; GLOGHINI, A.; DOTTI, G. EBV-associated lymphoproliferative disorders: classification and treatment. **Oncologist**, v. 13, p.577-585, 2008.
15. CAVET, J. et al. Recipient tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms associate with early mortality and acute graft-versus-host disease severity in HLA-matched sibling bone marrow transplants. **Blood**, v. 94, p. 3941-3946, 1999.
16. CERVENAK, L. et al. Abolished angiogenicity and tumorigenicity of Burkitt lymphoma by interleukin-10. **Blood**, v. 9, p. 2568-73, 2000.
17. CINTI, C. et al. Genetic alterations of the retinoblastoma-related gene RB2/p130 identify different pathogenetic mechanisms in and among Burkitt's lymphoma subtypes. **Am J Pathol**, v. 156, p. 751-760, 2000.
18. COOPER, D.N.; NUSSBAUM, R.L.; KRAWCZAK, M. Proposed guidelines for papers describing DNA polymorphism-disease associations. **Hum Genet**, v. 110, p.207-208, 2002.
19. CORDELL, H.J.; CLAYTON, D.G. Genetic association studies. **Lancet**, v.366, p.1121-31, 2005.
20. COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860-7, 2002.
21. COX, D.R. Regression models and life-tables. **J R Stat Soc B**, v. 34, p. 187-220, 1972.
22. CRAWFORD DH, et al. A cohort study among university students: identification of risk factors for Epstein-Barr virus seroconversion and infectious mononucleosis. **Clin Infect Dis**, v. 43, n.3, p. 276-282, 2006.
23. CRAWLEY E, et al. Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 42, p. 1101-1108, 1999.
24. CUNNINGHAM, L.M. et al. Polymorphisms in the interleukin 10 gene promoter are associated with susceptibility to aggressive non-Hodgkin's lymphoma. **Leuk Lymphoma**, v. 44, p. 251-255, 2003.
25. DALLA-FAVERA, R. et al. Translocation and rearrangements of the c-myc oncogene locus in human undifferentiated B-cell lymphomas. **Science**, v. 219, p. 963-967, 1983.
26. DALY, M. et al. High-resolution haplotype structure in the human genome. **Nat Genet.**, v. 29, p. 229-232, 2001.

27. DE THÉ, G. et al. Epidemiological evidence for a causal relationship between Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma: results of the Ugandan prospective study. **Nature**, v. 274, p. 756-761, 1978.
28. DIEBOLD, J. et al. Burkitt lymphoma. In: JAFFE, E.S. et al, eds. World Health Organization classification of tumours, pathology and genetics of haemopoietic and lymphoid tissues. **Lyon: IARC Press**, p.1181-1184, 2001.
29. DOBZHANSKY T. Analysis of incipient reproductive isolation within a species of *Drosophila*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 72, p. 3638-3641, 1975.
30. ESKDALE, J.; GALLAGHER, G. A. Polymorphic dinucleotide repeat in the human IL-10 promoter. **Immunogenetics**, v. 42, p. 444-445, 1995.
31. ESKDALE, J.; KUBE, D.; GALLAGHER, G. A second polymorphic dinucleotide repeat in the 5' flanking region of the human IL10 gene. **Immunogenetics**, v. 45, p. 82-83, 1996.
32. ESKDALE, J. Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. **Immunogenetics**, v. 46, p. 120-128, 1997.
33. ESKDALE, J. et al. Interleukin-10 microsatellite polymorphisms and IL-10 locus alleles in rheumatoid arthritis susceptibility. **Lancet**, v. 352, p. 1282-1283, 1998.
34. ESKDALE, J. et al. Microsatellite alleles and single nucleotide polymorphisms (SNP) combine to form four major haplotype families at the human interleukin-10 (IL-10) locus. **Genes Immun**, v. 1, p. 151-155, 1999.
35. FASSONE, L. et al. The role of cytokines in the pathogenesis and management of AIDS-related lymphomas. **Leuk Lymphoma**, v. 8, p. 481-488, 2000.
36. FENG, W.H. et al. Use of adenovirus vectors expressing Epstein-Barr virus (EBV) immediate-early protein BZLF1 or BRLF1 to treat EBV-positive tumors. **J Virol.**; v. 76, n. 21, p.10951-9, 2002.
37. FENG,W.H. et al. Lytic induction therapy for Epstein-Barr virus-positive B-cell lymphomas. **J Virol**, v. 78, p.1893-902, 2004.
38. FERRER-ADMETLLA, A. et al. Balancing selection is the main force shaping the evolution of innate immunity genes. **J Immunol**, v. 181, n. 2, p. 1315-22, 2008.
39. FERRY, J. A. Burkitt's lymphoma: Clinicopathological features and differential diagnosis. **Oncologist**, v. 11, p. 375-83, 2006.
40. FIFE, M.S. Novel IL10 gene family associations with systemic juvenile idiopathic arthritis. MS, et al. **Arthritis Res Ther**, v. 8, p.148, 2006.
41. FIGUEIRA-SILVA, C.M.; PEREIRA, F.E. Prevalence of Epstein-Barr virus antibodies in healthy children and adolescents in Vitória, State of Espírito Santo, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 37, p. 409-412, 2004.

42. FIORENTINO, D.F.; BOND, M.W.; MOSMANN, T.R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J Exp Med**, v. 170, n.6 p.2081-2095, 1989.
43. FREIDLIN, B. et al. Trend tests for case-control studies of genetic markers: power, sample size and robustness. **Hum Hered**, v. 53, p.146-152, 2002.
44. GERBER, P.; LUCAS, S. Epstein-Barr virus-associated antigens activated in human cells by 5-bromodeoxyuridine. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 141, p. 431-438, 1972.
45. GESER, A. et al. Final case reporting from the Ugandan prospective study of the relationship between EBV and Burkitt's lymphoma. **Int J Cancer**, v. 29, p.397-400, 1982.
46. GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol**, v. 3, p. 23-35, 2003.
47. GROUX, H. et al. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. **Nature**, v. 389, p. 737-742, 1997.
48. GUEDEZ, L. et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 regulation of interleukin-10 in B-cell differentiation and lymphomagenesis. **Blood**, V. 97, p. 1796-1802, 2001.
49. GUTIÉRREZ, M. et al. Switching viral latency to viral lysis: a novel therapeutic approach for Epstein-Barr virus-associated neoplasia. **Cancer Res**, v.56, n. 5, p.969-72, 1996.
50. HAMAJIMA, N. et al. Gene-environment Interactions and Polymorphism Studies of Cancer Risk in the Hospital-based Epidemiologic Research Program at Aichi Cancer Center II (HERPACC-II). **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 2, n. 2, p.99-107, 2001.
51. HARADA, H. et al. Survival factor-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylates BIM, inhibiting its association with BAX and proapoptotic activity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, p. 15313-15317, 2004.
52. HASSAN, R. **Estudos imunomoleculares sobre a patogênese do Linfoma de Burkitt**, Instituto de Biologia-UFRJ, PGG-UFRJ, 2005.
53. HASSAN, R. et al. Epstein-Barr virus (EBV) detection and typing by PCR: a contribution to diagnostic screening of EBV-positive Burkitt's lymphoma. **Diagn Pathol**, v. 7, p. 1-17, 2006.
54. HASSAN, R. et al. Clinical and demographic characteristics of Epstein-Barr virus-associated childhood Burkitt's lymphoma in Southeastern Brazil: epidemiological insights from an intermediate risk region. **Hematologica**, v. 93, p. 780-783, 2008.

55. HELMINEN, M.E.; LAHDENPOHJA, N.; HURME, M. Polymorphism of the interleukin-10 gene is associated with susceptibility to Epstein-Barr virus infection. **J Infect Dis**, v. 180, p. 496-499, 1999.
56. HELMINEN, M.E. et al. Susceptibility to primary Epstein-Barr virus infection is associated with interleukin-10 gene promoter polymorphism. **J Infect Dis**, v. 184, p. 777-780, 2001.
57. HEMANN, M. T. et al. Evasion of the p53 tumour surveillance network by tumour-derived MYC mutants. **Nature**, v. 436, p. 807-811, 2005.
58. HEMANN, M. T.; LOWE S. W. The p53-Bcl-2 connection. **Cell Death Differ**, v. 13, p. 1256-1259, 2006.
59. HENLE, G. et al. Antibodies to Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and controls. **J Natl Cancer Inst**, v. 43, p. 1147-57, 1969.
60. HERBST, H. et al. Frequent expression of interleukin-10 by Epstein-Barr virus-harboring tumor cells of Hodgkin's disease. **Blood**, v. 87, p. 2918-2929, 1996.
61. HETCH, J.; ASTER, J. Molecular biology of Burkitt's lymphoma. **J Clin Oncol**, v. 18, p. 3703, 2000.
62. HILL, W. Estimation of linkage disequilibrium in randomly mating populations. **Heredity**, v. 33, p.229-239, 1974.
63. HIRSCHHORN, J.N.; DALY, M.J. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. **Nat Rev Genet**, v. 6, p. 95-108, 2005.
64. HISLOP, A.D. et al. Cellular responses to viral infection in humans: Lessons from Epstein-Barr Virus. **Annu Rev Immunol**, v. 25, p. 587-561, 2007.
65. HOLLAND, G.; ZLOTNIK, A. Interleukin-10 and cancer. **Cancer Invest**, v. 11, n.6, p.751-758, 1993.
66. HSU, J.L.; GLASER, S.L. Epstein-Barr virus-associated malignancies: epidemiologic patterns and etiologic implications. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 34, p. 27-53, 2000.
67. HUGHES, A.L. The evolution of the type I interferon gene family in mammals. **J. Mol. Evol**, v. 41, p.539-548, 1995.
68. HUGHES, A.L. et al. High level of functional polymorphism indicates a unique role of natural selection at human immune system loci. **Immunogenetics**, v. 57, p.821-827, 2005.
69. HURME, M. Both interleukin-1 and tumor necrosis factor enhance tymphocyte proliferation. **Eur. J. Immunol**, v. 18, p. 1303 – 1306, 1998.
70. HURME, M. et al. IL-10 gene polymorphism and herpesvirus infections. **J Med Virol**, v. 70, p. 48-50, 2003.

71. IARC, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. **Epstein-Barr Virus and Kaposi's Sarcoma Herpesvirus/Human Herpesvirus 8**, v. 70, 1997.
72. ISRAEL, B.F.; KENNEY, S.C. Virally targeted therapies for EBV-associated malignancies. **Oncogene**, v. 22, p. 5122-5130, 2003.
73. ITO, I. et al. Persistent transgene expression following intravenous administration of a liposomal complex: role of interleukin-10-mediated immune suppression. **Mol Ther**, v.3 p.318-327, 2004.
74. JABS, W.J. et al. Immunologic properties of Epstein-Barr virus-seronegative adults. **Infect Dis**, v.173, p.1248-1251, 1996.
75. KAPLAN, E.L.; MEIER, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **J Am Stat Assoc**, v. 53, p. 457-481, 1958.
76. KEARNS, D.B.; SMITH, R.J.; PITCOCK, J.K. Burkitt's lymphoma. **Int J Paediatr Otorhinolaryngol**, v. 12, p. 73-84. 1986.
77. KELLY, G.; BELL, A.; RICKINSON, A. Epstein-Barr virus-associated Burkitt lymphomagenesis selects for downregulation of the nuclear antigen EBNA2. **Nat Med**, v. 8, p. 1098-104, 2002.
78. KELLY, G.L. et al. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2) gene deletion is consistently linked with EBNA3A, -3B, and -3C expression in Burkitt's lymphoma cells and with increased resistance to apoptosis. **J Virol**, v.79, n.16, p.10709-10717, 2005.
79. KELLY, G.L.; RICKINSON, A.B. Burkitt lymphoma: revisiting the pathogenesis of a virus-associated malignancy. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 277-84, 2007.
80. KENNEY, S. Theodore E. Woodward Award: Development of Novel, EBV-Targeted Therapies for EBV-Positive Tumors. **Trans Am Clin Climatol Assoc**, v. 117, p.55-74, 2006.
81. KIEFF, E. Epstein Barr virus and its replication. In KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. eds. **Fields Virology**. **Lippincott-Raven**, Philadelphia, p. 2343-2396, 2001.
82. KILPINEN, S.; HUHTALA, H.; HURME, M. The combination of the interleukin-1alpha (IL-1alpha-889) genotype and the interleukin-10 (IL-10 ATA) haplotype is associated with increased interleukin-10 (IL-10) plasma levels in healthy individuals. **Eur Cytokine Netw**, v. 13, p. 66-71, 2002.
83. KITAGAWA, N. et al. Epstein-Barr virus-encoded poly(A)(-) RNA supports Burkitt's lymphoma growth through interleukin-10 induction. **EMBO J**, v. 19, p.6742-6750, 2000.

84. KLEIN, G.; KLEIN, E. Myc/Ig juxtaposition by chromosomal translocations: some new insights, puzzles and paradoxes. **Immunol**, v. 6, p.208-215, 1985.
85. KLEIN, S.C. et al. Promotion of IL8, IL10, TNF alpha and TNF beta production by EBV infection. **Leuk Res**, v. 20, n. 8, p. 633-636, ago. 1996.
86. KLUMB, C.E. et al. Geographic variation in Epstein-Barr virus-associated Burkitt's lymphoma in children from Brazil. **Int J Cancer**, v. 108, p. 66-70, 2004.
87. KLUMB, C. et al. DNA sequence profile of TP53 gene mutations in childhood B-cell non-Hodgkin's lymphomas: prognostic implications. **Eur J Haematol**, v. 71, p. 81-90, 2003.
88. KLUMB, C. E., et al. Retinoblastoma-related geneRb2/p130 are rarely mutated in Burkitt's lymphoma from Brazil. **Am J Hematol**, v. 82, p. 238-239, 2007.
89. KOSS, K. et al. Cytokine (TNF alpha, LT alpha and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies. **Genes Immun**, v. 1, p. 185-190, 2000.
90. KOSSAKOWSKA, A.E.; URBANSKI S.J.; EDWARDS D.R. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) RNA is expressed at elevated levels in malignant non-Hodgkin's lymphomas. **Blood**, v. 77, p.2475-281, 1991.
91. KUBE, D. et al. Isolation of the human interleukin 10 promoter. Characterization of the promoter activity in Burkitt's lymphoma cell lines. **Cytokine**, v. 7, p. 1-7, 1995.
92. KUBE, D. et al. Structural characterisation of the distal 5' flanking region of the human interleukin-10 gene. **Genes Immun**, v. 2, p. 181-190, 2001.
93. KUBE, D. et al. Simultaneous analysis of interleukin-10 gene microsatellites and single-nucleotide polymorphisms in parallel with tumour necrosis factor and interferon-gamma short tandem repeats by fluorescence-based polymerase chain reaction. **Genes Immun**, v. 4, p. 459-468, 2003.
94. KUBE, D. et al. The interleukin-10 gene promoter polymorphism -1087AG does not correlate with clinical outcome in non-Hodgkin's lymphoma. **Genes Immun**, v. 8, p. 164-167, 2007.
95. KÜPPERS, R. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. **Nat Rev Immunol**, v. 3, p.801-812, 2003.
96. KUROKAWA, M. et al. Azidothymidine inhibits NF-kappaB and induces Epstein-Barrvirus gene expression in Burkitt lymphoma. **Blood**, v. 106, p. 235-240, 2005.
97. LABRECQUE, L.G. et al. Expression of Epstein-Barr virus lytically related genes in African Burkitt's lymphoma: correlation with patient response to therapy. **Int J Cancer**, v. 81, p. 6-11, 1999.

98. LAZARUS, R. et al. Single-nucleotide polymorphisms in the interleukin-10 gene: differences in frequencies, linkage disequilibrium patterns, and haplotypes in three United States ethnic groups. **Genomics**, v. 80 n. 2, p. 223-228, 2002.
99. LEAO, M. et al. Epstein-barr virus-induced resistance to drugs that activate the mitotic spindle assembly checkpoint in Burkitt's lymphoma cells. **J Virol**, v. 81, p.248-260, 2007.
100. LECH-MARANDA, E. et al. Interleukin-10 gene promoter polymorphisms influence the clinical outcome of diffuse large B-cell lymphoma. **Blood**, v.103, p.3529-3534, 2004.
101. LEDER, P. et al. Translocations among antibody genes in human cancer. **Science**, v. 222, p. 765-771, 1983.
102. LEE, J. et al. Interleukin-10 gene polymorphism influences the prognosis of T-cell non-Hodgkin lymphomas. **Br J Haematol**, v. 137, p. 329–336, 2007.
103. LEE, S. et al. Quantitative analysis of single nucleotide polymorphisms within copy number variation. **PLoS ONE**, v. 3, p.1-10, 2008.
104. LEVENS, J.M.; GORDON, J.; GREGORY, C.D. Micro-environmental factors in the survival of human B lymphoma-cells. **Cell Death Differ**, v. 7, p. 59-69, 2000.
105. LEWIS, C. M. Genetic association studies: design, analysis and interpretation. **Brief Bioinform**, v.3, p. 146-153, 2002.
106. LEWONTIN, R.C. The interaction of selection and linkage. II. Optimum models. **Genetics**, v. 50, p. 757-782, 1964.
107. LEWONTIN, R.C.; KOJIMA K. The evolutionary dynamics of complex polymorphisms. **Evolution**, v. 14, n. 4, p. 458–472, 1960.
108. LI, W. Three lectures on case-control genetic association analysis. **Brief Bioinform**, v. 9, p. 1-13. 2008.
109. LIN, S.; CHAKRAVARTI, A.; CUTLER, D.J. Haplotype and missing data inference in nuclear families. **Genome Res**, v. 14, p. 1624-1632, 2004.
110. LINDSTRÖM, M.S.; WIMAN, K.G. Role of genetic and epigenetic changes in Burkitt lymphoma. **Semin Cancer Biol**, v.12, p. 381-387, 2002.
111. LINK, M.P. et al. Results of treatment of childhood localized non-Hodgkin's lymphoma with combination chemotherapy with or without radiotherapy. **N Engl J Med**, v.322, 1169–1174, 1990.
112. LIO, D et al. Gender-specific association between -1082 IL-10 promoter polymorphism and longevity. **Genes Immun**, v.3, n. 1 p. 30-3, 2002.

113. MAGLUTA, E.; KLUMB, C. Treatment resistance in Burkitt's lymphoma: Is it associated with specific mutations of the TP53 gene? **Rev bras hematol hemoter**, v. 30, p. 41-46, 2008.
114. MAGRATH, I.T. Burkitt's lymphoma as a human tumor model: New concepts in etiology and pathogenesis. In Pochedly C (ed): *Pediatric Hematology Reviews*. Westport Prayer, p. 1-51, 1985.
115. MAGRATH, I. The pathogenesis of Burkitt's lymphoma. **Adv Cancer Res**, v. 55, p.133-270, 1990.
116. MAGRATH, I.; JAIN, V.; BHATIA, K. Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma. **Semin Cancer Biol**, v. 3, p. 285–295, 1992.
117. MANTEL, N. Evaluation of survival data and two new rank-order statistics arising in its consideration. **Cancer Chemother Rep**, v.50, p.163-170, 1966.
118. MANTOVANI, A. et al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends Immunol**, v. 23, p. 549-555, 2002.
119. MARSHALL, N.A. et al. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. **Blood**, v.103, p. 1755-1762, 2004.
120. MAYO, O. A century of Hardy-Weinberg equilibrium. **Twin Res Hum Genet**, v.3, p.249-2556, 2008.
121. MILNER, A. E. et al. Apoptosis in Burkitt lymphoma is driven by *c-myc*. **Oncogene**, v. 8, p. 3385-3391, 1993.
122. MITEVA, L.; STANILOVA, S. The combined effect of interleukin (IL)-10 and IL-12 polymorphisms on induced cytokine production. **Hum Immunol**, v. 69, p.562-566, 2008.
123. MITRE, E; CHIEN, D; NUTMAN, T. CD4(+) (and not CD25+) T cells are the predominant interleukin-10-producing cells in the circulation of filaria-infected patients. **J Infect Dis**, v.197, p.94-101, 2008.
124. MOCELLIN, S. et al. The dual role of IL-10. **Trends in immunology**, v. 24, p. 36-43, 2003.
125. MOK, et al. Interleukin-10 promoter polymorphisms in Southern Chinese patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v.41, p. 1090–1095, 1998.
126. MOÑUX-DUCAJÚ, G. et al. Papel de los polimorfismos del promotor del gen de la interleucina-10 en la génesis de los aneurismas de la aorta abdominal. **Angiologia**, v.58, p.279-285, 2006.

127. MOORE, K.W. et al. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. **Science**, v. 248, p. 1230-1234, 1990.
128. MOORE, K.W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunology**, v. 19, p. 683-765, 2001.
129. MORAES, M.O. et al. Interleukin-10 promoter haplotypes are differently distributed in the Brazilian versus the Dutch population. **Immunogenetics**, v.54, p.896-899, 2003.
130. MORLEY, M. et al. Genetic analysis of genomewide variation in human gene expression. **Nature**, v.430, p.743-747, 2004.
131. MÖRMANN, M. et al. Mosaics of gene variations in the interleukin-10 gene promoter affect interleukin-10 production depending on the stimulation used. **Genes Immun**, v.5, p.246-255, 2004.
132. MOSS, D.J. et al. A comparison of Epstein-Barr virus-specific T-cell immunity in malaria-endemic and -nonendemic regions of Papua New Guinea. **Int J Cancer**, v. 31, p.727-732, 1983.
133. MOSS, D.J. et al. The immunology of Epstein-Barr virus infection. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 356, p.475-488, 2001.
134. MUNRO, L.R. et al. Polymorphisms in the interleukin-10 and interferon gamma genes in Hodgkin lymphoma. **Leuk Lymphoma**, v. 44, p. 2083-2088, 2003.
135. MURPHY, S.B. Classification, staging and end-results of treatment of childhood non-Hodgkin's lymphoma - Dissimilarities from lymphoma in adults. **Semin Oncol**, v. 7, p. 332-339, 1980.
136. NAKASHIMA, H et al. Polymorphisms within the interleukin-10 receptor cDNA gene (IL10R) in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. **Rheumatology**, v.38, p. 1142-4, 1999.
137. NIEDOBITEK, G. et al. Heterogeneous expression of Epstein-Barr virus latent proteins in endemic Burkitt's lymphoma. **Blood**, v. 86, p. 659-65, 1995.
138. NIETERS, A. et al. Gene polymorphisms in Toll-like receptors, interleukin-10, and interleukin-10 receptor alpha and lymphoma risk. **Genes Immun**, v. 7, p. 615-624, 2006.
139. NOBLE, K.E. et al. Monocytes stimulate expression of the Bcl-2 family member, A1, in endothelial cells and confer protection against apoptosis. **J Immunol**, v.162, p.1376-1383, 1999.
140. O'GARRA, A. et al. Production of cytokines by mouse B cells: B lymphomas and normal B cells produce interleukin 10. **Int Immunol**, v.2, p.821-832, 1990.

141. OGDEN, C.A. et al. Enhanced apoptotic cell clearance capacity and B cell survival factor production by IL-10-activated macrophages: implications for Burkitt's lymphoma. **J Immunol**, v. 174, p. 3015-3023, 2005.
142. OKEBE, J.U. et al. Therapeutic interventions for Burkitt's lymphoma in children. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 18, 2006.
143. OUMA, C. et al. Haplotypes of IL-10 promoter variants are associated with susceptibility to severe malarial anemia and functional changes in IL-10 production. **Hum Genet**, v.124, p.515-524, 2008.
144. PARKIN, D.M. et al. International incidence of childhood cancer, v.II. **Lyon: IARC**; 1998.
145. PARRA F.C. et al. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, p. 177-82, 2003.
146. PATTE, C. et al. The Societe Francaise d'Oncologie Pediatrique LMB89 protocol: highly effective multiagent chemotherapy tailored to the tumor burden and initial response in 561 unselected children with B-cell lymphomas and L3 leukemia. **Blood**, v. 97, p. 3370–3379, 2001.
147. PATTE, C. Treatment of mature B-ALL and high grade B-NHL in children. **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 15, p.695–711, 2002.
148. PEREIRA, A.C. et al. Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility. **Genes Immun**, 2008.
149. PERERA, F.P. Molecular epidemiology: on the path to prevention? **J Natl Cancer Inst**, v. 92, p. 602-612, 2000.
150. PIMENTA, J.R. et al. Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. **Hum Hered**, v. 62, p. 190-195, 2006.
151. PIZZA, M. et al. Detection of Epstein-Barr virus in children and adolescents with Burkitt's lymphoma by in situ hybridization using tissue microarrays. **Hematology**, v. 13, p. 114-118, 2008.
152. PLENGE, R.; RIOUX, J.D. Identifying susceptibility genes for immunological disorders: patterns, power, and proof. **Immunol Rev**, v. 210, p.40-51, 2006.
153. PRATESI, C. et al. Interleukin-10 and interleukin-18 promoter polymorphisms in an Italian cohort of patients with undifferentiated carcinoma of nasopharyngeal type. **Cancer Immunol Immunother**, v. 55, p.23-30, 2006.
154. PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000.

155. PURCELL, S.; CHERNY, S.S; SHAM, P.C. Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. **Bioinformatics**, v.19, p.149-150, 2003.
156. QUEIROGA, E.M. et al. Viral studies in Burkitt lymphoma: association with Epstein-Barr virus but not HHV-8. **Am J Clin Pathol**, v. 130, p. 186-192, 2008.
157. REIS, L.C. et al. Cellular immune response profile in patients with American tegumentary leishmaniasis prior and post chemotherapy treatment. **J Clin Lab Anal**, v.23, p.63-69, 2009.
158. REITER, A. et al. Non-Hodgkin's lymphomas of childhood and adolescence: results of a treatment stratified for biologic subtypes and stage--a report of the Berlin-Frankfurt-Münster Group. **J Clin Oncol**, v. 13, p. 359-372, 1995.
159. REITER, A. et al. Improved treatment results in childhood B-cell neoplasms with tailored intensification of therapy: A report of the Berlin-Frankfurt-Münster Group Trial NHL-BFM 90. **Blood**, v.94, p.3294-3306, 1999.
160. REUSS, E. et al. Differential regulation of interleukin-10 production by genetic and environmental factors-a twin study. **Genes Immun**, v.3, p.407-413, 2002.
161. RICKINSON, A.B.; KIEFF, E.N. Epstein-Barr virus. In KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. eds. *Fields Virology*. **Lippincott-Raven**, Philadelphia, p. 2575-627, 2001.
162. RISCH, N.; MERIKANGAS, K. The future of genetic studies of complex human diseases. **Science**, v. 273, p.1516-1517, 1996.
163. ROCHFORD, R.; CANNON, M.J.; MOORMANN, A.M. Endemic Burkitt's lymphoma: a polymicrobial disease? **Nature Rev Microbiol**, v. 3, p. 182-7, 2005.
164. ROTINA INTERNA DO INCA: Serviço de Hematologia. / **Ministério da Saúde**. Instituto Nacional do Câncer. – 1ª reimpressão. Rio de Janeiro; INCA, p. 7-18, 2008.
165. ROTHMAN, N. et al. Genetic variation in TNF and IL10 and risk of non-Hodgkin lymphoma: a report from the InterLymph Consortium. **Lancet Oncol**, v. 7, p. 27-38, 2006.
166. ROUSSET, F. et al. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 1, p. 1890-1893, 1992.
167. SACHIDANANDAM, R. et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. **Nature**, v.409, p.928-933, 2001.

168. SAMANTA, M.; IWAKIRI, D.; TAKADA, K. Epstein-Barr virus-encoded small RNA induces IL-10 through RIG-I-mediated IRF-3 signaling. **Oncogene**, v. 27, p. 4150-4160, 2008.
169. SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning, a laboratory manual. 2nd ed. **New York: Cold Spring Harbor**, v. 19, p. 14-19, 1989.
170. SANDLUND, J.T.; DOWNING, J.R.; CRIST, W.M. Non-Hodgkins lymphopma in childhood. **N Engl J Med**, v.334, p. 1238-1248, 1996.
171. SAVILL, J. et al. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. **Nat Rev Immunol**, v. 2, p. 965-975, 2002.
172. SERUGA, B. et al. Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer. **Nat Rev Cancer**, v.11, p. 887-889, 2008.
173. SICA, A. et al. Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages. **J Immunol**, v. 164, p.762-767, 2000.
174. SIXBEY, J.W. et al. Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. **N Engl J Méd**, v. 310, p. 1225-1230, 1984.
175. SNOW, A.L. et al. EBV can protect latently infected B cell lymphomas from death receptor-induced apoptosis. **J Immunol**, v. 177, p. 3283-3293, 2006.
176. STEFANOFF, C.G. et al. Laboratory strategy for efficient handling of paraffin-embedded tissues for molecular detection of clonality in non-Hodgkin lymphomas. **Diag Mol Pathol**, v.12, p.79-87, 2003.
177. STILLER, C.A.; PARKIN, D.M. International variations in the incidence of childhood lymphomas. **Paediatr Perinatal Epidemiol**, v.4, p. 303-324, 1990.
178. SUÁREZ, A. et al. Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphisms. **Transplantation**, v.75, p.711-717, 2003.
179. SWAMINATHAN, S. et al. Epstein-Barr virus recombinants with specifically mutated BCRF1 genes. **J Virol**, v. 67, p.7406-7413, 1993.
180. TEMPLE, S.E. et al. Alleles carried at positions -819 and -592 of the IL10 promoter affect transcription following stimulation of peripheral blood cells with *Streptococcus pneumoniae*. **Immunogenetics**, v. 55, p. 629-632, 2003.
181. THORLEY-LAWSON, D.A.; BABCOCK, G.J. A model for persistent infection with Epstein-Barr virus: the stealth virus of human B cells. **Life Sci**, v. 65, p.1433-1453, 1999.
182. THORLEY-LAWSON, D.A.; GROSS, A. Persistence of the Epstein-Barr virus and the origin of associated lymphomas. **N Eng J Med**, v. 350, p. 1228-37, 2004.

183. THORLEY-LAWSON, D. A.; ALLDAY, M. J. The curious case of the tumour virus: 50 years of Burkitt's lymphoma. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, p. 913-924, 2008.
184. TURNER, D.M. et al. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **Eur J Immunogenet**, v. 24, p. 1-8, 1997.
185. VAN DEN BIGGELAAR, A.H. et al. Genetic variation in IL-10 is associated with atopic reactivity in Gabonese schoolchildren. **J Allergy Clin Immunol**, v. 120, p. 973-975, 2007.
186. VIEIRA, P. et al. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRFI. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, p.1172-1176, 1991.
187. VISENTAINER, J.E. et al. Correlation of IL-6 and IL-10 production following bone marrow transplantation with donor cytokine gene polymorphisms. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v. 30, p. 475-479, 2008.
188. VOORZANGER, N. et al. Interleukin (IL)-10 and IL-6 are produced in vivo by non-Hodgkin's lymphoma cells and act as cooperative growth factors. **Cancer Res**, v. 56, p. 5499-5505, 1996.
189. VUORISTO, M. S. The polymorphisms of interleukin-10 gene influence the prognosis of patients with advanced melanoma. **Cancer Genet Cytogenet**, v.176, p. 54-57, 2007.
190. WAN, X. et al. MegaSNPHunter: a learning approach to detect disease predisposition SNPs and high level interactions in genome wide association study. **BMC Bioinformatics**, v. 10, p.13, 2009.
191. WARLÉ, M.C.; et al. Are cytokine gene polymorphisms related to in vitro cytokine production profiles? **Liver Transpl**, v. 9, n. 2, p.170-181, 2003.
192. WEI Y.S. et al. Interleukin-10 gene promoter polymorphisms and the risk of nasopharyngeal carcinoma. **Tissue Antigens**, v.70, n.1, p.12-17, 2007.
193. WESTENDORP, R.G. et al. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. **Lancet**, v.349, p. 170-173, 1997.
194. YOUNG, L.S.; RICKINSON, A.B. Epstein-Barr virus: 40 years on. **Nature Rev Cancer**, v. 4, p. 757-68, 2004.
195. ZIEGLER, J.L. Chemotherapy of Burkitt's lymphoma. **Cancer**, v. 30, p. 1534-1540, 1972.
196. ZHENG C, et al. Interleukin-10 gene promoter polymorphisms in multiple myeloma. **Int J Cancer**, v. 95, p.184-188, 2001.
197. ZHU, X.; ZHANG S.; KAN D.; COOPER R. Haplotype block definition and its application. **Pac Symp Biocomput**, p.152-63, 2004.

9. Anexos

Anexo I:

- A- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO INCA
- B- FICHA PARA COLETA DE DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES
- C- TABELA DE INICIADORES
- D- COMANDOS DESENHADOS PARA A MODELAGEM GENÉTICA
- E- TAMPÕES, MEIOS E SOLUÇÕES

Anexo II:

- A- ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE IL-10
- B- ANÁLISE DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO
- C- MODELO GENÉTICO
- D- ANÁLISE DE SOBREVIDA DOS PACIENTES COM LINFOMA DE
BURKITT

I.A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO INCA



COORDENAÇÃO DE PESQUISA
Serviço de Pesquisa Clínica
Comitê de Ética em Pesquisa-INCA

Rio de Janeiro, 11 de agosto de 2004

Elana Zalberg Renault
Investigadora Principal

Ref. Proc nº 1004 - Título: Estudos Imunomoleculares sobre a Patogênese de
Linfoma de Burkitt.

Prezada Doutora,

Informo que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer após reunião decidiu **aprovar** o Protocolo intitulado: Estudos Imunomoleculares sobre a Patogênese de Linfoma de Burkitt, bem como seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em 11 de agosto de 2004.

Estamos encaminhando a documentação pertinente para o CONEP, com vistas à análise, registro e arquivamento.

Ateiosamente,

Dr. Luiz Otávio Oliveira
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/INCA

I.B – FICHA PARA COLETA DE DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES**Linfoma Não-Hodgkin – FICHA DE DADOS CLÍNICOS**

Identificação	
Instituição:	Cidade:
Nome:	Matrícula:
Data nascimento:	Data matrícula:
Data diagnóstico:	
Procedência:	
Médico (a) Responsável	

Diagnóstico	
Diagnóstico:	CID 10:
Fator de risco:	
Estadiamento / Subtipo	
Características que justificam o estadiamento /subtipo:	

Tratamento	
Protocolo de Tratamento:	
Início:	

Exames iniciais e de avaliação da doença	
Hemograma:	
Bioquímica:	
Proteínas:	
LDH:	Ácido úrico:
Sorologia viral HIV:	EBV:
HTLV/II:	Hepatite:
CMV:	
Imagem Tórax:	
Imagem Abdome e pelve:	
Imagem face:	
Mielograma:	
Citoquímica:	
Liquor:	
Imunofenotipagem:	
Citogenética:	
Outros:	

Controle dos ciclos de QT	
Data	Ciclo ou período

Avaliação da resposta	
Data:	
Resposta /tipo:	

Último Seguimento: ___/___/___

Status: (1) Vivo sem doença (2) Vivo em tratamento (3) Morto por doença (4) Morto por outras causas (5) Perda de Seguimento Se óbito, data do óbito: ___/___/___

Principais intercorrências	
Data	Intercorrência

I.C – TABELA DE INICIADORES

Tabela C1: Sequências nucleotídicas dos iniciadores utilizados nas reações de PCR.		
Iniciadores	Sequência (5' → 3')	Função na reação
SNP -1082G/A		
JW-F	AGCAACACTCCTCGTCGCAAC	5`conservado
B1	CCTATCCCTACTTCCCCC	Alelo específico: G
B2	CCTATCCCTACTTCCCCT	Alelo específico: A
SNP -592A/C		
-592	GTGACGTGGACAAATTGCCCATTC	5`conservado
-592A	ACACATCCTGTGACCCCGCCTGTA	Alelo específico: A
-592C	ACACATCCTGTGACCCCGCCTGTC	Alelo específico: C
Haplótipos		
-1082A	CTACTAAGGCTTCTTTGGGAA	Haplótipo específico: ACC
-592C	CCAGAGACTGGCTTCCTACAGG	Haplótipo específico: ATA
-819T	GCAAAGTGGAGCACAGAGATA	Haplótipo específico: GCC
-1082A	CTACTAAGGCTTCTTTGGGAA	
-1082G	CTACTAAGGCTTCTTTGGGAG	
-819C	CAAAGTGGAGCACAGAGATG	
IL-10.R		
IL10.R1	GTTTCTGTAGAGATAGGAGGTGGTAAAGTCCA	Sentido
IL10.R2	CCCTCCAAAATCTATTTGCATAAG	Antisentido -5' 6-FAM
EBNA-3C		
EBNA3CS	AGAAGGGGAGCGTGTGTTGT	Tipificação do EBV
EBNA3CAS	GGCTCGTTTTTGACGTCGGC	Sentido
		Antisentido

LD – COMANDOS DESENHADOS PARA A MODELAGEM GENÉTICA DO ESTUDO CASO-CONTROLE NO PROGRAMA R (R Development Core Team, 2006, <http://cran.r-project.org>), PARA O SNP -1082.

```
gc <- c(21, 25, 15, 107, 101, 22)
ac <- c(2*gc[1]+gc[2] , gc[2]+2*gc[3] , 2*gc[4]+gc[5]+2*gc[6])
gc1 <- c(gc[1]+gc[2] , gc[3] , gc[4]+gc[5], gc[6])
gc2 <- c(gc[1] , gc[2]+gc[3] , gc[4] , gc[5]+gc[6])
pvg <- chisq.test( matrix(gc, ncol=3, byrow=T) , corr=FALSE)$p.value
pva <- chisq.test( matrix(ac, ncol=2, byrow=T) , corr=FALSE)$p.value
pvg1 <- chisq.test( matrix(gc1, ncol=2, byrow=T), corr=FALSE)$p.value
pvg2 <- chisq.test( matrix(gc2, ncol=2, byrow=T), corr=FALSE)$p.value
pvb <- min(pvg1, pvg2)

print( c(pvg, pva, pvb)) [1] 5.918590e-03 6.346000e-12 1.738384e-03
pvg.f <- fisher.test( matrix(gc, ncol = 3, byrow = T))$p.value
pva.f <- fisher.test( matrix(ac, ncol=2, byrow=T))$p.value
pvg1.f <- fisher.test( matrix(gc1, ncol=2, byrow=T))$p.value
pvg2.f <- fisher.test( matrix(gc2, ncol=2, byrow=T))$p.value
pvb.f <- min(pvg1, pvg2)
print( c(pvg.f, pva.f, pvb.f)) [1] 9.101980e-03 8.146045e-11 1.738384e-03

pvcat <- prop.trend.test(gc[1:3], gc[1:3]+gc[4:6], score=c(0, 0.5, 1))$p.value
print( c(pvcat) ) [1] 0.005975841
```

I.E. - TAMPÕES, MEIOS E SOLUÇÕES

Os tampões, meios e soluções utilizados foram preparados conforme descrito a seguir:

PBS (10X)

NaCl	85 g
Na ₂ HPO ₄	11,15g
KH ₂ PO ₄	20 g
H ₂ O bidestilada q.s.p.	1000 ml
Filtrar com filtro de 0,2 µm e esterilizar 20 minutos em autoclave a 1atm.	

RCBL

NH ₄ Cl	8.3 g
KHCO ₃	1.0 g
EDTA 5%	1.8 ml
H ₂ O bidestilada qsp	1000 ml

SOLUÇÃO A (Extração de DNA de alto peso molecular)

Solução aquosa de:

Tris-HCl 1M (pH 8.0)	1 ml
EDTA 0,5 M (pH 8.0)	2 ml
NaCl 5M	20 µl
H ₂ O bidestilada q.s.p.	100 ml

TE (1X)

Solução aquosa de:

Tris-HCl 10mM	10 ml
EDTA (pH 8,0) 1mM	2 ml
H ₂ O bidestilada qsp	1000 ml
Ajustar o pH ao valor desejado com HCl concentrado	

TAMPÃO TAE (50X)

Trizma base	242 g
Acido acético glacial	57,1 ml
EDTA 0.5M (pH 8.0)	100 ml
H ₂ O bidestilada q.s.p.	1000 ml

TBS

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Tris base	3 g
H ₂ O bidestilada qsp	1000 ml
Filtrar com filtro de 0,2µm e esterilizar 20 minutos em autoclave a 1atm.	

BCIP

BCIP	1%
DMF	100%

NBT

NBT	1.5%
DMF	70%

SOLUÇÃO ESTOQUE DE ACRILAMIDA (29:1)

Acrilamida	290 g
Bis-acrilamida	10 g
H ₂ O bidestilada q.s.p.	1000 ml
Filtrar com filtro de 0,2 µm.	

TAMPÃO DE AMOSTRA PARA DNA

Solução aquosa de:

Azul de Bromofenol	0,25% (p/v)
Xileno-cianol	0,25% (p/v)
Glicerol	30% (v/v)

TRIS-HCL (1M)

Trizma base	121,1 g
H2O bidestilada qsp	1000 ml
Ajustar o pH ao valor desejado com HCl concentrado	

TAMPÃO NIB

H2O bidestilada estéril	45,75 ml
KCl 1 M	2,5 ml
Tris-HCl (pH 8,0) 1 M	0,5 ml
EDTA 0,5 M	1,0 ml
Tween 20®	0,25 ml

SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO

Acetado de sódio 3M	409 g
H2O bidestilada qsp	1000 ml
Ajustar pH a 5,2 com HCl concentrado	

NaOH 8mM

NaOH	320 g
H2O bidestilada qsp	1000 ml

HEPES 1M

Hepes	238,3 g
H2O bidestilada qsp	1000 ml
Ajustar pH a 7,5 com KOH concentrado	

II.A – ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE IL-10

Tabela A.1: Análise dos polimorfismos de IL-10 por grupo etário nos controles

	Crianças 0-16	Adultos 17-79	<i>p</i>
-1082 A/G			
A	0,73	0,66	0,35
G	0,27	0,34	
AA	37 (52,1%)	70 (44%)	0,299
AG	30 (42,3%)	71 (44,7%)	
GG	4 (5,6%)	18 (11,3%)	
Total	71 (100%)	159 (100%)	
-592 C/A			
C	0,65	0,65	1
A	0,35	0,35	
CC	26 (40%)	67 (44,1%)	0,666
AC	32 (49,2%)	65 (42,8%)	
AA	7 (10,8%)	20 (13,2%)	
Total	65 (100%)	152 (100%)	
Haplótipos			
ACC	0,39	0,31	0,37
ATA	0,35	0,35	
GCC	0,26	0,34	
ACC/ACC	9 (13,8%)	8(5,3%)	0,198
ATA/ATA	7 (10,8%)	20 (13,2%)	
GCC/GCC	4 (6,2%)	18 (11,8%)	
ACC/ATA	20 (30,8%)	39 (25,7%)	
ACC/GCC	13 (20%)	41 (27%)	
ATA/GCC	12 (18,5%)	26 (17,1%)	
Total	65 (100%)	152 (100%)	
Famílias			
F1 (R3-GCC)	8 (9,1%)	34 (14,6%)	0,449
F2 (R2-ACC)	34 (39,1%)	75 (32,4%)	
F3 (R2-GCC)	16 (18,4%)	50 (21,5%)	
F4 (R2-ATA)	29 (33,4%)	73 (31,5%)	
Total	87 (100%)	232 (100%)	

Tabela A.2: Frequências genotípicas do microssatélite IL10G nos controles

Genótipos	N	%	Genótipos	N	%
G6/G6	2	1,2	G8/G13	12	7,1
G6/G8	1	0,6	G9/G9	1	0,6
G6/G9	2	1,2	G9/G10	3	1,8
G6/G10	2	1,2	G9/G11	5	3,0
G6/G12	1	0,6	G9/G12	5	3,0
G6/G13	1	0,6	G9/G13	2	1,2
G7/G7	3	1,8	G10/G10	3	1,8
G7/G8	8	4,8	G10/G12	13	7,7
G7/G9	1	0,6	G10/G13	6	3,6
G7/G10	3	1,8	G10/G14	1	0,6
G7/G11	1	0,6	G11/G11	5	3,0
G7/G12	5	3,0	G11/G12	2	1,2
G7/G13	3	1,8	G11/G13	3	1,8
G8/G8	20	11,9	G12/G12	9	5,4
G8/G9	4	2,4	G12/G13	1	0,6
G8/G10	17	10,1	G12/G14	1	0,6
G8/G11	6	3,6	G13/G13	1	0,6
G8/G12	15	8,9	Total	168	100,0

II.B – ANÁLISE DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

A tabela B.1 mostra as combinações (C) entre os alelos de IL10G e R2 de IL10R possíveis de serem encontradas.

Tabela B.1: Possíveis combinações encontradas entre os alelos de IL10G e R2

C. Genótipos	C. Genótipos
C1. G7G7/R2R2	C2. G7Gx/R2R2
C3. G7G7/R2Rx	C4. GxGx/R2R2
C5. GxGx/R2Rx	C6. GxGx/RxRx
C7. G7Gx/RxRx	C8. G7Gx/R2Rx
C9. G7G7/RxRx	

A combinação 8 (C8) é a única que não pode ser analisada quanto localização cromossômica dos alelos. Desta forma, em 8 combinações foi possível determinar os alelos que um indivíduo carrega em seu cromossomo. Com base nas combinações formadas, foram geradas as seguintes fórmulas:

$$G7R2 = 2C1 + C2 + C3$$

$$G7Rx = C3 + C7 + 2C9$$

$$GxR2 = C2 + 2C4 + C5$$

$$GxRx = C5 + 2C6 + C7$$

Tabela B.2: Combinações observadas entre os alelos de IL10R e IL10G nos controles

C	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14
C1	2	1	10	1	1	4	9	1	-
C2	3	13	30	8	26	12	28	20	2
C3	-	2	7	-	1	-	-	-	-
C4	95	86	60	91	73	84	63	79	98
C5	45	41	17	40	32	44	36	43	48
C6	7	6	2	6	5	7	7	6	7
C7	-	1	2	1	1	-	-	1	-
C8	3	5	24	8	15	4	12	5	-
C9	-	-	3	-	1	-	-	-	-
Total	155	155	155	155	155	155	155	155	155

C, combinações

Tabela B.3: Frequências das combinações alélicas entre os alelos do SNP -1082 e IL10.G

	G	A	D'	R²	p
G6	1 (0,9%)	10 (4,4%)	-0,71	0,08	0,11
G7	9 (8,2%)	18 (7,9%)	0,02		1
G8	30 (27,3%)	74 (32,6%)	-0,09	0,19	0,45
G9	14 (12,7%)	10 (4,4%)	0,38	0,02	0,006
G10	28 (25,5%)	23 (10,1%)	0,33	0,04	0,0003
G11	6 (5,5%)	21 (9,3%)	-0,3	0,003	0,29
G12	17 (15,5%)	44 (19,4%)	-0,33	0,02	0,01
G13	4 (3,6%)	26 (11,5%)	-0,58	0,015	0,02
G14	1 (0,9%)	1 (0,4%)	0,26	0,0008	1
Total	110 (100%)	227 (100%)			
Frequência alélica	0,32	0,68			

II.C- MODELO GENÉTICO

Tabela C1: Comparação das frequências alélicas e genotípicas dos SNPs -1082 e -592 entre pacientes com LB e grupo de crianças controles

Genótipos	Controles (%)	LB (%)	p	OR (IC 95%)
-1082A/G				
A/A	37 (52,1)	21 (34,4)	0,005	0 (Referência)
G/A	30 (42,3)	25 (41)		1,47 (0,69-3,12)
G/G	4 (5,6)	15 (24,6)		6,61 (1,94-22,52)
Total	71 (100)	61 (100)		
Alelos				
A	0,73	0,55	0,184	
G	0,27	0,45		
Modelo Dominante				
AA	37	21	0,041	0,48 (0,239-0,976)
GA/GG	34	40		
Modelo Recessivo				
AA/GA	67	46	0,0019	5,46 (1,704-17,51)
GG	4	15		
Modelo Aditivo				
(Test de Cochran-Armitage)			0,0028	
-592C/A*				
C/C	26 (40)	34 (56,7)	0,17	0 (referência)
A/C	32 (49,2)	22 (36,7)		1,90 (0,90-4,00)
A/A	7 (10,8)	4 (6,7)		2,29 (0,88-2,95)
Total	65 (100)	60 (100)		
Alelos				
C	0,65	0,75	0,00007	
A	0,35	0,25		
Modelo Dominante				
AA	7	4	0,53	0,592 (0,164-2,133)
CA/CC	58	56		
Modelo Recessivo				
AA/CA	39	26	0,062	1,96 (0,962-3,99)
CC	26	34		
Modelo Aditivo				
(Test de Cochran-Armitage)			0,071	

II.D - ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA DOS PACIENTES COM LINFOMA DE BURKITT

Tabela D1: Distribuição dos eventos (recaída, óbito) de acordo ao estadiamento e grupo de risco

Estratificação clínica	N	Recaída		<i>p</i>	Óbito		<i>p</i>
		Sim	Não		Sim	Não	
Estadiamento							
I	4	0	4	0,689	0	4	0,805
II	8	2	6		1	7	
III	16	3	13		3	13	
IV	11	3	8		2	9	
Total	39	8	31		6		
Grupo de risco							
GR1	2	0	2	0,18	0	2	0,405
GR2	14	1	13		1	13	
GR3	23	7	16		5	18	
Total	39	8	31		6*	33	

Teste de χ^2 . *Dos 8 pacientes que recaíram, 6 foram a óbito, 1 foi resgatado com transplante de MO, e 1 com tratamento quimioterápico.

Tabela D2: Sobrevida dos pacientes de acordo a polimorfismos de IL-10

Variável (n)	SG	Eventos/N	Meses*	p**	SLD	Eventos/N	Meses	p**
-1082A/G (38)								
AA	92,3%	1/13	116,8	0,605	92,3%	1/13	114,5	0,35
AG	80%	3/15	149,2		73,3%	4/15	132,4	
GG	80%	2/10	100,7		70%	3/10	88,3	
-592C/A (37)								
CC	77,3%	5/22	78,6	0,409	72,7%	6/22	75,3	0,56
AC	92,3%	1/13	78		84,6%	2/13	79,2	
AA	100%	0/2	79,5		100%	0/2	75	
Haplótipos (36)								
ACC	77,8%	4/18	96,3	0,389	77,8%	4/18	89,2	0,996
ATA	92,9%	1/14	172	0,216	85,7%	2/14	153,8	0,395
GCC	79,2%	5/24	147,5	0,334	70,8%	7/24	127,3	0,161
Família (32)								
IL10.02+	76,5%	4/17	94,8	0,484	76,5%	4/17	87,7	0,824
IL10.02-	86,7%	13/15	105,3		73,3%	4/15	86,8	
IL10.03+	81,3%	3/16	99	0,965	68,8%	5/16	82,4	0,423
IL10.03-	81,3%	3/16	100		81,3%	3/16	93,1	
IL10.04+	92,3%	1/13	113,1	0,18	84,6%	2/13	96,6	0,332
IL10.04-	73,7%	5/19	90,4		68,4%	6/19	82,6	

*Estimação limitada ao maior tempo de sobrevida quando censurado. SG: sobrevida global; SLD: sobrevida livre de doença. ** As análises foram também realizadas após estratificação por Grupo de Risco, nenhum dos resultados tornou-se estatisticamente significativo.