

Rafael Dezen Gaiolla

**Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs)
nos genes codificadores da IL-10, TNF- α e em
NF κ B1 e sua associação com parâmetros
clínicos, laboratoriais e de seguimento de
pacientes com linfoma de Hodgkin clássico**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Patologia da Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título
de Doutor em Patologia

Orientador: Prof. Dr. **Deilson Elgui de Oliveira**

Botucatu, SP

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Gaiolla, Rafael Dezen.

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos genes codificadores da IL-10, TNF-alfa e em NFKB1 e sua associação com parâmetros clínicos, laboratoriais e de seguimento de pacientes com linfoma de Hodgkin clássico / Rafael Dezen Gaiolla. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Deilson Elgui de Oliveira
Capes: 40105008

1. Hodgkin, Doença de. 2. Polimorfismo (Genética). 3. Câncer - Diagnóstico. 4. Expressão gênica.

Palavras-chave: IL-10; Linfoma de Hodgkin; NFKB1; Polimorfismos de nucleotídeo único; TNF-alfa.

DEDICATÓRIA

À minha mulher, PAULA, cujo amor, dedicação e incentivo constantes foram fundamentais para que esse trabalho se tornasse realidade.

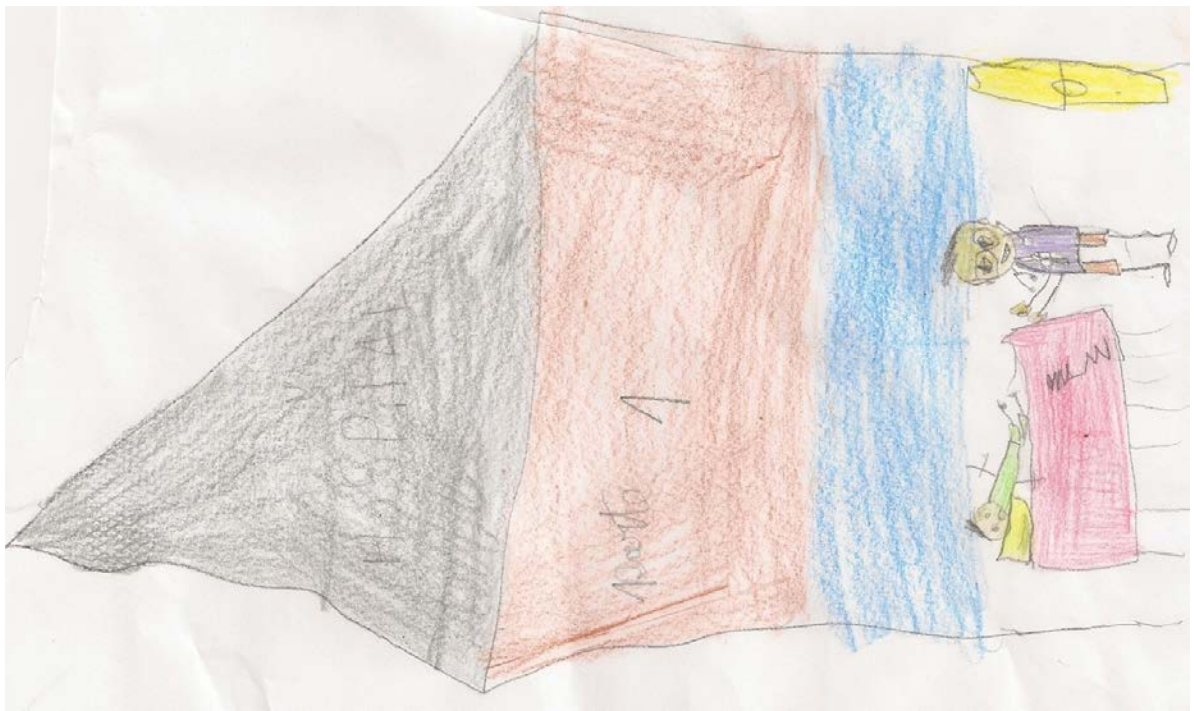
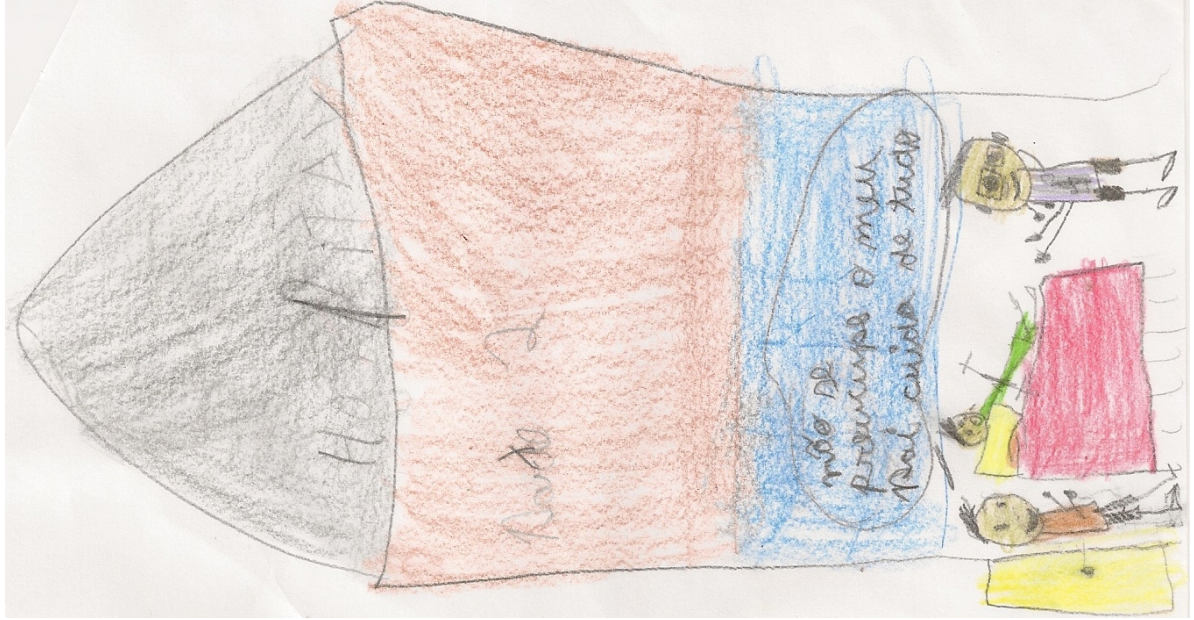
Aos meus filhos, SOFIA e GUILHERME, os maiores presentes que a vida me proporcionou. Espero que, assim como para mim, o trabalho lhes traga prazer e seja repleto de boas conquistas.

Aos meus pais, ANTONIO e TERESINHA, com todo meu amor e respeito. Honestidade, perseverança e dedicação são alguns dos valores ensinados por vocês e que me tornaram a pessoa que sou hoje.

À minha querida irmã Raquel, a quem tanto amo e admiro.

Ao meu querido irmão Paulo, à Paula, Bia e Manu,

À ANGELA, CÓTO, FÁBIO, DENISE, OTÁVIO, e à pequena Isabela, família que tanto amo.



18 de Maio 2015

Quando voce vai ao hospital nao e legal mais no final sempre da
Dentro, porque sempre tem algum que te ajuda em casa e no hospital

HOSPITAL DAS FADAS PORTARIA p1

ESQUECEME MIM
FICA BOA LINDA

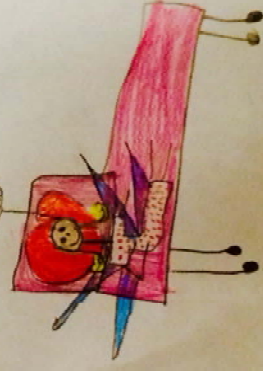
UMA FADA TAO
POFA COMO VOCE TA
SUA RABIDO



HOSPITAL DAS FADAS SALA DE OPERAÇÃO

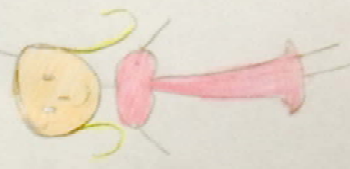
FIQUEM
RELAXO

DEIXOU
MELHOR



CASA

JA ESTOU EM CASA MAIS
DEI RELAXO



Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador, DEILSON ELGUI DE OLIVEIRA. A oportunidade de ser orientado por você foi para mim uma honra. Obrigado pela dedicação, por dividir comigo seus conhecimentos, pelo respeito e por lapidar-me como pesquisador. Acima de tudo, por acreditar em meu trabalho.

À amiga LÍGIA NIÉRO, pelos anos de amizade, pelos preciosos e constantes ensinamentos, pelos valores éticos e pessoais que tanto acreditamos e partilhamos e pelas inúmeras portas que me abriu na carreira profissional. Levarei tudo isso comigo, sempre.

Aos amigos ADRIANA VALENTE FADEL e LUCAS OLIVEIRA CANTADORI. Minha profunda gratidão por todo o suporte. Vocês, literalmente, seguraram a barra nesse período. É um privilégio podermos trabalhar juntos.

AGRADECIMENTOS

Aos membros do VIRICAN (Grupo de Estudos em Carcinogênese Viral e Biologia dos Cânceres) pelo apoio durante o desenvolvimento desse trabalho.

À ANA PAULA FERRAZ DA SILVA, pelo valioso auxílio nos experimentos iniciais.

À Professora MÁRCIA GUIMARÃES DA SILVA, pela sua gentileza, competência e absoluta dedicação para tornar possível a realização do doutorado-sanduíche.

À Dra. ELOISA ELENA PASCHOALINOTTE, aos Professores PAULO RIBOLLA e MARCOS MINICUCCI pelo grande auxílio na realização dos testes estatísticos.

Ao Dr. Marcelo Padovani de Toledo Moraes pela revisão histopatológica dos casos do estudo.

Aos atuais e egressos MÉDICOS RESIDENTES DA HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA, pela amizade, compreensão e pela ajuda na rotina de trabalho, muitas vezes sobrecarregada nos momentos em que me fiz ausente.

Aos FUNCIONÁRIOS DA SECÃO DE QUIMIOTERAPIA, pelo auxílio fundamental no processo de recrutamento dos pacientes e com as coletas dos exames.

Aos FUNCIONÁRIOS DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA pelo auxílio prestado durante a realização desse trabalho.

À EQUIPE DO HEMOCENTRO da Faculdade de Medicina de Botucatu, na pessoa do diretor Dr. JOSÉ MAURO ZANINI, que viabilizou e auxiliou na formação e coleta de exames do grupo-controle deste estudo.

Ao Prof. Dr. CARLOS EDUARDO BACCHI, pela disponibilização do material histopatológico de alguns pacientes desse estudo.

Aos FUNCIONÁRIOS DA PÓS-GRADUAÇÃO e da BIBLIOTECA pela competência, prontidão e gentileza com as quais realizam seu trabalho.

Ao MÁRIO DALLAQUA, do Departamento de Clínica Médica, pelo grande auxílio na formatação dessa tese.

Aos PACIENTES que aceitaram fazer parte desse estudo. A todos minha profunda gratidão e admiração.

Aos grandes amigos David e Lisa Gumieiro, Marcos e Fernanda Minicucci, Luiz Felipe e Luciana Gradella, Andréa e Rodrigo Pedutti por todo o apoio, pelas palavras de incentivo, pelas longas conversas e, acima de tudo, pela amizade sincera.

À CAPES, pela bolsa concedida durante o programa de doutorado-sanduíche.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para que esse trabalho pudesse ser realizado e que não tenham sido mencionados nos agradecimentos acima.

SUMÁRIO

Resumo	1
Summary	3
Capítulo I – Revisão da Literatura.....	5
Linfoma de Hodgkin – Aspectos Gerais	6
Origem das Células H-RS e da Células L&H	8
Patogênese Molecular do LH	9
Apresentação Clínica, Estadiamento e Classificação Prognóstica	11
Tratamento do LH	16
Vírus de Epstein-Barr e LH	19
Citocinas, Quimiocinas e o Microambiente Tumoral no LH	21
Imunogenética no LH	23
Referências Bibliográficas.....	26
Hipótese	42
Objetivos	44
Objetivo Geral	44
Objetivos específicos	44
Capítulo II – Artigo Científico	45
Summary	47
Introduction	48
Methods.....	49
Subjects.....	49
Histopathology, Immunohistochemistry and EBV infection status.....	50
DNA extraction	51
SNPs genotyping by qPCR-HRM.....	51

Statistical methods	52
Results	54
Features of cHL patients	54
Treatment.....	56
Genotype analysis and associations with patient characteristics	56
SNPs/pTNF- α	57
SNPs/pIL-10.....	57
SNP/iNF κ B1.....	58
Genotype analysis and clinical outcome in cHL	66
Discussion.....	69
Acknowledgements.....	73
References.....	74
Conclusão	82
Anexos (Supporting Information)	84

RESUMO

Linfoma de Hodgkin clássico (LHc) é uma neoplasia maligna que apresenta um padrão aberrante de expressão de citocinas, incluindo IL-10 e TNF- α . Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos genes codificadores de IL-10 e TNF- α ou de suas proteínas regulatórias, como NF κ B, podem interferir na patobiologia do LHc. No presente estudo, SNPs nas regiões promotoras dos genes de IL-10 (SNP/pIL-10 -592, rs1800872; e SNP/pIL-10 -1082, rs1800896) e TNF- α (SNP/pTNF- α -238, rs361525; e SNP/pTNF- α -862, rs1800630), assim como na região intrônica do gene NF κ B1 (SNP/iNF κ B1, rs1585215) foram genotipados em 73 pacientes com LHc e avaliados em relação à sua associação com parâmetros prognósticos clínicos e laboratoriais da doença. SNPs/pIL-10 AA foram significativamente associados a maiores contagens de leucócitos e menores valores de linfócitos ao diagnóstico. No caso de TNF- α , SNP/pTNF- α -238 AG foi associado à presença de infecção pelo EBV enquanto SNP/pTNF- α -862 CC apresentou-se mais frequentemente com leucocitose. SNP/iNF κ B1 AA associaram-se à doença em estágio IV e padrão extranodal de apresentação. Entretanto, nenhum dos SNPs avaliados teve efeito no desfecho do tratamento. Esse estudo mostrou que alguns genótipos de SNPs nos genes de IL-10 e TNF- α estão associados a parâmetros prognósticos no LHc. Adicionalmente, pela primeira vez foram descritas associações entre SNP/iNF κ B1 (rs1585215) e aspectos clínicos da doença.

SUMMARY

Classic Hodgkin lymphoma (cHL) is a malignant lymphoid neoplasia that shows aberrant expression of cytokines, including IL-10 and TNF- α . Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes encoding IL-10 and TNF- α or their regulatory proteins, such as NF κ B, may impact cHL pathobiology. In this study, SNPs in the promoter regions of genes encoding for IL-10 (SNP/pIL-10 -592, rs1800872; and SNP/pIL-10 -1082, rs1800896), and TNF- α (SNP/pTNF- α -238, rs361525; and SNP/pTNF- α -862, rs1800630), as well as in the intronic region of the *NF κ B1* gene (SNP/iNF κ B1, rs1585215) were genotyped in 73 patients with cHL and evaluated against clinical and laboratory prognostic parameters for the disease. SNPs/pIL-10 AA were significantly associated with higher leukocyte and lower lymphocyte counts at diagnosis. In case of TNF- α , SNP/pTNF- α -238 AG was associated with EBV infection while SNP/pTNF- α -862 CC presented more frequently with leukocytosis. SNP/iNF κ B1AA generally had stage IV and extranodal disease at diagnosis. Nonetheless, none of the studied SNPs had effect on treatment outcome. This study shows that some SNPs genotypes for IL-10 and TNF- α genes are associated with prognostic parameters in cHL; furthermore, this is the first time that the SNP/iNF κ B1 (rs1585215) was implicated in clinical features of the disease.

CAPÍTULO I – REVISÃO DA LITERATURA

Linfoma de Hodgkin - Aspectos Gerais

O Linfoma de Hodgkin (LH) foi inicialmente descrito em 1832 por Thomas Hodgkin, um médico patologista inglês que relatou os achados da autópsia de 7 pacientes que apresentavam aumentos volumosos de linfonodos e baço (1). Aproximadamente 20 anos depois, casos semelhantes foram descritos por Samuel Wilks (2) e a condição foi definida como entidade. Sua caracterização histopatológica ocorreria alguns anos depois, quando Carl Sternberg (1898) e Dorothy Reed (1902), independentemente descreveram uma célula gigante e multinucleada diagnóstica do LH (3,4) que passou a ser denominada célula de Reed-Sternberg. Posteriormente, formas mononucleares também foram descritas, denominadas células de Hodgkin.

O LH representa aproximadamente 10% do total das neoplasias linfoides, sendo um dos tipos mais comuns de linfoma no ocidente. Segundo informações do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (*National Cancer Institute - NCI*), em 2014 estima-se que tenham sido diagnosticados 9.190 novos casos da doença nos EUA, uma média de 2,7 casos/100.000 habitantes e cerca de 1.180 óbitos associados à doença no período (5). As informações mais atualizadas sobre os indicadores epidemiológicos do LH no Brasil são provenientes do Instituto Nacional do Câncer - INCA, cujas estimativas indicam 1.300 novos casos em homens e 880 em mulheres em 2014 (6). O LH acomete em média 1,4 homens para cada mulher e apresenta padrão bimodal de distribuição segundo a idade nos países desenvolvidos, com o primeiro pico entre a segunda e a terceira décadas de vida e o segundo após a quinta década. Em países em desenvolvimento há tendência de predomínio da incidência entre os 7 e 12 anos de idade e menor incidência em adultos jovens (7).

Conforme proposto em 1994 pela classificação Européia e Americana Revisada de Linfomas (*Revised European-American Lymphoma - REAL*), e atualmente adotado na classificação da Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization - WHO*), de acordo com características histológicas, fenotípicas e moleculares das células neoplásicas o LH é discriminado em duas

entidades: o LH clássico (LHc), que representa 95% dos casos, e o LH predomínio linfocítico nodular (LH-PLN), compreendendo os 5% remanescentes. O LHc é ainda subdividido em LH Esclerose Nodular (LH-EN) e LH Celularidade Mista (LH-CM), que respondem por cerca de 70 e 20% dos casos, respectivamente; há ainda o LH Rico em Linfócitos (LH-RL) e LH Depleção Linfocítica (LH-DL), que juntos representam menos de 10% dos casos (8).

O LH é um câncer histologicamente peculiar, posto que a população de células neoplásicas representa menos de 2% das células no tumor, predominantemente composto por células inflamatórias não-neoplásicas (e.g., linfócitos maduros, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e plasmócitos) e fibroblastos. O componente neoplásico é formado pelas células de Hodgkin ou as de Reed-Sternberg (H-RS), que caracteristicamente têm grande tamanho: células de Hodgkin são mononucleares, com nucléolo proeminente; as de Reed-Sternberg, por sua vez, são multinucleadas e derivam das células de Hodgkin por endomitose. No LH-PLN as células neoplásicas são conhecidas como células linfocíticas e histiocíticas (L&H).

O imunofenótipo das células H-RS é caracterizado pela expressão consistente de CD30, molécula da superfamília dos receptores para o fator de necrose tumoral (*Tumor Necrosis Factor Receptor* - TNFR). CD30 é subsídio importante para o diagnóstico de LHc e geralmente apresenta imunoexpressão em membrana e/ou perinuclear. Cerca de 80% dos casos de LHc também apresenta imunoexpressão de CD15, um marcador de linhagem granulocítica; por outro lado, a imunoexpressão de CD45 (antígeno leucocitário comum) é consistentemente negativa. PAX-5, um fator de transcrição característico de células B, usualmente é expresso nas células H-RS e sua detecção frequentemente é utilizada para discriminar o LHc de alguns linfomas de grandes células T. Células H-RS podem ainda expressar de forma variável CD20 (característico de célula B) e marcadores de outras linhagens celulares, tais como fascina e TARC (marcadores de células dendríticas), CD3, CD4 e granzima B (marcadores de células T), e α 1-antitripsina (encontrado em macrófagos) (9). Células L&H, por outro lado, não expressam CD30 e CD15, mas conservam íntegro o receptor de células B (*B-cell*

receptor - BCR) e outros marcadores típicos dessa linhagem, como CD20, CD79a e proteínas comumente expressas por células B de centro germinativo, além do fator de transcrição Bcl-6. Resumidamente, o diagnóstico de rotina do LH emprega um painel de imunofenotipagem composto minimamente pelos marcadores CD45, CD30, CD15, CD20 e CD3.

Origem das Células H-RS e das Células L&H

A histogênese do LH ficou indefinida por muitas décadas por não se identificar correspondentes em tecidos normais para as células H-RS, que fenotipicamente não se assemelham a nenhuma célula de linhagem hematopoiética. Somente em meados da década de 1990, com o desenvolvimento de tecnologia de microdissecção, foram revelados em células H-RS rearranjos clonais em genes codificadores de regiões variáveis das cadeias leve (*IgV_L*) e pesada (*IgV_H*) de imunoglobulinas (Ig), os quais são caracteristicamente observados em células B. Também foram notadas hipermutações somáticas em genes codificadores de porções variáveis de Ig, normalmente encontradas em células B maduras que sofrem expansão nos centros germinativos após exposição a antígenos. Esses achados coletivamente indicam que células H-RS originam-se em células B de centros germinativos de tecidos linfoides (10,11). Assim sendo, a denominação “Linfoma de Hodgkin” passou a ser empregada em substituição a “Doença de Hodgkin”, comumente utilizada até o final do século XX.

Em aproximadamente 25% dos casos de LHc as mutações somáticas nos genes de Ig causam perda de função principalmente em decorrência de deleções e mutações sem sentido (*nonsense*). Em células B normais do centro germinativo essas mutações causam apoptose. Assim, acredita-se que durante a linfomagenese essas mutações ocorram na célula B antes de sua entrada no centro germinativo, aumentando sua sobrevivência e favorecendo o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que culminam na transformação de células que usualmente seriam eliminadas em virtude de alterações genéticas deletérias (12,13). Em uma pequena parcela de casos do LH (<2%), são demonstrados

rearranjos clonais envolvendo o gene do receptor de célula T (*T cell receptor* - TCR), sugerindo que eventualmente a doença pode ter origem a partir de células T transformadas (14,15).

Embora a maioria dos casos de LHc apresente evidências de origem em células B, células H-RS têm hiporregulação do programa de expressão gênica característico dessa linhagem (16). Tipicamente, apresentam supressão de marcadores específicos de linhagem B (e.g., CD19, CD20, CD45 e CD79a/b) e de fatores de transcrição importantes para a função dessas células (e.g., PU.1, Oct-2 e BOB-1) (17). A razão para esse fenômeno ainda não está elucidada, mas alguns fatores são propostos. Por exemplo, células H-RS comumente expressam moléculas reguladoras da atividade de células T e NK (como Notch 1 e ID2, respectivamente) que suprimem genes relacionados à diferenciação de células B. Adicionalmente, são também cogitados mecanismos baseados em silenciamento epigenético (18) e pressão seletiva durante o processo de apoptose (13,16).

Embora células L&H compartilhem com células H-RS as evidências de rearranjos clonais do gene da IgV e hipermutação somática, células L&H não exibem mutações que proporcionem perda de função e caracteristicamente expressam múltiplos marcadores de linhagem B, incluindo expressão de moléculas tipicamente identificadas em células de centro germinativo, como Bcl-6 (19). O perfil de expressão gênica e imunofenotípico de células L&H sugere que derivem de células B tardias do centro germinativo, transformadas durante a diferenciação de linfócitos B de memória (20). As diferenças entre o LH-PLN e o LHc em termos de comportamento clínico, imunofenótipo e aspectos moleculares são compatíveis com origem distinta para essas neoplasias; ainda assim, o perfil global de expressão das células L&H e H-RS é semelhante, mesmo que nas primeiras não seja comum a perda de expressão de marcadores de células B (9,20).

Patogênese Molecular do LH

Células H-RS apresentam múltiplas anormalidades cromossômicas e

alterações subclonais indicativas de instabilidade genética intrínseca. Ao contrário do que é comumente observado em alguns linfomas não-Hodgkin, não há descrita qualquer alteração citogenética patognomônica ou recorrente no LH. Algumas translocações relatadas envolvem protooncogenes conhecidos (e.g., *BCL1*, *BCL2*, *BCL3*, *BCL6*, *REL* e *MYC*), mas na maior parte dos casos não há comprometimento predominante dos genes mais comumente associados ao desenvolvimento de cânceres humanos (13).

Múltiplas vias de sinalização intracelular podem estar comprometidas no LH e contribuem para inibição de apoptose e proliferação da célula H-RS, além de propiciarem microambiente favorável à manutenção da neoplasia. A via do NF κ B merece destaque, pois sua ativação constitutiva exerce papel central na biologia da célula H-RS (21,22). Essa via é caracterizada pela atividade de fatores de transcrição compostos por homo ou heterodímeros das proteínas p50 (e sua precursora p105), p52 (e sua precursora p100), p65 (RelA), RelB e c-Rel. Na ausência de estímulo, as proteínas de NF κ B mantêm-se no citoplasma em estado inativo pela ligação com as proteínas inibitórias I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ e as proteínas precursoras p105 e p100. A ativação da via de NF κ B pelo estímulo de receptores celulares (incluindo a superfamília de receptores do TNF) resulta em ativação da enzima I κ B-kinase (IKK) e consequente proteólise de I κ Bs. Uma vez livres no citoplasma, os complexos formados pelas proteínas NF κ B acumulam-se no núcleo da célula aonde regulam a expressão de produtos envolvidos na secreção de citocinas pró-inflamatórias, fatores anti-apoptóticos e mitógenos (23). Parcela significativa dos casos de LH apresenta ainda mutações em genes que codificam inibidores de NF κ B (*NFKBIA* e *NFKBIE*) e amplificação de *REL*. Mais recentemente foram descritas mutações que inativam *TNFAIP3*, gene que codifica a proteína A20, uma deubiquitinase que regula negativamente NF κ B, impedindo sua ativação excessiva ou prolongada (24). Adicionalmente, a via NF κ B é explorada pelo EBV, de modo que pode ter particular importância no desenvolvimento do LH associado à infecção viral (25).

A via JAK/STAT também tem importante papel na patogênese do LH. A ativação de receptores de citocinas induz a fosforilação de STATs; que

dimerizadas são translocadas para o núcleo e induzem a expressão de seus genes-alvo (26). Células H-RS exibem ativação de STAT3, STAT5 e STAT6 (27,28) e em 40% dos casos de LH há inativação de SOCS1, um conhecido inibidor da atividade de STATs (29). Adicionalmente, 20% dos pacientes apresentam ganhos cromossômicos de *JAK2* (30,31). Outras vias de sinalização com importante papel na regulação da apoptose e da atividade proliferativa, tais como PI3K e MAPK/ERK, também encontram-se desreguladas nas células H-RS (32,33).

Recentemente o papel de micro RNAs (miRs), pequenos transcritos não-codificantes, tem sido amplamente demonstrado na carcinogênese. Os miRs exercem múltiplas funções biológicas por sua ligação às moléculas de RNA mensageiro (RNAm), invariavelmente ocasionando supressão da expressão gênica em nível pós-transcricional. Diversos miRNAs apresentam expressão desregulada nas células H-RS em comparação às células B normais. Por exemplo, a supressão de miR135a parece contribuir para hiperregulação de *JAK2* (34); aumento da expressão de miR17/106b suprime a função do produto supressor tumoral p21, importante regulador negativo da progressão de ciclo celular (35); adicionalmente, miR155 (altamente expresso em células H-RS) apresenta propriedades oncogênicas pela regulação da expressão de fatores de transcrição da célula B (36). Alguns estudos sugerem que determinados miRs são marcadores prognósticos no LH e podem informar acerca do desfecho pós-tratamento (37,38).

Apresentação Clínica, Estadiamento e Classificação Prognóstica do LH

A apresentação clínica inicial do LH é comumente de linfonodomegalia indolor, geralmente em região cervical ou supraclavicular (60-80% dos casos) e axilar (30-35%), ou massa mediastinal identificada por exames de imagem (60% dos casos). Linfonodos retroperitoneais são acometidos menos frequentemente (30-40% dos casos), assim como os de cadeias ilíacas e inguinais (5-15%). Ao diagnóstico, cerca de 30% dos pacientes têm sintomas constitucionais, incluindo febre vespertina, perda de peso e sudorese noturna

profusa (sintomas B). Sintomas mais raros como prurido generalizado e dor no local de doença ativa induzida pela ingestão de álcool não contribuem no direcionamento do tratamento, mas sua recorrência pode indicar recaída da doença. Manifestações paraneoplásicas neurológicas e dermatológicas são raras, mas podem estar presentes ao diagnóstico (39).

Um melhor entendimento do padrão de apresentação clínica e evolução do LH foi possível graças às informações obtidas de laparotomias exploradoras (previamente utilizadas para estadiamento da doença) e pela avaliação radiológica dos tumores. Evidências sugerem que o LH possivelmente se origina em um pequeno grupo de linfonodos e dissemina-se posteriormente por via linfática aos linfonodos contíguos (40). Entretanto, formas mais agressivas da doença podem ter disseminação de padrão hematogênico em fases precoces, com acometimento secundário de medula óssea, fígado e pulmões. Os locais de acometimento neoplásico inicial parecem ter relação com o subtipo histológico: LH-EN geralmente se manifesta como doença supradiaphragmática e com acometimento mediastinal, enquanto LH-CM e LH-DL têm maior tendência à apresentação envolvendo linfonodos abdominais e fígado (39,40).

A extensão do LH é estimada por meio do já consagrado sistema de estadiamento de Ann Arbor, que se baseia na localização e número de regiões nodais acometidas, subdividindo os pacientes em quatro estádios, acrescidos das letras A ou B de acordo com ausência ou presença de sintomas constitucionais, respectivamente (41). Em 1989, a Conferência de Cotswolds (42) realizou modificações na classificação original, com a incorporação de dados de tomografia computadorizada para o estadiamento, definição de doença volumosa (para qual se atribuiu a letra "X"), e introdução do conceito de remissão completa não confirmada para os casos com massa residual pós-tratamento provavelmente decorrente de fibrose (Quadro 1).

Quadro 1. Estadiamento de Ann Arbor com as modificações de Cotswolds

Estádio	Definição
I	Uma única região nodal ou estrutura linfóide acometida (e.g., baço, timo, anel de Waldeyer)
II	Envolvimento de duas ou mais regiões nodais no mesmo lado do diafragma*
III	Envolvimento de regiões nodais ou estruturas linfóides em ambos os lados do diafragma
IV	Envolvimento de sítio(s) extranodais à distância (não contemplados como "E")

*O mediastino é considerado sítio único e linfonodos hilares são considerados de forma lateralizada. Discriminadores suplementares: A – ausência de sintomas B; B – Presença de sintomas B (febre, sudorese noturna e perda de peso); E – Envolvimento de um sítio extranodal isolado, contíguo ou próximo a um sítio nodal; X – Doença volumosa, definida como massa $\geq 10\text{cm}$ ou $>1/3$ do diâmetro torácico.

O diagnóstico inicial do LH requer biópsia excisional do linfonodo suspeito de acometimento para avaliação morfológica e imunohistoquímica. Quando não é possível realizar exérese linfonodal, pode ser considerada a biópsia em cilindro (*core*) por agulha (43). Entretanto, a aspiração por agulha fina tem uma série de limitações em linfomas em geral, de modo que não é considerada uma técnica adequada para fins diagnósticos também no LH (44).

O estadiamento clínico do LH requer exame físico completo com documentação das medidas das linfonodomegalias e organomegalias e determinação da presença de sintomas B ou outros sintomas associados. A avaliação laboratorial deve contemplar hemograma, função renal, dosagem das enzimas indicadoras de lesão hepática alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase (ALT e AST, respectivamente), desidrogenase láctica (DHL), velocidade de hemossedimentação (VHS), albumina sérica e sorologias para hepatites B, C e HIV, além de teste de gravidez para todas as mulheres em idade fértil. O estadiamento anatômico baseia-se na documentação da presença do LH por métodos de imagem em região cervical, tórax, abdome e pelve, bem como de qualquer outro sítio com suspeita de acometimento neoplásico. A tomografia computadorizada (TC) contrastada é o exame mais utilizado para essa finalidade.

Em verdade, a avaliação imagenológica do LH tem avançado significativamente na última década em virtude de exames de imagem funcionais que permitem a avaliação do metabolismo tumoral pela captação de análogos radiomarcados da glicose (e.g., fluorodeoxiglicose - FDG) pelas células neoplásicas. A tomografia por emissão de pósitrons associada à TC (*Positron Emission*

Tomography-Computed Tomography - PET-CT) atualmente tem papel central no estadiamento do LH, oferecendo maior sensibilidade e especificidade em relação à TC com contraste (45). A maior acurácia no estadiamento evita tratamentos mal dimensionados; adicionalmente, dada sua maior sensibilidade para detecção de atividade tumoral residual e discriminação da fibrose pós-tratamento, o PET-CT contribui na avaliação pós-quimioterapia, especialmente quando há programação de radioterapia para consolidação (21). O emprego de PET-CT para análise de resposta precoce durante o tratamento (PET interino) (46-48) têm sugerido que o exame é importante aliado na avaliação prognóstica do LH, com potencial para possibilitar, por exemplo, estratégia terapêutica individualizada nos casos sem resposta significativa. Entretanto, o papel do PET interino ainda é limitado aos estudos clínicos, posto seus resultados ainda não serem conclusivos. Atualmente, as recomendações vigentes para o estadiamento do LH orientam que sempre que possível o PET-CT deve ser o exame de imagem de escolha na avaliação pré e pós-tratamento (43).

Apesar de historicamente indicada para estadiamento inicial do LH, atualmente a biopsia de medula óssea (BMO) tem sido menos empregada em virtude de elevada sensibilidade do PET-CT na detecção de acometimento neoplásico medular (49,50). Além disso, quando comparada ao exame de imagem, a BMO não altera o estadiamento ou a categorização prognóstica dos pacientes. Assim, não há indicação de realização de BMO para pacientes adequadamente estadiados com PET-CT; do contrário, BMO bilateral deve ser incluída nos exames iniciais de estadiamento (43).

Diversos estudos têm procurado identificar fatores prognósticos clínicos e laboratoriais capazes de prever desfechos relacionados ao tratamento do LH, principalmente com relação à resposta inicial e risco de falha terapêutica (51-53). Entretanto, as características determinantes na estratificação prognóstica dos pacientes continuam sendo a presença de massa volumosa, a extensão da doença segundo o estadiamento e a presença de sintomas B (54). Em conjunto esses fatores discriminam os casos de LH nos grupos de pacientes com doença em **estádio precoce** e aqueles em **estádio avançado**. Tradicionalmente, a

maioria dos centros nos Estados Unidos define, para fins de tratamento, os estádios I-II A ou B como estágio precoce, e os estádios III-IV A ou B e I-II B com doença volumosa como estádios avançados. Na Europa, a Organização Europeia para Pesquisa e Tratamento de Câncer (*European Organization for Research and Treatment of Cancer - EORTC*) e o Grupo Alemão de Estudos sobre o Linfoma de Hodgkin (*German Hodgkin's Lymphoma Study Group - GHSG*) subdividem os pacientes em estágio precoce nos grupos de **estádios precoce favorável** e **precoce desfavorável** (ou intermediário), de acordo com os critérios clínicos e laboratoriais indicados no Quadro 2 (54).

Quadro 2. Estratificação Prognóstica do LH de acordo com EORTC e GHSG

	EORTC	GHSG
Fatores de Risco	A - Massa mediastinal volumosa B - Idade \geq 50 anos C - VHS elevada D - \geq 3 áreas nodais envolvidas	A - Massa mediastinal volumosa B - Doença extranodal C - VHS elevada D - \geq 3 áreas nodais envolvidas
Precoce Favorável	Estádios I-II sem fatores de risco (Doença supradiaphragmática)	Estádios I-II sem fatores de risco
Precoce Desfavorável (Intermediário)	Estádios I-II com \geq 1 fator de risco (Doença supradiaphragmática)	Estádios I, IIA com \geq 1 fator de risco Estádio IIB com fatores de risco C/D
Avançado	Estádio III-IV	Estádio IIB com fatores de risco A/B Estádios III/IV

Massa mediastinal volumosa: \geq 10cm ou $>$ 1/3 do diâmetro torácico; VHS elevada: \geq 50mm/h na ausência de sintomas B e \geq 30 mm/h na presença de sintomas B.

Para o LH avançado, um modelo de estratificação prognóstica denominado Índice Prognóstico Internacional (*International Prognostic Index - IPI*) foi definido com base em fatores clínicos e laboratoriais combinados numa análise multivariada envolvendo dados de 5141 pacientes, posteriormente validado em análises independentes (55). Sete fatores são considerados na avaliação do IPI: albumina sérica menor que 4g/dL, hemoglobina inferior a 10,5g/dL, sexo masculino, idade superior a 45 anos, estágio IV, contagem total de leucócitos igual ou maior que 15.000/mm³ e contagem de linfócitos inferior a 600/mm³ ou menor que 8% do total de leucócitos. A existência de 4 ou mais

desses índices indica tendência a pior prognóstico, explicitado por menor tempo de sobrevida livre de falha de tratamento.

A principal crítica ao IPI é sua baixa sensibilidade para identificação de pacientes de melhor prognóstico entre aqueles com pontuação mais elevada. Além disso, têm sido questionadas sua relevância e aplicabilidade prática frente aos tratamentos mais intensivos disponíveis para pacientes com LH avançado, o que tem limitado o emprego do IPI a estudos clínicos (52). A estratificação dos casos do LH nas categorias de doença precoce, precoce desfavorável e avançada ainda permanece como o modo mais robusto e largamente utilizado para a definição prognóstica e para definição da estratégia terapêutica mais promissora.

Tratamento do LH

O delineamento das diretrizes de tratamento do LH foi concomitante ao desenvolvimento da quimio e radioterapias. O LH era considerado doença fatal no início do século XX, de modo que os tratamentos vigentes na época tinham objetivo essencialmente paliativo. Somente por volta de 1960 foi possível modificar significativamente os desfechos da doença, resultado dos primeiros relatos de remissões completas da neoplasia em decorrência de tratamento radioterápico (56-58). Simultaneamente, a demonstração da sensibilidade do LH à mostarda nitrogenada e outras drogas em combinação sinalizou que a doença era potencialmente curável com a quimioterapia (59).

As décadas de 1970 e 1980 foram marcadas por avanços importantes no tratamento do LH e consolidaram fundamentos para o tratamento oncológico de modo geral. A poliquimioterapia consolidou-se com o estabelecimento de protocolos eficazes como MOPP (mostarda nitrogenada, vincristina, procarbazina e prednisona) e ABVD (doxorubicina, bleomicina, vimblastina e dacarbazina) (60). A radioterapia passou a ser realizada com campos mais restritos de irradiação e em combinação com o tratamento quimioterápico, estabelecendo o seu importante papel como terapia de consolidação (61). Por outro lado, o incremento das taxas de cura do LH ensejou

a observação de efeitos adversos secundários ao tratamento de longo prazo, tais como cardiotoxicidade, infertilidade, menopausa precoce e aumento no risco para neoplasias secundárias. Isso proporcionou mudanças na abordagem terapêutica que norteiam o tratamento do LH na atualidade, tais como a substituição gradual da quimioterapia com agentes alquilantes por esquemas menos tóxicos (baseados em combinações com antraciclinas), e da radioterapia em campo estendido para a radioterapia restrita ao campo envolvido e com menores doses.

Com base no conhecimento acumulado, o tratamento do LH atualmente tem como grande desafio obter máxima eficácia com a menor toxicidade possível. Assim sendo, estudos recentes têm visado identificar marcadores clínicos, histopatológicos e moleculares capazes de agrupar mais adequadamente indivíduos com evolução clínica semelhante (51,62). Isso possibilitaria delinear estratégia terapêutica mais apropriada para o LH, com redução da falha terapêutica precoce e diminuição nas taxas de efeitos adversos a médio e longo prazos para pacientes em estádios precoces, bem como utilização de esquemas mais efetivos para pacientes em estádios avançados da doença.

Diretrizes de tratamento para os diferentes grupos de risco de LH foram estabelecidas nos últimos 20 anos. Para pacientes com LH precoce favorável, a quimioterapia breve com 2 a 4 ciclos de ABVD seguida de radioterapia de campo envolvido é considerado um tratamento seguro, altamente eficaz e com taxa de sobrevida global que ultrapassa 95% (63-65). Em relação ao LH precoce desfavorável, o tratamento-padrão é composto de 4 ciclos de quimioterapia seguidos de radioterapia em campo envolvido (65). Uma série de estudos têm explorado o papel de esquemas quimioterápicos intensificados para esse grupo de pacientes, com o emprego de protocolos como BEACOPP (bleomicina, etoposídeo, adriamicina, ciclofosfamida, vincristina, procarbazina e prednisona), associado ou não ao ABVD (66,67). Entretanto, apesar dos ganhos em termos de tempo livre de falha de tratamento, não se observa vantagem na sobrevida global (68) e sua aplicabilidade deve ser avaliada com cautela, por serem esquemas mais tóxicos. Assim, o melhor regime quimioterápico para pacientes com LH precoce desfavorável ainda não está definido (69).

O tratamento para o LH avançado geralmente consiste em quimioterapia mais prolongada (6 a 8 ciclos), com radioterapia empregada em casos selecionados para consolidação. Os protocolos mais usados são ABVD e BEACOPP com doses escalonadas: o primeiro está associado à sobrevida global entre 70-80%, embora com taxa de recidiva após o tratamento inicial de aproximadamente 40% (70); já o segundo demonstrou superioridade em termos de resposta global, tempo livre de falha de tratamento, com taxas de sobrevida global de aproximadamente 92% em 5 anos e 88% em 10 anos pós tratamento (71). BEACOPP escalonado, entretanto, está associado a elevada toxicidade e maior risco de complicações agudas e tardias, incluindo neoplasias secundárias. Estudos sobre o emprego do PET-CT interino (após 2 ou 4 ciclos de quimioterapia, por exemplo) para direcionar a estratégia terapêutica indicam possibilidade de redução do número de ciclos de quimioterapia e omissão da radioterapia em parcela significativa dos casos (47,72,73). Entretanto, os dados a respeito ainda são insuficientes, de modo que essa abordagem está restrita a estudos clínicos e ainda permanece controverso qual o melhor esquema de tratamento para o LH avançado.

O tratamento de escolha para pacientes com recaída após o primeiro tratamento é quimioterapia de resgate seguida de intensificação com transplante autólogo de células-tronco periféricas, estratégia que tem sobrevida livre de recaída em torno de 60% (74,75). Recaídas subsequentes diminuem significativamente a chance de cura; nessas situações é discutido o emprego de transplante alogênico de medula óssea nos casos de pacientes mais jovens e com doença ainda quimiossensível (75,76).

Para o LH refratário, têm sido avaliadas estratégias de terapia molecular dirigida(77). Esse é o caso do brentuximab-vedotina, um agente quimioterápico sintético (Monometil Auristatina E) complexado a um anticorpo anti-CD30, que gerou respostas globais de até 75% com respostas completas em 34% dos pacientes com LH refratário em estudos de fase I e II (78-80). Essa droga foi aprovada para uso na Europa, EUA e também no Brasil, mais recentemente. Em pacientes virgens de tratamento tem sido avaliado seu

emprego combinado à quimioterapia convencional. Outras opções incluem drogas imunomoduladoras, como a lenalidomida (81), inibidores de mTOR (e.g., everolimus) (82) e inibidores da histona deacetilase (e.g., panobinostat) (83).

Vírus de Epstein-Barr e LH

O vírus de Epstein-Barr (*Epstein-Barr Virus* - EBV), um herpesvírus da subfamília *Gamaherpesvirinae*, é transmitido via secreção oral e infecta mais de 90% da população mundial. A infecção primária é assintomática na maior parte dos casos, mas pode causar a síndrome da mononucleose infecciosa, que tem evolução benigna. O EBV persiste no organismo infectando latentemente linfócitos B sem maiores consequências (84). Entretanto, em pequena parcela dos indivíduos infectados o vírus contribui para o desenvolvimento de neoplasias malignas, incluindo a forma endêmica do linfoma de Burkitt, o LHc e alguns subtipos de linfomas não-Hodgkin, dentre outros cânceres (85)

Estruturalmente, o EBV é composto de um capsídio icosaédrico que contém o genoma viral, composto por DNA de fita dupla com aproximadamente 172Kb. A interação do EBV com a célula B envolve inicialmente interação entre a glicoproteína do envelope viral gp350/220 e a molécula CD21, receptor celular para o fragmento C3d do sistema complemento. Subsequentemente, a entrada do EBV em linfócitos B é mediada pelas glicoproteínas virais, gH, gL e gp42, além de interações com moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex* - MHC). O início de infecção pelo EBV ocorre no tecido linfoide da orofaringe, onde há elevada produção de partículas virais que são liberadas na cavidade oral e infectam linfócitos B *naive*.

O EBV pode estabelecer dois tipos de infecção no linfócito B: lítica, quando há ativa replicação do DNA viral e liberação do virion, ou latente, durante a qual o material genético viral é mantido na forma epissomal. Durante o ciclo latente, a expressão de genes virais é reduzida e restringe-se à expressão dos antígenos nucleares 1, 2, 3A, 3B e 3C (*Epstein-Barr virus Nuclear Antigens* -

EBNAs), das proteínas latentes de membrana 1 e 2a (*Latent Membrane Proteins - LMPs*), dois grupos de micro RNAs (miRNA) virais e dois pequenos RNAs não-codificadores denominados EBERs 1 e 2 (*EBV-encoded RNAs*). A expressão de um número reduzido de proteínas virais dificulta o reconhecimento das células B infectadas pelo sistema imunitário e favorece a persistência do vírus no organismo.

O EBV é capaz de induzir a transformação de células B infectadas *in vitro*. Tal habilidade reflete o potencial oncogênico desse vírus, e sua relação com o desenvolvimento de algumas neoplasias linfóides e epiteliais já está estabelecido. Proteínas de latência viral, principalmente LMP1, EBNA2 e EBNA3C, têm papel bem conhecido na transformação celular induzida pelo EBV: induzem instabilidade genômica por interação com alguns mecanismos de reparo do DNA, atuam em mecanismos de resistência à apoptose e exercem atividade moduladora no microambiente tumoral pela interferência na produção de citocinas, contribuindo assim para a evasão tumoral da resposta imunitária (86).

Embora não completamente compreendido, o papel do EBV na patogênese de parcela dos casos de LHC é atualmente bem estabelecido. Em países ocidentais, o genoma ou produtos do EBV podem ser detectados nas células H-RS em 40-50% dos casos de LHC, notadamente LH-CM e LH-DL (19,87). Praticamente todos os casos de LHC com infecção pelo EBV apresentam mutações deletérias no gene codificador de região variável de imunoglobulinas; isso sugere que o vírus contribui na inibição da apoptose de células B que naturalmente seriam eliminadas na reação de centro germinativo(88). A hibridação *in situ* (HIS) para pesquisa de EBER é o método de escolha para a detecção do EBV em células neoplásicas. Embora menos sensível e potencialmente menos específica, a detecção da proteína viral LMP1 por imunistoquímica também é confiável e tem sido largamente utilizada (89), face a sua menor complexidade operacional e menor custo em comparação à HIS.

As células neoplásicas do LHC latentemente infectadas pelo vírus expressam três proteínas virais (EBNA1, LMP1 e LMP2A - latência tipo II) e dois pequenos RNAs não-codificadores (EBERs e BART). EBNA-1 está expresso em todas

as células infectadas pelo EBV em proliferação e tem papel importante na replicação do epissoma viral e na sua distribuição às células filhas após a duplicação celular. Adicionalmente, EBNA1 participa de maneira direta na patogênese do LH, posto que modula a atração de células T regulatórias para o microambiente tumoral e regula a expressão de genes supressores tumorais nas células H-RS (90,91). LMP1 é a principal oncoproteína viral, com papel crítico na ativação constitutiva de vias de sinalização intracelular reguladoras da proliferação e morte celular, como NF κ B, JAK/STAT e PI3K/AKT (22,32,92). LMP1 mimetiza a sinalização deflagrada pelo receptor CD40 ativado por seu ligando, induzindo a expressão de genes envolvidos na apoptose, progressão de ciclo celular, proliferação e migração celular (93,94). LMP2A, por sua vez, interfere na sinalização deflagrada por BCR, comprometendo a diferenciação de linfócitos B e também contribuindo para aumento da sobrevivência da célula infectada. As sinalizações via CD40 e BCR são fundamentais para a sobrevivência de células B e sua seleção no centro germinativo; assim, por meio da atividade de seus produtos, o EBV se apropria dessas vias para promover sobrevivência das células infectadas a partir do centro germinativo (19). Assim, acredita-se que essas proteínas virais desempenhem papel central no desenvolvimento do LH, como estimuladores da proliferação celular, fatores anti-apoptóticos ou ainda moduladores da resposta imunitária.

Citocinas, Quimiocinas e o Microambiente Tumoral no LH

Citocinas são proteínas de baixo peso molecular secretadas por diferentes tipos celulares e que regulam diversos processos biológicos, notadamente de formas autócrina e parácrina. Quimiocinas, uma grande subclasse de citocinas, são caracteristicamente produzidas por leucócitos e atuam predominantemente no processo de quimioatração, migração e tráfego dessas células nos tecidos em condições normais ou na vigência de inflamação. O microambiente tumoral no LHc é caracterizado pela expressão anormal de diversas dessas moléculas, produzidas tanto pelas células H-RS quanto pelas

células do infiltrado inflamatório, formando uma rede de sinalização que estimula diretamente a proliferação das células neoplásicas, propicia inibição da apoptose e mantém e amplifica a inflamação local (95,96). Além da associação com algumas características clínicas (e.g., sintomas constitucionais, imunossupressão, extensão de doença) e histológicas (fibrose, eosinofilia), algumas citocinas no microambiente tumoral do LHC têm sido relacionadas a desfechos do tratamento, tais como padrão de resposta, falha terapêutica e sobrevida livre de recaída (97-102).

O microambiente tumoral no LHC é composto por uma variedade de células, incluindo linfócitos B e T não neoplásicos, plasmócitos, eosinófilos, mastócitos e macrófagos, além de grande quantidade de fibroblastos e células reticulares. A composição do infiltrado de linfócitos T no LHC indica desbalanço imunológico caracterizado por predomínio de linfócitos T CD4⁺ de fenótipos T auxiliar 2 (T *helper* 2 - Th2) e T regulatório (Treg FoxP3⁺ CD4⁺ CD25⁺), estas últimas geralmente localizadas próximas às células H-RS. Suspeita-se que essas subpopulações linfocitárias tenham papel central na sobrevida das células H-RS, contribuindo para a evasão tumoral da ação de células T citotóxicas (Tc) e células *natural killer* (NK). Linfócitos Th2 e Treg são recrutados por quimiocinas como CCL5, CCL17 e CCL22 secretadas pelas células H-RS. As células neoplásicas também secretam IL-7, que induz a diferenciação de células T CD4⁺ virgens em células Treg; estas, por sua vez, exercem importante atividade imunossupressora pela produção de IL-10 e TGF- β , citocinas que inibem a atividade de linfócitos Tc (21,103).

Outros importantes mecanismos de evasão da resposta imunitária pelas células H-RS incluem hiperexpressão do ligante FAS (CD95L), que induz a apoptose das células Tc; perda de expressão de moléculas do MHC, o que reduz a imunogenicidade das células H-RS; e alta expressão de ligantes do receptor de morte celular programada (*Programmed Death Ligands* - PDLs 1 e 2), que induzem a exaustão e apoptose de células T por intensa ação coestimulatória (103).

Entre as citocinas envolvidas na patogênese do LH, merecem destaque a interleucina 10 (IL-10) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), ambas produzidas pelas células H-RS. A IL-10 tem papel central na imunopatogênese do LH, pois apresenta importante atividade imunossupressora e capacidade de suprimir a resposta Th1 e estimular a resposta Th2. A IL-10 é produzida por linfócitos B, monócitos e macrófagos e antagoniza a produção de citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo IL-6 e TNF- α , interferindo na apresentação de antígenos e inibindo a resposta imunitária celular. Paralelamente, a IL-10 regula o crescimento e diferenciação de linfócitos B, linfócitos Th e Tc e células NK, além de estimular a produção de imunoglobulinas (104). Adicionalmente, a IL-10 aumenta a expressão de Bcl-2 nos linfócitos B, T e células hematopoiéticas exercendo, portanto, efeito protetor contra apoptose induzida por glucocorticóides, doxorrubicina e estados de privação de fatores de crescimento (95,96,105). Estudos demonstram que níveis séricos elevados de IL-10 estão presentes entre 30 a 50% dos pacientes com LH e estão relacionados à doença em estágio mais avançado e menor sobrevida global sendo sua expressão mais frequentemente observada nos casos de LH associados à infecção pelo EBV (97,102,106).

TNF- α , por sua vez, é um importante mediador da inflamação e atua potencializando a atividade fagocítica e microbicida dos macrófagos além de regular a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e IL-6. Sua síntese é feita predominantemente por macrófagos ativados, células NK e linfócitos T ativados (95,107). O TNF- α é normalmente indetectável no soro de indivíduos saudáveis, mas seus níveis estão elevados em condições inflamatórias, infecciosas e em pacientes com alguns tipos de neoplasias (108). A expressão de TNF- α foi demonstrada em linhagens celulares de H-RS (109,110) e aumento dos níveis séricos dessa citocina e sua expressão em tumores primários de LH foram associados a fatores clínicos de prognóstico adverso e pior desfecho após o tratamento (111,112).

Imunogenética no LH

Nos últimos anos tem sido dedicada maior atenção à avaliação do potencial impacto de polimorfismos gênicos na susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças ou como modificadores de sua história natural. Polimorfismos gênicos são definidos pela presença de dois alelos para um determinado gene como resultado de mudanças na sua sequência de nucleotídeos. A forma mais comum de polimorfismo é o polimorfismo de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphism - SNP*), caracterizado pela variação de apenas um nucleotídeo na cadeia de DNA, podendo ser encontrado tanto em regiões codificadoras como não-codificadoras. Em média, SNPs ocorrem a cada 300 a 1.000 pares de bases mas, apesar de frequentes, menos de 1% deve ocasionar alteração do produto gênico. Entretanto, alguns SNPs, principalmente quando localizados na região promotora do gene, podem ter reflexo importante na regulação transcricional e na síntese proteica.

No LH, o estudo dos polimorfismos genéticos e sua contribuição para o aumento de risco e susceptibilidade, assim como seu papel como fator prognóstico, representam uma área emergente e ainda pouco explorada. Sugere-se que familiares de primeiro grau de pacientes com LH apresentem risco aumentado para o desenvolvimento dessa neoplasia (113). De forma semelhante, foi demonstrado que gêmeos monozigóticos de pacientes com LH apresentam chance significativamente maior de desenvolvimento da doença quando comparados a gêmeos dizigóticos (114). Em conjunto, esses achados indicam uma significativa contribuição de componentes geneticamente determinados na susceptibilidade ao desenvolvimento do LH. De fato, polimorfismos na região de HLA (115,116) e nos genes *REL*, *MYC*, *GATA3* (117) parecem alterar o risco para desenvolvimento dessa neoplasia. Adicionalmente, alterações polimórficas em genes relacionados à metabolização de drogas citotóxicas como *GSTP1* e *GSTT1* foram associados a pior evolução clínica no LH (118-120).

A produção das diversas citocinas e fatores de transcrição apresenta variabilidades individuais que são determinadas por fatores constitucionais geneticamente determinados. A presença de alguns polimorfismos em genes de citocinas tem sido relatada como fator modificador da susceptibilidade ao desenvolvimento ou do prognóstico de doenças auto-imunitárias, infecciosas e até mesmo neoplásicas (11-14). Acredita-se que variações em níveis séricos de citocinas determinados por variabilidades genéticas individuais possam influenciar a forma de apresentação clínica, o curso da neoplasia e o padrão de resposta ao tratamento quimioterápico.

Polimorfismos na região promotora do gene da IL-10 (SNP/pIL-10) alteram o processo de transcrição e são considerados responsáveis por variações individuais entre 50 a 75% do nível sérico dessa citocina (121). No LH, níveis séricos aumentados de IL-10 têm sido associados à doença em estágio avançado e pior desfecho após o tratamento (97-99,101,102,106). Os SNPs mais estudados são aqueles situados nas posições -592 (SNP/pIL-10 -592 A/C; rs1800872) e -1082 (SNP/pIL-10 -1082 A/G; rs1800896), numerados a partir do sítio de início da transcrição na região promotora proximal do gene da IL-10 (GeneID 3586). Reuss e colaboradores demonstraram que a presença do alelo A nos SNPs/pIL10 -592 e -1082 diminui a expressão dessa citocina em virtude de maior afinidade para ligação do fator de transcrição PU.1, um conhecido repressor transcricional de IL-10 (121). Esses achados foram reiterados em estudo que avaliou haplótipos mais comuns de SNPs/pIL10 e que revelou menor produção de IL-10 na presença do alelo A (122). De fato, alguns estudos sugerem que a presença do genótipo AA nos SNPs/pIL10 -592 e -1082 estão associados a pior evolução clínica do LH (105,123,124).

De forma semelhante ao observado para IL-10, níveis séricos elevados de TNF- α foram associados a características clínicas de prognóstico adverso e pior desfecho em pacientes com LH (111,112). SNPs nas posições -238 A/G (rs361525) e -862 A/C (rs1800630) na região promotora do gene do TNF- α (GeneID 7124) foram associados a alterações nos níveis séricos dessa citocina, mas estudos acerca das propriedades funcionais desses polimorfismos

apresentaram resultados conflitantes (125-127). Entretanto, sugere-se que a presença do alelo A nos SNPs/pTNF- α -238 e -862 afeta a ligação de proteínas nucleares à região promotora do gene, influenciando a atividade transcricional (126). São escassos, entretanto, dados sobre o papel de SNPs no gene do TNF- α no contexto do LH.

A sinalização pela via de NF κ B modula a expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , de moléculas de adesão e de proteínas anti-apoptóticas (128). Caracteristicamente, NF κ B encontra-se constitutivamente ativada no LHc e influencia não apenas a sobrevivência das células H-RS, mas também a composição do microambiente tumoral (21). Diversas alterações genéticas estão associadas à ativação de NF κ B no LHc, incluindo mutações em genes inibidores (*NF κ BIA* e *NF κ BIE*) (129,130) e ganhos genômicos de *REL* (131). Variações genéticas em *NF κ B1*, que codifica a subunidade p50, foram associadas ao desfecho de condições infecciosas (132), a doenças autoimunitárias (133) e a risco de desenvolvimento de algumas neoplasias (134,135). Por outro lado, polimorfismos em genes de NF κ B no LHc são raramente descritos. Em estudo de base populacional, Chang e colaboradores demonstraram que SNP na região intrônica de *NF κ B1* (rs1585215) foi associado a risco aumentado de desenvolvimento do LH (136).

Referências Bibliográficas

1. Hodgkin. On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. *Medico-Chir Trans.* 1832;17.
2. Wilks S. Cases of lardaceous disease and some allied affections with remarks. *Guy's Hosp Rep.* 1856;2:103-32.
3. Sternberg C. Über einer eigenartige unter dem Blide der Pseudoleukamie velufende Tuberculose des lymphathischem Apparates. *Ztschr Heilk.* 1898;19:21-90.
4. Reed D. On the pathological changes in Hodgkin's disease, with special reference to its relation to tuberculosis. *Johns Hopkins Hosp Rep.* 1902;10:133-96.
5. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010, National Cancer Institute. Bethesda, MD; Available from: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010
6. Instituto Nacional do Câncer - INCA [Internet]. Available from: www.inca.gov.br
7. Mueller NE, Grufferman S, Chang ET. The Epidemiology of Hodgkin Lymphoma. *Hodgkin Lymphoma.* 2nd ed. Philadelphia; 1999. p. 7-23.
8. Swerdlow SH, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008.
9. Schmitz R, Stanelle J, Hansmann M-L, Küppers R. Pathogenesis of classical and lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:151-74.
10. Küppers R, Hansmann M-L. The Hodgkin and Reed/Sternberg cell. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(3):511-7.

11. Marafioti T, Hummel M, Foss H-D, Laumen H, Korbjuhn P, Anagnostopoulos I, et al. Hodgkin and Reed-Sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood*. 2000;95(4):1443-50.
12. Kanzler H, Küppers R, Hansmann M-L, Rajewsky K. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med*. 1996;184(4):1495-505.
13. Küppers R, Engert A, Hansmann M-L. Hodgkin lymphoma. *J Clin Invest*. 2012 Oct 1;122(10):3439-47.
14. Muschen M, Rajewsky K, Brauninger A, Baur AS, Oudejans JJ, Roers A, et al. Rare occurrence of classical Hodgkin's disease as a T cell lymphoma. *J Exp Med*. 2000;191(2):387-94.
15. Seitz V, Hummel M, Marafioti T, Anagnostopoulos I, Assaf C, Stein H. Detection of clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangements in Reed-Sternberg cells of classic Hodgkin disease. *Blood*. 2000;95(10):3020-4.
16. Schwering I. Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2002;101(4):1505-12.
17. Stein H, Marafioti T, Foss HD, Laumen H, Hummel M, Anagnostopoulos I, et al. Down-regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in classical Hodgkin disease but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with immunoglobulin transcription. *Blood*. 2001;97(2):496-501.
18. Ushmorov A. Epigenetic silencing of the immunoglobulin heavy-chain gene in classical Hodgkin lymphoma-derived cell lines contributes to the loss of immunoglobulin expression. *Blood*. 2004;104(10):3326-34.

19. Küppers R. The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer*. 2008;9(1):15-27.
20. Brune V, Tiacci E, Pfeil I, Doring C, Eckerle S, van Noesel CJM, et al. Origin and pathogenesis of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma as revealed by global gene expression analysis. *J Exp Med*. 2008;205(10):2251-68.
21. Matsuki E, Younes A. Lymphomagenesis in Hodgkin lymphoma. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2015 in press.
22. Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D, Bommert K, Mapara MY, Arnold W, et al., others. Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest*. 1997;100(12):2961.
23. Farrell K, Jarrett RF. The molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma: Molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. *Histopathology*. 2011;58(1):15-25.
24. Schmitz R, Hansmann M-L, Bohle V, Martin-Subero JI, Hartmann S, Mechtersheimer G, et al. TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. *J Exp Med*. 2009;206(5):981-9.
25. De Oliveira DE, Ballon G, Cesarman E. NF-kappaB signaling modulation by EBV and KSHV. *Trends Microbiol*. 2010;18(6):248-57.
26. Vainchenker W, Constantinescu SN. JAK/STAT signaling in hematological malignancies. *Oncogene*. 2013;32(21):2601-13.
27. Scheeren FA, Diehl SA, Smit LA, Beaumont T, Naspetti M, Bende RJ, et al. IL-21 is expressed in Hodgkin lymphoma and activates STAT5: evidence that activated STAT5 is required for Hodgkin lymphomagenesis. *Blood*. 2008;111(9):4706-15.

28. Skinnider BF, Elia AJ, Gascoyne RD, Patterson B, Trumper L, Kapp U, et al. Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2002;99(2):618-26.
29. Weniger MA, Melzner I, Menz CK, Wegener S, Bucur AJ, Dorsch K, et al. Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. *Oncogene*. 2006;25(18):2679-84.
30. Joos S, Küpper M, Ohl S, von Bonin F, Mechttersheimer G, Bentz M, et al., others. Genomic imbalances including amplification of the tyrosine kinase gene JAK2 in CD30+ Hodgkin cells. *Cancer Res*. 2000;60(3):549-52.
31. Van Roosbroeck K, Cox L, Tousseyn T, Lahortiga I, Gielen O, Cauwelier B, et al. JAK2 rearrangements, including the novel SEC31A-JAK2 fusion, are recurrent in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2011;117(15):4056-64.
32. Dutton A, Reynolds GM, Dawson CW, Young LS, Murray PG. Constitutive activation of phosphatidylinositol 3 kinase contributes to the survival of Hodgkin's lymphoma cells through a mechanism involving Akt kinase and mTOR. *J Pathol*. 2005;205(4):498-506.
33. Zheng B, Fiumara P, Li YV, Georgakis G, Snell V, Younes M, et al. MEK/ERK pathway is aberrantly active in Hodgkin disease: a signaling pathway shared by CD30, CD40, and RANK that regulates cell proliferation and survival. *Blood*. 2003;102(3):1019-27.
34. Navarro A, Diaz T, Martinez A, Gaya A, Pons A, Gel B, et al. Regulation of JAK2 by miR-135a: prognostic impact in classic Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2009;114(14):2945-51.
35. Gibcus JH, Kroesen B-J, Koster R, Halsema N, de Jong D, de Jong S, et al. MiR-17/106b seed family regulates p21 in Hodgkin's lymphoma. *J Pathol*. 2011;225(4):609-17.

36. Kluiver J, Poppema S, de Jong D, Blokzijl T, Harms G, Jacobs S, et al. BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J Pathol.* 2005;207(2):243-9.
37. Navarro A, Munoz C, Gaya A, Diaz-Beya M, Gel B, Tejero R, et al. MiR-SNPs as markers of toxicity and clinical outcome in Hodgkin lymphoma patients. *PloS One.* 2013;8(5):e64716.
38. Sanchez-Espiridion B, Martin-Moreno AM, Montalban C, Figueroa V, Vega F, Younes A, et al. MicroRNA signatures and treatment response in patients with advanced classical Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol.* 2013;162(3):336-47.
39. Hoppe RT, Mauch PT, Armitage JO, Diehl V, Weiss LM. *Hodgkin Lymphoma.* 2nd ed. Philadelphia; 1999.
40. Mauch PM, Kalish LA, Kadin M, Coleman CN, Osteen R, Hellman S. Patterns of presentation of Hodgkin disease. Implications for etiology and pathogenesis. *Cancer.* 1993;71(6):2062-71.
41. Rosenberg SA, Boiron M, DeVita VT, Johnson RE, Lee BJ, Ultmann JE, et al. Report of the committee on Hodgkin's disease staging procedures. *Cancer Res.* 1971;31(11):1862-3.
42. Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, Glatstein E, Canellos GP, Young RC, et al. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1989;7(11):1630-6.
43. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol.* 2014;32(27):3059-67.
44. Hehn ST. Utility of Fine-Needle Aspiration As a Diagnostic Technique in Lymphoma. *J Clin Oncol.* 2004;22(15):3046-52.

45. Barrington SF, Mikhaeel NG, Kostakoglu L, Meignan M, Hutchings M, Mueller SP, et al. Role of Imaging in the Staging and Response Assessment of Lymphoma: Consensus of the International Conference on Malignant Lymphomas Imaging Working Group. *J Clin Oncol*. 2014;32(27):3048-58.
46. Hutchings M. FDG-PET after two cycles of chemotherapy predicts treatment failure and progression-free survival in Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2006;107(1):52-9.
47. Gallamini A, Rigacci L, Merli F, Nassi L, Bosi A, Capodanno I, et al., others. The predictive value of positron emission tomography scanning performed after two courses of standard therapy on treatment outcome in advanced stage Hodgkin's disease. *haematologica*. 2006;91(4):475-81.
48. Rigacci L, Puccini B, Zinzani PL, Biggi A, Castagnoli A, Merli F, et al. The prognostic value of positron emission tomography performed after two courses (interim-pet) of standard therapy on treatment outcome in early stage hodgkin lymphoma. A multicentric study by the fondazione italiana linfomi (FIL). *Am J Hematol*. 2015;90(6):499-503.
49. El-Galaly TC, d' Amore F, Mylam KJ, de Nully Brown P, Bogsted M, Bukh A, et al. Routine Bone Marrow Biopsy Has Little or No Therapeutic Consequence for Positron Emission Tomography/Computed Tomography-Staged Treatment-Naive Patients With Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2012;30(36):4508-14.
50. Adams HJA, Kwee TC, Fijnheer R, Dubois SV, Nievelstein RAJ, de Klerk JMH. Bone marrow FDG-PET/CT in Hodgkin lymphoma revisited: do imaging and pathology match? *Ann Nucl Med*. 2015;29(2):132-7.
51. Cuccaro A, Bartolomei F, Cupelli E, Galli E, Giachelia M, Hohaus S. Prognostic factors in hodgkin lymphoma. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2014;6(1):e2014053.
52. Connors JM. Risk assessment in the management of newly diagnosed classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2015;125(11):1693-702.

53. Venkataraman G, Mirza MK, Eichenauer DA, Diehl V. Current status of prognostication in classical Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol.* 2014;165(3):287-99.
54. Diehl V, Thomas RK, Re D. Part II: Hodgkin's lymphoma--diagnosis and treatment. *Lancet Oncol.* 2004;5(1):19-26.
55. Hasenclever D, Diehl V. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. *N Engl J Med.* 1998;339(21):1506-14.
56. Eason EC, Russell MH. Cure of Hodgkin's Disease. *Br Med J.* 1963;1(5347):1704-7.
57. PETERS MV, MIDDLEMISS KC. A study of Hodgkin's disease treated by irradiation. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med.* 1958;79(1):114-21.
58. KAPLAN HS. The radical radiotherapy of regionally localized Hodgkin's disease. *Radiology.* 1962;78:553-61.
59. Devita VTJ, Serpick AA, Carbone PP. Combination chemotherapy in the treatment of advanced Hodgkin's disease. *Ann Intern Med.* 1970;73(6):881-95.
60. Bonadonna G, Zucali R, Monfardini S, De Lena M, Uslenghi C. Combination chemotherapy of Hodgkin's disease with adriamycin, bleomycin, vinblastine, and imidazole carboxamide versus MOPP. *Cancer.* 1975;36(1):252-9.
61. Armitage JO. Early-stage Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 2010;363(7):653-62.
62. Gascoyne RD, Rosenwald A, Poppema S, Lenz G. Prognostic biomarkers in malignant lymphomas. *Leuk Lymphoma.* 2010;51(S1):11-9.
63. Engert A, Plütschow A, Eich HT, Lohri A, Dörken B, Borchmann P, et al. Reduced treatment intensity in patients with early-stage Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 2010;363(7):640-52.

64. Meyer RM, Hoppe RT. Point/counterpoint: early-stage Hodgkin lymphoma and the role of radiation therapy. *ASH Educ Program Book*. 2012;2012(1):313-21.
65. Ferme C, Eghbali H, Meerwaldt JH, Rieux C, Bosq J, Berger F, et al. Chemotherapy plus involved-field radiation in early-stage Hodgkin's disease. *N Engl J Med*. 2007;357(19):1916-27.
66. Eich HT, Diehl V, Gorgen H, Pabst T, Markova J, Debus J, et al. Intensified chemotherapy and dose-reduced involved-field radiotherapy in patients with early unfavorable Hodgkin's lymphoma: final analysis of the German Hodgkin Study Group HD11 trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2010;28(27):4199-206.
67. Noordijk EM, Thomas J, Ferme C, van 't Veer MB, Brice P, Divine M, et al. First results of the EORTC-GELA H9 randomized trials: the H9-F trial (comparing 3 radiation dose levels) and H9-U trial (comparing 3 chemotherapy schemes) in patients with favorable or unfavorable early stage Hodgkin's lymphoma (HL). *ASCO Meet Abstr*. 2005;23(16_suppl):6505.
68. Von Tresckow B, Plutschow A, Fuchs M, Klimm B, Markova J, Lohri A, et al. Dose-Intensification in Early Unfavorable Hodgkin's Lymphoma: Final Analysis of the German Hodgkin Study Group HD14 Trial. *J Clin Oncol*. 2012;30(9):907-13.
69. Eichenauer DA, Engert A. Advances in the treatment of Hodgkin lymphoma. *Int J Hematol*. 2012;96(5):535-43.
70. Glick JH, Young ML, Harrington D, Schilsky RL, Beck T, Neiman R, et al. MOPP/ABV hybrid chemotherapy for advanced Hodgkin's disease significantly improves failure-free and overall survival: the 8-year results of the intergroup trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1998;16(1):19-26.

71. Engert A, Diehl V, Franklin J, Lohri A, Dörken B, Ludwig W-D, et al. Escalated-dose BEACOPP in the treatment of patients with advanced-stage Hodgkin's lymphoma: 10 years of follow-up of the GHSG HD9 study. *J Clin Oncol*. 2009;27(27):4548-54.
72. Evens AM, Kostakoglu L. The role of FDG-PET in defining prognosis of Hodgkin lymphoma for early-stage disease. *Blood*. 2014;124(23):3356-64.
73. Adams HJA, Nievelstein RAJ, Kwee TC. Prognostic value of interim FDG-PET in Hodgkin lymphoma: systematic review and meta-analysis. *Br J Haematol*. 2015;170(3):356-66.
74. Schmitz N, Pfistner B, Sextro M, Sieber M, Carella AM, Haenel M, et al. Aggressive conventional chemotherapy compared with high-dose chemotherapy with autologous haemopoietic stem-cell transplantation for relapsed chemosensitive Hodgkin's disease: a randomised trial. *Lancet*. 2002;359(9323):2065-71.
75. Perales M-A, Ceberio I, Armand P, Burns LJ, Chen R, Cole PD, et al. Role of Cytotoxic Therapy with Hematopoietic Cell Transplantation in the Treatment of Hodgkin Lymphoma: Guidelines from the American Society for Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2015;21(6):971-83
76. Sarina B, Castagna L, Farina L, Patriarca F, Benedetti F, Carella AM, et al. Allogeneic transplantation improves the overall and progression-free survival of Hodgkin lymphoma patients relapsing after autologous transplantation: a retrospective study based on the time of HLA typing and donor availability. *Blood*. 2010;115(18):3671-7.
77. Von Tresckow B, Diehl V. An update on emerging drugs for Hodgkin lymphoma. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2014;19(2):215-24.
78. Graf SA, Gopal AK. Treatment of relapsed classical Hodgkin lymphoma in the brentuximab vedotin era. *Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2014;2014(1):151-7.

79. Younes A, Gopal AK, Smith SE, Ansell SM, Rosenblatt JD, Savage KJ, et al. Results of a Pivotal Phase II Study of Brentuximab Vedotin for Patients With Relapsed or Refractory Hodgkin's Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2012;30(18):2183-9.
80. Younes A. Brentuximab Vedotin for the Treatment of Patients with Hodgkin Lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2014;28(1):27-32.
81. Fehniger TA, Larson S, Trinkaus K, Siegel MJ, Cashen AF, Blum KA, et al. A phase 2 multicenter study of lenalidomide in relapsed or refractory classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2011;118(19):5119-25.
82. Meadows SA, Vega F, Kashishian A, Johnson D, Diehl V, Miller LL, et al. PI3Kdelta inhibitor, GS-1101 (CAL-101), attenuates pathway signaling, induces apoptosis, and overcomes signals from the microenvironment in cellular models of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2012;119(8):1897-900.
83. A phase I study of panobinostat in combination with ICE (Ifosfamide, Carboplatin and Etoposide) in patients with relapsed or refractory classical Hodgkin lymphoma (cHL). *Clin Adv Hematol Oncol HO*. 2014;12(2 Suppl 6).
84. Cohen JI. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med*. 2000;343(7):481-92.
85. Vockerodt M, Yap L-F, Shannon-Lowe C, Curley H, Wei W, Vrzalikova K, et al. The Epstein-Barr virus and the pathogenesis of lymphoma: EBV and lymphomas. *J Pathol*. 2015;235(2):312-22.
86. Elgui de Oliveira D. DNA viruses in human cancer: an integrated overview on fundamental mechanisms of viral carcinogenesis. *Cancer Lett*. 2007;247(2):182-96.
87. Ambinder RF. Epstein-barr virus and hodgkin lymphoma. *ASH Educ Program Book*. 2007;2007(1):204-9.
88. Bräuninger A, Schmitz R, Bechtel D, Renné C, Hansmann M-L, Küppers R. Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer*. 2006;118(8):1853-61.

89. Gulley ML, Glaser SL, Craig FE, Borowitz M, Mann RB, Shema SJ, et al. Guidelines for interpreting EBER in situ hybridization and LMP1 immunohistochemical tests for detecting Epstein-Barr virus in Hodgkin lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2002;117(2):259-67.
90. Baumforth KRN, Birgersdotter A, Reynolds GM, Wei W, Kapatai G, Flavell JR, et al. Expression of the Epstein-Barr Virus-Encoded Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 in Hodgkin's Lymphoma Cells Mediates Up-Regulation of CCL20 and the Migration of Regulatory T Cells. *Am J Pathol*. 2008;173(1):195-204.
91. Flavell JR, Baumforth KR, Wood VH, Davies GL, Wei W, Reynolds GM, et al., others. Down-regulation of the TGF-beta target gene, PTPRK, by the Epstein-Barr virus-encoded EBNA1 contributes to the growth and survival of Hodgkin lymphoma cells. *Blood*. 2008;111(1):292-301.
92. Kube D, Holtick U, Vockerodt M, Ahmadi T, Haier B, Behrmann I, et al. STAT3 is constitutively activated in Hodgkin cell lines. *Blood*. 2001;98(3):762-70.
93. Lavorgna A, Harhaj EW. EBV LMP1: New and shared pathways to NF- B activation. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109(7):2188-9.
94. Raab-Traub N. Novel mechanisms of EBV-induced oncogenesis. *Curr Opin Virol*. 2012;2(4):453-8.
95. Skinnider BF. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2002;99(12):4283-97.
96. Steidl C, Connors JM, Gascoyne RD. Molecular Pathogenesis of Hodgkin's Lymphoma: Increasing Evidence of the Importance of the Microenvironment. *J Clin Oncol*. 2011;29(14):1812-26.
97. Vassilakopoulos TP, Nadali G, Angelopoulou MK, Siakantaris MP, Dimopoulou MN, Kontopidou FN, et al. Serum interleukin-10 levels are an independent prognostic factor for patients with Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 2001;86(3):274-81.

98. Kowalska M, Tajer J, Chechlinska M, Fuksiewicz M, Kotowicz B, Syczewska M, et al. Discriminant analysis involving serum cytokine levels and prediction of the response to therapy of patients with Hodgkin lymphoma. *Tumor Biol.* 2012;33(5):1733-8.
99. Gaiolla RD, Domingues MAC, Niéro-Melo L, de Oliveira DE. Serum levels of interleukins 6, 10, and 13 before and after treatment of classic Hodgkin lymphoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(4):483-9.
100. Hohaus S, Giachelia M, Massini G, Vannata B, Criscuolo M, Martini M, et al. Clinical significance of interleukin-10 gene polymorphisms and plasma levels in Hodgkin lymphoma. *Leuk Res.* 2009;33(10):1352-6.
101. Marri PR, Hodge LS, Maurer MJ, Ziesmer SC, Slager SL, Habermann TM, et al. Prognostic Significance of Pretreatment Serum Cytokines in Classical Hodgkin Lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2013;19(24):6812-9.
102. Sarris AH, Kliche KO, Pethambaram P, Preti A, Tucker S, Jackow C, et al. Interleukin-10 levels are often elevated in serum of adults with Hodgkin's disease and are associated with inferior failure-free survival. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO.* 1999;10(4):433-40.
103. Aldinucci D, Gloghini A, Pinto A, De Filippi R, Carbone A. The classical Hodgkin's lymphoma microenvironment and its role in promoting tumour growth and immune escape. *J Pathol.* 2010;221(3):248-63.
104. Acuner-Ozbabacan ES, Engin BH, Guven-Maiorov E, Kuzu G, Muratcioglu S, Baspinar A, et al. The structural network of Interleukin-10 and its implications in inflammation and cancer. *BMC Genomics.* 2014;15(Suppl 4):S2.
105. Hohaus S, Giachelia M, Di Febo A, Martini M, Massini G, Vannata B, et al. Polymorphism in cytokine genes as prognostic markers in Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol.* 2007;18(8):1376-81.
106. Herling M, Rassidakis GZ, Medeiros LJ, Vassilakopoulos TP, Kliche K-O, Nadali G, et al. Expression of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1

- in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's lymphoma: associations with presenting features, serum interleukin 10 levels, and clinical outcome. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2003;9(6):2114-20.
107. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol.* 1992;10:411-52.
108. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol.* 2008;214(2):149-60.
109. Maggio E, van den Berg A, Diepstra A, Kluiver J, Visser L, Poppema S. Chemokines, cytokines and their receptors in Hodgkin's lymphoma cell lines and tissues. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO.* 2002;13 Suppl 1:52-6.
110. Nakayama S, Yokote T, Tsuji M, Akioka T, Miyoshi T, Hirata Y, et al., others. Expression of tumour necrosis factor- α and its receptors in Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol.* 2014;167(4):574-7.
111. Casasnovas R-O, Mounier N, Brice P, Divine M, Morschhauser F, Gabarre J, et al. Plasma cytokine and soluble receptor signature predicts outcome of patients with classical Hodgkin's lymphoma: a study from the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2007;25(13):1732-40.
112. Warzocha K, Bienvenu J, Ribeiro P, Moullet I, Dumontet C, Neidhardt-Berard EM, et al. Plasma levels of tumour necrosis factor and its soluble receptors correlate with clinical features and outcome of Hodgkin's disease patients. *Br J Cancer.* 1998;77(12):2357.
113. Goldin LR, Pfeiffer RM, Gridley G, Gail MH, Li X, Mellekjaer L, et al. Familial aggregation of Hodgkin lymphoma and related tumors. *Cancer.* 2004;100(9):1902-8.
114. Mack TM, Cozen W, Shibata DK, Weiss LM, Nathwani BN, Hernandez AM, et al. Concordance for Hodgkin's disease in identical twins suggesting genetic

- susceptibility to the young-adult form of the disease. *N Engl J Med.* 1995;332(7):413-9.
115. Klitz W, Aldrich CL, Fildes N, Horning SJ, Begovich AB. Localization of predisposition to Hodgkin disease in the HLA class II region. *Am J Hum Genet.* 1994;54(3):497.
 116. Niens M, Jarrett RF, Hepkema B, Nolte IM, Diepstra A, Platteel M, et al. HLA-A*02 is associated with a reduced risk and HLA-A*01 with an increased risk of developing EBV+ Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2007;110(9):3310-5.
 117. Enciso-Mora V, Broderick P, Ma Y, Jarrett RF, Hjalgrim H, Hemminki K, et al. A genome-wide association study of Hodgkin's lymphoma identifies new susceptibility loci at 2p16.1 (REL), 8q24.21 and 10p14 (GATA3). *Nat Genet.* 2010;42(12):1126-30.
 118. Hohaus S, Massini G, D'Alo' F, Guidi F, Putzulu R, Scardocci A, et al. Association between glutathione S-transferase genotypes and Hodgkin's lymphoma risk and prognosis. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2003;9(9):3435-40.
 119. Hohaus S, Di Ruscio A, Di Febo A, Massini G, D'Alo F, Guidi F, et al. Glutathione S-transferase P1 genotype and prognosis in Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2005;11(6):2175-9.
 120. Kelly KM, Perentesis JP. Polymorphisms of drug metabolizing enzymes and markers of genotoxicity to identify patients with Hodgkin's lymphoma at risk of treatment-related complications. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO.* 2002;13 Suppl 1:34-9.
 121. Reuss E, Fimmers R, Kruger A, Becker C, Rittner C, Höhler T. Differential regulation of interleukin-10 production by genetic and environmental factors - a twin study. *Genes Immun.* 2002;3(7):407-13.
 122. Kurreeman FAS. Transcription of the IL10 gene reveals allele-specific regulation at the mRNA level. *Hum Mol Genet.* 2004;13(16):1755-62.

123. Schoof N, Franklin J, Furst R, Zander T, von Bonin F, Peyrade F, et al. Interleukin-10 Gene Polymorphisms are Associated With Freedom From Treatment Failure for Patients With Hodgkin Lymphoma. *The Oncologist*. 2013;18(1):80-9.
124. Domingo-Domenech E, Benavente Y, Gonzalez-Barca E, Montalban C, Guma J, Bosch R, et al. Impact of interleukin-10 polymorphisms (-1082 and -3575) on the survival of patients with lymphoid neoplasms. *Haematologica*. 2007;92(11):1475-81.
125. Kaluza W, Reuss E, Grossmann S, Hug R, Schopf RE, Galle PR, et al. Different transcriptional activity and in vitro TNF- α production in psoriasis patients carrying the TNF- α 238A promoter polymorphism. *J Invest Dermatol*. 2000;114(6):1180-3.
126. Skoog T, van't Hooft FM, Kallin B, Jovinge S, Boquist S, Nilsson J, et al. A common functional polymorphism (C \rightarrow A substitution at position- 863) in the promoter region of the tumour necrosis factor- α (TNF- α) gene associated with reduced circulating levels of TNF- α . *Hum Mol Genet*. 1999;8(8):1443-9.
127. Ugliarolo AM, Turbay D, Pesavento PA, Delgado JC, McKenzie FE, Gribben JG, et al. Identification of three new single nucleotide polymorphisms in the human tumor necrosis factor-alpha gene promoter. *Tissue Antigens*. 1998;52(4):359-67.
128. Baldwin Jr AS. Series introduction: the transcription factor NF- κ B and human disease. *J Clin Invest*. 2001;107(1):3.
129. Liu X, Yu H, Yang W, Zhou X, Lu H, Shi D. Mutations of NFKB1A in biopsy specimens from Hodgkin lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010;197(2):152-7.
130. Lake A, Shield LA, Cordano P, Chui DTY, Osborne J, Crae S, et al. Mutations of NFKB1A , encoding I κ B α , are a recurrent finding in classical Hodgkin

lymphoma but are not a unifying feature of non-EBV-associated cases. *Int J Cancer*. 2009;125(6):1334-42.

131. Martin-Subero JI, Gesk S, Harder L, Sonoki T, Tucker PW, Schlegelberger B, et al. Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2002;99(4):1474-7.
132. Adamzik M, Schafer S, Frey UH, Becker A, Kreuzer M, Winning S, et al. The NFKB1 promoter polymorphism (-94ins/delATTG) alters nuclear translocation of. *Anesthesiology*. 2013;118(1):123-33.
133. Koc A, Batar B, Celik O, Onaran I, Tasan E, Sultuybek GK. Polymorphism of the NFKB1 affects the serum inflammatory levels of IL-6 in Hashimoto thyroiditis in a Turkish population. *Immunobiology*. 2014;219(7):531-6.
134. Yang X, Li P, Tao J, Qin C, Cao Q, Gu J, et al. Association between NFKB1 -94ins/del ATTG Promoter Polymorphism and Cancer Susceptibility: An Updated Meta-Analysis. *Int J Genomics*. 2014;2014:1-8.
135. Varga G, Mikala G, Andrikovics H, Koszarska M, Balassa K, Ádám E, et al. *NFKB1* - 94ins/delATTG polymorphism is a novel prognostic marker in first line-treated multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2015;168(5):679-88.
136. Chang ET, Birmann BM, Kasperzyk JL, Conti DV, Kraft P, Ambinder RF, et al. Polymorphic Variation in NFKB1 and Other Aspirin-Related Genes and Risk of Hodgkin Lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(3):976-86.

Hipótese

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes codificadores da IL-10, TNF- α e em *NF κ B1* estão associados a parâmetros clínicos, laboratoriais e de seguimento em pacientes com linfoma de Hodgkin clássico.

Objetivos

Objetivo geral

O presente trabalho teve por objetivo verificar a hipótese de que determinados polimorfismos de nucleotídeo único nas regiões promotoras dos genes da IL-10 e TNF- α e na região intrônica do gene NF κ B1 apresentam associação com aspectos clínicos, laboratoriais e de resposta ao tratamento de pacientes com LH clássico.

Objetivos específicos

- Documentar as características clínicas, laboratoriais, histopatológicas e de infecção pelo EBV dos casos estudados de LH clássico;
- Estimar a frequência dos SNPs SNP/pIL-10 -592 e -1082, SNPs/pTNF- α -238 e -862 e SNP/iNF κ B1 em grupos de pacientes com LH e em grupo-controle de indivíduos sem LH;
- Analisar as possíveis associações nas frequências dos SNPs estudados com características anatomoclínicas e sobrevida livre de falha de tratamento dos casos de LH avaliados.

CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO

SNPs in IL-10, TNF- α , and NF κ B1 genes and their association with prognostic parameters in patients with Hodgkin lymphoma

Rafael Dezen GAIOLLA^{1,2,*}, Marcelo Padovani de Toledo MORAES³, and Deilson ELGUI DE OLIVEIRA^{1,3}

1. Viral Carcinogenesis and Cancer Biology Research Group (ViriCan) at Biotechnology Institute (IBTEC), São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil
2. Department of Internal Medicine at Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil.
3. Department of Pathology at Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil.

* Author to whom correspondence should be addressed:

Rafael Dezen Gaiolla, MD

Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Rua Bento Lopes, s/n - Distrito de Rubião Jr.

Botucatu, SP, CEP 18618-970, Brazil

Tel.: +55 14 3880-1171 / FAX: +55 14 3882-2238

E-mail: rgaiolla@fmb.unesp.br

Running Title: SNPs in IL-10, TNF- α , and NF κ B1 genes in Hodgkin lymphoma

Observações:

- Manuscrito preparado de acordo com normas do *British Journal of Haematology* (ISSN: 1365-2141)
- Material suplementar apresentado nos Anexos

Summary

Classic Hodgkin lymphoma (cHL) is a malignant lymphoid neoplasia that shows aberrant expression of cytokines, including IL-10 and TNF- α . Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes encoding IL-10 and TNF- α or their regulatory proteins, such as NF κ B, may impact cHL pathobiology. In this study, SNPs in the promoter regions of genes encoding for IL-10 (SNP/pIL-10 -592, rs1800872; and SNP/pIL-10 -1082, rs1800896), and TNF- α (SNP/pTNF- α -238, rs361525; and SNP/pTNF- α -862, rs1800630), as well as in the intronic region of the NF κ B1 gene (SNP/iNF κ B1, rs1585215) were genotyped in 73 patients with cHL and evaluated against clinical and laboratory prognostic parameters for the disease. SNPs/pIL-10 AA were significantly associated with higher leukocyte and lower lymphocyte counts at diagnosis. In case of TNF- α , SNP/pTNF- α -238 AG was associated with EBV infection while SNP/pTNF- α -862 CC presented more frequently with leukocytosis. SNP/iNF κ B1 AA generally had stage IV and extranodal disease at diagnosis. Nonetheless, none of the studied SNPs had effect on treatment outcome. This study shows that some SNPs genotypes for IL-10 and TNF- α genes are associated with prognostic parameters in cHL; furthermore, this is the first time that the SNP/iNF κ B1 (rs1585215) was implicated in clinical features of the disease.

Keywords: Hodgkin lymphoma, single nucleotide polymorphisms, IL-10, TNF- α , NF κ B1.

Introduction

Hodgkin lymphoma (HL) is a B-cell derived malignant neoplasia that accounts for approximately 10% of all lymphomas. The disease has a unique histological appearance, in which the neoplastic component - the Hodgkin and Reed-Sternberg cells (H-RS) - is scarce, and tumors are mostly formed by non-malignant inflammatory cells (Küppers, 2008). Cure rates for the classical form of HL (cHL) reaches 90% with modern treatment protocols based on chemo and radiotherapy (Eichenauer & Engert, 2012).

Although prognostic models based on clinical and laboratorial parameters for cHL are useful in clinical practice (Hasenclever & Diehl, 1998; Venkataraman *et al*, 2014; Connors, 2015), they typically do not take into account the pathobiology of the disease, which may account for their poor performance for treatment stratification. Indeed, the follow-up of long-term cHL survivors show high frequency of treatment-related late toxicity, and there is a considerable number of relapses, even in patients in early-stage at diagnosis (Diehl *et al*, 2004). Therefore, it is important to define new biological prognostic factors capable of accurately predict cHL clinical behavior and outcome.

Interactions between H-RS and inflammatory cells are mediated by cytokines, which play an important role in cHL immunopathogenesis (Aldinucci *et al*, 2010; Steidl *et al*, 2011). Worth to note, H-RS cells express IL-10 and TNF- α (Herbst *et al*, 1996; Foss *et al*, 1993; Nakayama *et al*, 2014). The former cytokine suppresses cytotoxic Th1 immune response (Acuner-Ozbabacan *et al*, 2014) and it may contribute for extended life-span of H-RS cell (Levy & Brouet, 1994; Skinnider, 2002). On the other hand, TNF- α stimulates phagocytic and microbicidal function of macrophages; furthermore, it regulates the production of several other proinflammatory cytokines (Vassalli, 1992). Adverse biological behavior and poor outcome for cHL were reported in patients with elevated circulating levels of IL-10 and TNF- α (Bohlen *et al*, 2000; Viviani *et al*, 2000; Vassilakopoulos *et al*, 2001; Herling *et al*, 2003; Casasnovas *et al*, 2007; Warzocha *et al*, 1998).

The profile of cytokine production varies among individuals, and it is influenced by genetic factors (Smith & Humphries, 2009), such as single nucleotide polymorphisms (SNPs). SNPs have been associated with variability in the serum levels of IL-10 and TNF- α (Reuss *et al*, 2002; Hohaus *et al*, 2009; Skoog *et al*, 1999; Kaluza *et al*, 2000), and those found within promoter regions of IL-10 (e.g., SNP/pIL-10 -592 and SNP/pIL-10 -1082) and TNF- α genes (e.g., SNP/p TNF- α -238 and SNP/pTNF- α -862) are among the most studied so far.

Cytokine production is also modulated by intracellular signaling pathways, and the activity of their protein components are themselves under the effect of SNPs in the respective encoding genes. The NF κ B signaling pathway modulates the production of several proinflammatory cytokines and anti-apoptotic proteins (Jost & Ruland, 2006). Aberrant NF κ B pathway activation is a hallmark of cHL and influences transcriptional regulation of numerous cytokines. (Matsuki & Younes, 2015). Moreover, NF κ B signaling is hijacked by the Epstein Barr virus (EBV), which have an important role in the pathogenesis of EBV-associated cHL (de Oliveira *et al*, 2010). The NF κ B family of transcription factors encompasses the proteins p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105, and p52/p100, which act either as homo or heterodimers in mammalian cells (Hayden, 2004). The major NF κ B complex is composed by p50 and p65, encoded respectively by the NF κ B1 and NF κ B2 genes. Genetic variation in *NF κ B1*, which encodes a subunit of the most common NF κ B protein complex, was shown to be associated with infectious conditions (Adamzik *et al*, 2013), autoimmune diseases (Koc *et al*, 2014) and risk of other malignancies (Yang *et al*, 2014; Varga *et al*, 2015).

Due to insufficient number of studies and some conflicting results published so far, the impact of gene polymorphisms in the pathobiology and prognosis of cHL requires further data. Thus, this study aimed to investigate the SNP/pIL-10 -592 (C>A, rs1800872), SNP/pIL-10 -1082 (A>G, rs1800896), SNP/pTNF- α -238 (G>A, rs361525), SNP/pTNF- α -862 (C>A, rs1800630), and one SNP within the intronic region of *NF κ B1* (SNP/iNF κ B1 A>G, rs1585215) in patients with cHL, considering their putative associations with prognostic features and outcome for the disease.

Methods

Subjects

This study was approved by the Ethical Committee on Research at Botucatu Medical School, State University of Sao Paulo (UNESP), SP, Brazil (Protocol #523/10). The study enrolled patients with cHL treated at UNESP's academic hospital between 1999 and 2014, as well as healthy blood-donors matched to cHL patients according to age, gender and ethnicity, as inferred by patient's skin color.

The initial medical evaluation of cHL patients consisted of a complete history interview and physical examination, blood cell counts and biochemical profile, computed tomography (CT) of the chest, abdomen and pelvis, as well as pathological evaluation of bone marrow aspiration and biopsy. Patients were clinically staged according to the Ann-Arbor classification (Lister *et al*, 1989) and treated according to standardized institutional chemotherapeutic protocols for cHL. The assessment of treatment response was based on CT, in accordance with international criteria (Cheson *et al*, 2014). Patients who did not achieved complete response and those that progressed during treatment (or relapsed after first line treatment) received second line therapeutic protocols. Cases in which the treatment achieved good response had autologous stem cell transplantation for treatment consolidation.

Histopathology, Immunohistochemistry and EBV infection status

All pathology material was reviewed by the same pathologist using either tissue microarray slides produced as previously described (Kononen *et al*, 1998) (58/73 cases; 79,5%), or archived histopathological stained slides (15/73 cases; 20,5%). Unstained tissue sections were used for immunohistochemistry (IHC) with anti-CD45 (clone DD7/26, 1:250), anti-CD20 (clone L26, 1:700), anti-CD30 (clone Ber-H2, 1:100), anti-CD15 (clone C3D-1, 1:150), and anti-CD3 (clone 565; 1:800) antibodies. The EBV infection status was assessed by *in situ*

hybridization (ISH) against EBV-encoded RNA 1 (EBER-1), as reported elsewhere (de Oliveira *et al*, 2006), and/or by IHC with anti-EBV latency membrane protein-1 (LMP-1) (clone CS1-4, 1:100). All antibodies used in IHC assays were manufactured by Dako Cytomation (Carpinteria, CA, USA).

DNA extraction

Blood samples from all participants were obtained by venipuncture after informed consent, in accordance to institutional guidelines. The samples were collected into 4mL BD Vacutainer® EDTA tubes (Beckson-Dickson, Rutherford, NJ, USA), and mononuclear cells were isolated with *Histopaque*® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) after centrifugation at 400xg for 30min. DNA extraction was performed using the *QIAamp DNA Blood Mini Kit*® (Qiagen, Valencia, CA, USA), accordingly to the manufacturer's instructions. The DNA was eluted, quantified with the NanoVue™ spectrophotometer (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), and stored at -80°C until SNP's genotyping by Real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR) coupled to High Resolution Melting (HRM) analysis.

SNPs genotyping by qPCR-HRM

SNPs in the promoter regions of IL-10 gene (*IL 10*; NCBI's GeneID: 3586) at positions -592 and -1082, TNF- α gene (*TNF*; NCBI's GeneID: 7124) at positions -238 and -862, and in the intronic region of NF κ B1 gene (*NFKB1*; NCBI's GeneID: 4790) were evaluated by qPCR-HRM. Briefly, DNA samples were normalized to 20ng/ μ L and amplified by qPCR using the Rotor-Gene™ 6000 device (Corbett Research, Sydney, Australia). Control samples for each SNP genotype were selected and validated by Sanger's DNA sequencing. Genotyping was performed by comparing melting curves for control and cHL case samples. Both HRM and conventional melting curves were considered to improve the discrimination of the SNPs genotypes, and all samples were evaluated in duplicates. Amplification primers for SNPs/pIL10 -592 and -1082 (Da Silva *et al*,

2007) and for SNPs/pTNF- α -238 and -862 (Strassberg *et al*, 2007; Packer *et al*, 2006) were obtained from literature; the primers for SNP/iNF κ B1 were designed by the authors (RDG and DEO). Information regarding the sequence of primers, amplicon sizes, and the conditions for qPCR assays are listed in the supporting information material (supporting information material Tables S1 and S2).

Statistical methods

The group of cHL patients and the group of their matched controls were compared using the chi-square and the Mann-Whitney tests. For each SNP evaluated, genotypes were analyzed individually; when more than two allelic combinations were identified, genotypes were also divided into two groups as follows, considering the biological relevance previously described (Schoof *et al*, 2013; Skoog *et al*, 1999; Kaluza *et al*, 2000): for SNP/pTNF- α -238, GG vs AG/AA; for SNP/pTNF- α -862, CC vs AC/AA; for SNP/pIL10 -592, AA vs AC/CC; for SNP/pIL10 -1082, AA vs AG/GG; and for SNP/iNF κ B1, AA vs AG/GG. Chi-square or Fisher's exact tests were used to assess the association among SNPs/pTNF- α , SNPs/pIL-10, and SNPs/iNF κ B1 genotypes with dichotomized clinical and laboratory variables. The Tukey's test was used for comparison with continuous laboratory and clinical values.

The primary outcome measure was freedom from treatment failure (FFTF), defined as the time from the beginning of the treatment until the first event or the date of the last clinical status, in case that no event occurred. According to defined international standardization (Cheson *et al*, 2014), events were defined as progression during therapy, failure to achieve complete remission at the end of first line treatment, relapse or death from any cause. Survival curves were generated using the Kaplan-Meier method and differences in FFTF were tested for significance by log-rank test. For survival analysis, all genotypes were grouped as indicated above. The assessment of association of potential predictor variables and SNPs genotypes with treatment failure (dependent variable) was performed by multivariate logistic regression analysis adjusted by the International Prognostic Index (IPS) (Hasenclever & Diehl, 1998).

Hardy-Weinberg equilibrium was tested using the R software with SNPAssoc package v1.9-2 (R Core Team, 2015). All other statistical tests were performed using the SAS Software version 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Differences found were considered significant when $p \leq 0,05$; trends were assumed when $0,05 < p \leq 0,10$.

Results

Features of cHL patients

Eighty patients with confirmed cHL were originally recruited, but 5 were excluded because they were younger than 16 years-old at diagnosis, and 2 due to lack of paraffin-embedded tissues for diagnostic review. Table I shows general information for the 73 cHL patients evaluated in this study.

The median age of patients was 28 years-old (range 16-73), 57.5% were male, and the male/female ratio was 1,4:1. Most patients had stages I or II at diagnosis, about 60% presented with B symptoms, and almost all patients had Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status ≤ 2 . The histopathology review showed that 72.6% of the cHL cases were nodular sclerosis and 13.8% were mixed-cellularity subtypes; the remaining cases were classified either as lymphocyte-rich (1/73; 1,4%) or cHL not otherwise specified (9/73; 12,3%). EBV infection was verified in 34.4% cases. As expected, no differences were observed between cHL cases and non-cHL controls, due to age and sex-matching of these groups.

Table I. Main characteristics of cHL patients. Fractions represent number of patients with available data.

Features	N	%
Sex		
Males	42	57,5
Females	31	42,5
Age		
16 - 44 years	60	82,2
≥ 45 years	13	17,8
Ann-Arbor stage I/II	42	57,5
B symptoms	43	58,9
Histology subtype		
Nodular sclerosis	53	72,6
Mixed cellularity	10	13,8
Lymphocyte rich	1	1,3
NOS	9	12,3
Bulky mediastinum involvement	16	21,9
Nodal areas ≥ 3	33	45,2
Extranodal disease	22	30,1
Abdominal disease	25	34,3
BM involvement	10	13,7
ECOG performance ≤ 2	72	98,6
Hemoglobin < 10,5g/dL	18	24,7
Leukocyte count ≥ 15.000/mm ³	10/72	13,9
Lymphocyte count < 800/mm ³	11/72	15,3
High ESR	20/34	58,5
Low albumin	35/68	51,5
High LDH	15/71	21,1
EBV infection	21/61	34,4

BM: bone marrow; NOS: not otherwise specified; ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group; ESR: erythrocyte sedimentation rate; LDH: lactate dehydrogenase; EBV: Epstein Barr virus.

Treatment

The majority of patients (69/73; 94,5%) was treated with doxorubicin, bleomycin, vinblastine, and dacarbazine (ABVD regimen); 2 (2,7%) patients were treated with bleomycin, etoposide, doxorubicin cyclophosphamide, vincristine, procarbazine and prednisone (BEACOPP regimen), and 2 (2,7%) with a hybrid protocol with mechlorethamine, vincristine, procarbazine, prednisone, doxorubicin, bleomycin and vinblastine (MOPP-ABV). Involved field radiotherapy (RT) was performed as a consolidation treatment for 42 (57.5%) patients. Complete response (CR) and partial response to first line treatment were observed in 94.5% and 3.5% of cases, respectively. Disease relapse was observed in 18.8% of patients in previous CR and 46.1% of the relapsed patients received consolidation therapy with autologous bone marrow transplantation.

The median for clinical follow-up since diagnosis was 86 months (range 13-195 months). At the time of final analysis, 64 (87.6%) patients were alive: 61/64 (95,3%) in CR (including 5 out of 6 that were transplanted), and 3/64 (3,7%) living with active disease. Nine patients (12.4%) had died, 4/9 (44,4%) as a result of disease progression, 3/9 (33,3%) due to infection, and 1/9 (11,1%) because of a second cancer.

Genotype analysis and associations with patient characteristics

There was no difference in genotypes distribution between cHL group and control group for all the SNPs analyzed. The only exception was the homozygous GG of SNP/pIL10 -1082, which was observed less frequently in cHL group. Genotype distribution for all the investigated polymorphisms was in Hardy-Weinberg equilibrium. SNP/pTNF- α -238 AA and SNP/iNF κ B1 GG genotypes were not found in cHL group, but the latter was found in one subject in the control group. (supporting information material Table S3).

To explore different possible associations of the studied cytokine genes polymorphisms with clinical features, SNPs genotypes were first analyzed individually and then grouped as previously described (refer to Material and

Methods). Comparisons were first made with patients' and disease's features as categorical variables. Thereafter, Tukey's test was used for a multi comparison analysis of the studied genotypes with continuous variables, including age, duration of symptoms until diagnosis, hemoglobin levels, cell counts (leukocytes, lymphocytes, and monocytes), LDH, ESR, and albumin levels. These results are summarized below:

SNPs/pTNF- α

Univariate analysis of SNPs/pTNF- α genotypes revealed that AG carriers of TNF- α -238 were more frequently associated with EBV infection when compared to homozygous GG. No other significant associations with dichotomized variables were observed with respect to SNPs/pTNF- α . These results are shown in Table II. By multi comparison with continuous variables, TNF- α -862 CC showed a trend towards association with lower lymphocyte counts when compared to AA/AC group (mean 1321,7 X 1630,8 cells/mm³; $p=0,06$). No other associations with the described variables were found.

SNPs/pIL-10

When SNPs/pIL10 genotypes were compared individually with categorical variables, IL10-1082 AA more frequently presented with leukocytes $\geq 15.000/\text{mm}^3$ at diagnosis in comparison to other genotypes (supporting information material Table S5). Comparison of grouped genotypes of SNPs/pIL10 with categorical variables revealed that mediastinal disease (bulky and non-bulky) was more common in the IL10-592 AC/CC group compared to AA homozygous (Fisher's exact test. $p=0,002$). SNP/pIL10 -592 AA had higher frequency of leukocytes $\geq 15.000/\text{mm}^3$ and lymphocyte counts < 800 cells/mm³ at diagnosis in comparison to AC/CC group. Moreover, a trend towards lower ESR values was also observed for IL10-592 AA. These and other comparisons are shown in Table III. When continuous variables were analyzed, SNP/pIL10 -1082 AA was associated with lower lymphocyte counts and a trend towards lower levels of albumin at

diagnosis when compared to AG and GG genotypes (Table IV). Similarly, SNP/pIL10 -592 AA presented with lower ESR levels at diagnosis compared to AC/CC group; furthermore, a trend towards higher eosinophil counts and lower LDH values was observed for IL10 -592 AA (Table V).

SNP/iNFκB1

Univariate analysis showed that the SNP/iNFκB1 AA was associated with more frequent clinical presentation with extranodal disease and was less likely to present with leukocyte counts above 15,000/mm³ in comparison to AG carriers (Table VI). Moreover, when clinical stage were analyzed ungrouped, SNP/iNFκB1 AA patients presented more frequently with stage IV disease at diagnosis (chi-square test; p=0,02). Multi comparison analysis with continuous variables revealed a trend towards association of SNP/iNFκB1 AA with lower monocyte counts in comparison to AG genotype. Noteworthy, SNP/iNFκB1 AA had shorter time of symptoms history compared to AG (Table VII).

Table II. Associations of SNPs/pTNF- α -238 and -862 with clinical features of patients with cHL

Features (n)	Patients (%)	TNF α -238		P	TNF α -862		P
		GG	AG		CC	AC/AA	
Age (73)							
19-44 years	60 (82,2)	54 (90)	6 (10)	0,19	28 (46,7)	32 (53,3)	0,33
≥ 45 years	13 (17,8)	10 (76,9)	3 (23,1)		8 (61,5)	5 (38,5)	
Gender (73)							
Male	42 (57,5)	36 (85,7)	6 (14,3)	0,72	21 (50)	21 (50)	0,92
Female	31 (42,5)	28 (90,3)	3 (9,7)		15 (48,4)	16 (51,6)	
Ann-Arbor stage (73)							
I - II	42 (57,5)	36 (85,7)	6 (14,3)	0,72	20 (47,6)	22 (52,4)	0,73
III - IV	31 (42,5)	28 (90,3)	3 (9,7)		16 (51,6)	15 (48,4)	
B symptoms (73)							
Present	43 (58,9)	38 (88,4)	5 (11,6)	1,0	20 (46,5)	23 (53,5)	0,56
Absent	30 (41,1)	26 (86,7)	4 (13,3)		16 (53,3)	14 (46,7)	
Histology (73)							
Nodular sclerosis	53 (72,6)	47 (88,7)	6 (11,3)	0,86	26 (49,1)	27 (50,9)	0,77
Mixed cellularity	10 (13,8)	8 (80)	2 (20)		5 (50)	5 (50)	
Lymphocyte rich	1 (1,3)	1 (100)	0		0	1 (100)	
Classical NOS	9 (12,3)	8 (88,9)	1 (11,1)		5 (55,6)	4 (44,4)	
Bulky mediastinal mass (73)							
Yes	16 (21,9)	14 (87,5)	2 (12,5)	1,0	8 (50)	8 (50)	0,95
No	57 (78,1)	50 (87,7)	7 (12,3)		28 (49,1)	29 (50,9)	
Number of nodal areas (73)							
≥ 3	33 (45,2)	31 (93,9)	2 (6,1)	0,17	18 (55,5)	15 (45,5)	0,41
< 3	40 (54,8)	33 (82,5)	7 (17,5)		18 (45)	22 (55)	
Extranodal disease (73)							
Present	22 (30,1)	19 (86,4)	3 (13,6)	1,0	13 (59,1)	9 (40,9)	0,27
Absent	51 (69,9)	45 (88,2)	6 (11,8)		23 (45,1)	28 (54,9)	
Abdominal disease (73)							
Present	25 (34,3)	22 (88)	3 (12)	1,0	13 (52)	12 (48)	0,74
Absent	48 (65,7)	42 (87,5)	6 (12,5)		23 (47,9)	25 (52,1)	

Table II (continued). Associations of SNPs/pTNF- α -238 and -862 with clinical features of patients with cHL

Features (n)	Patients (%)	TNF α -238		P	TNF α -862		P
		GG	AG		CC	AC/AA	
Bone marrow involvement (73)							
Present	10 (13,7)	8 (80)	2 (20)	0,60	5 (50)	5 (50)	0,96
Absent	63 (86,3)	56 (88,9)	7 (11,1)		31 (49,2)	32 (50,8)	
Hemoglobin <10,5g/dL (73)							
Present	18 (24,7)	17 (94,4)	1 (5,6)	0,43	11 (61,1)	7 (38,9)	0,24
Absent	55 (75,3)	47 (85,5)	8 (14,5)		25 (45,5)	30 (54,5)	
Leukocytes \geq 15,000/mm³ (72)							
Present	10 (13,9)	10 (100)	0	0,40	5 (50)	5 (50)	0,59
Absent	62 (86,1)	53 (85,5)	9 (14,5)		30 (48,4)	32 (51,6)	
Lymphocytes < 800/mm³ (72)							
Present	11 (15,3)	9 (81,8)	2 (18,2)	0,76	6 (54,5)	5 (45,5)	0,54
Absent	61 (84,7)	54 (88,5)	7 (11,5)		29 (47,5)	32 (52,5)	
High ESR (34)							
Yes	20 (58,5)	16 (80)	4 (20)	0,37	10 (50)	10 (50)	0,40
No	14 (41,2)	13 (92,9)	1 (7,1)		9 (64,3)	5 (35,7)	
EBV infection (61)							
Present	21 (34,4)	16 (76,2)	5 (23,8)	0,04	10 (47,6)	11 (52,4)	0,71
Absent	40 (65,6)	38 (95)	2 (5)		21 (52,5)	19 (47,5)	
Serum albumin (68)							
Normal	33 (48,5)	30 (90,9)	3 (9,1)	0,69	16 (48,5)	17 (51,5)	0,88
Low	35 (51,5)	30 (85,7)	5 (14,3)		18 (51,4)	17 (48,6)	
LDH (71)							
Normal	56 (78,9)	47 (83,9)	9 (16,1)	0,18	27 (48,2)	29 (51,8)	0,91
High	15 (21,1)	15 (100)	0		7 (46,7)	8 (53,3)	

NOS = not otherwise specified; ESR = erythrocyte sedimentation rate; EBV = Epstein Barr virus; LDH = lactate dehydrogenase.

Table III. Associations of SNP/pIL10 -592 and -1082 with clinical features of patients with cHL.

Features (n)	Patients (%)	IL-10 -592		P	IL10 -1082		P
		AA	AC/CC		AA	AG/GG	
Age (73)							
19-44 years	60 (82,2)	7 (11,7)	53 (88,3)	1,0	29 (48,3)	31 (51,7)	0,51
≥ 45 years	13 (17,8)	1 (7,7)	12 (92,3)		5 (38,5)	8 (61,5)	
Gender (73)							
Male	42 (57,5)	6 (14,3)	36 (85,7)	0,45	20 (47,6)	22 (52,4)	0,83
Female	31 (42,5)	2 (6,5)	29 (93,5)		14 (45,2)	17 (54,9)	
Ann-Arbor stage (73)							
I - II	42 (57,5)	3 (7,1)	39 (92,9)	0,27	18 (42,9)	24 (57,1)	0,45
III - IV	31 (42,5)	5 (16,1)	26 (83,9)		16 (51,6)	15 (48,4)	
B symptoms (73)							
Present	43 (58,9)	4 (9,3)	39 (90,7)	0,70	21 (48,8)	22 (51,2)	0,64
Absent	30 (41,1)	4 (13,3)	26 (86,7)		13 (43,3)	17 (56,7)	
Histology (73)							
Nodular sclerosis	53 (72,6)	7 (13,2)	46 (86,8)	0,67	27 (50,9)	26 (49,1)	0,34
Mixed cellularity	10 (13,8)	1 (10)	9 (90)		3 (30)	7 (70)	
Lymphocyte rich	1 (1,3)	0	1 (100)		1 (100)	0	
Classical NOS	9 (12,3)	0	9 (100)		3 (33,3)	6 (66,7)	
Bulky mediastinal mass (73)							
Yes	16 (21,9)	1 (6,3)	15 (93,7)	0,67	9 (56,2)	7 (43,8)	0,38
No	57 (78,1)	7 (12,3)	50 (87,7)		25 (43,9)	32 (56,1)	
Number of nodal areas (73)							
≥ 3	33 (45,2)	3 (9,1)	30 (90,9)	0,72	16 (48,5)	17 (51,5)	0,76
< 3	40 (54,8)	5 (12,5)	35 (87,5)		18 (45)	22 (55)	
Extranodal disease (73)							
Present	22 (30,1)	1 (4,5)	21 (95,5)	0,42	9 (40,9)	13 (59,1)	0,52
Absent	51 (69,9)	7 (13,7)	44 (86,3)		25 (49)	26 (51)	
Abdominal disease (73)							
Present	25 (34,3)	4 (16)	21 (84)	0,43	13 (52)	12 (48)	0,50
Absent	48 (65,7)	4 (8,3)	44 (91,7)		21 (43,7)	27 (56,3)	

Table III (continued). Associations of SNP/pIL10 -592 and -1082 with clinical features of patients with cHL.

Features (n)	Patients (%)	IL10 -592		P	IL10 -1082		P
		AA	AC/CC		AA	AG/GG	
Bone marrow involvement (73)							
Present	10 (13,7)	1 (10)	9 (90)	1,0	3 (30)	7 (70)	0,32
Absent	63 (86,3)	7 (11,1)	56 (88,9)		31 (49,2)	32 (50,8)	
Hemoglobin <10,5g/dL (73)							
Present	18 (24,7)	2 (11,1)	16 (88,9)	1,0	10 (55,6)	8 (44,6)	0,37
Absent	55 (75,3)	6 (10,9)	49 (89,1)		24 (43,6)	31 (56,4)	
Leukocytes ≥ 15,000/mm³ (72)							
Present	10 (13,9)	2 (20)	8 (80)	0,008	7 (70)	3 (30)	0,14
Absent	62 (86,1)	5 (8)	57 (92)		26 (41,9)	36 (58,1)	
Lymphocytes < 800/mm³ (72)							
Present	11 (15,3)	1 (9,1)	10 (90,9)	0,01	7 (63,6)	4 (36,4)	0,24
Absent	61 (84,7)	6 (9,8)	55 (90,2)		26 (42,6)	35 (57,4)	
High ESR (34)							
Yes	20 (58,5)	0	20 (100)	0,06	9 (45)	11 (55)	0,48
No	14 (41,2)	3 (21,4)	11 (78,6)		8 (57,1)	6 (42,9)	
EBV infection (61)							
Present	21 (34,4)	2 (9,5)	19 (90,5)	0,72	8 (38,1)	13 (61,9)	0,60
Absent	40 (65,6)	5 (12,5)	35 (87,5)		18 (45)	22 (55)	
Serum albumin (68)							
Normal	33 (48,5)	4 (12,1)	29 (87,9)	0,71	15 (45,5)	18 (54,5)	0,92
Low	35 (51,5)	3 (8,6)	32 (91,4)		17 (48,6)	18 (51,4)	
LDH (71)							
Normal	56 (78,9)	7 (12,5)	49 (87,5)	1,0	26 (46,3)	30 (57,6)	0,98
High	15 (21,1)	1 (6,7)	14 (93,3)		7 (46,7)	8 (53,3)	

NOS = not otherwise specified; ESR = erythrocyte sedimentation rate; EBV = Epstein Barr virus; LDH = lactate dehydrogenase.

Table IV. Associations of SNP/pIL-10 -1082 with lymphocyte counts and albumin value.

IL-10 -1082	Lymphocytes (cells/mm ³) N=72	P		Albumin (g/dL) N=68	P	
		GA	GG		GA	GG
AA	1393,1	0,8	0,04	2,2	0,08	0,06
GA	1496,3	-	0,06	3,7	-	0,9
GG	2631	0,06	-	3,8	0,9	-

Table V. Associations of SNP/pIL-10 -592 with ESR, eosinophils and LDH values.

IL-10 -592	ESR (mm/h) N=34	P	Eosinophil (cells/mm ³) N=70	P	LDH (U/L) N=71	P
AC/CC	50		281,2		462,6	

Table VI. Associations of SNP/*iNFκB1* with clinical features of patients with cHL.

Features (n)	Patients (%)	NFκB1		P
		AA	AG	
Age (73)				
19-44 years	60 (82,2)	39 (65)	21 (35)	0,77
≥ 45 years	13 (17,8)	9 (69,2)	4 (30,8)	
Gender (73)				
Male	42 (57,5)	25 (59,5)	17 (40,5)	0,19
Female	31 (42,5)	23 (74,2)	8 (25,8)	
Ann-Arbor stage (73)				
I - II	42 (57,5)	28 (66,7)	14 (33,3)	0,84
III - IV	31 (42,5)	20 (64,5)	11 (35,5)	
B symptoms (73)				
Present	43 (58,9)	26 (60,5)	17 (39,5)	0,25
Absent	30 (41,1)	22 (73,3)	8 (26,7)	
Histology (73)				
Nodular sclerosis	53 (72,6)	31 (58,5)	22 (41,5)	0,18
Mixed cellularity	10 (13,8)	8 (80)	2 (20)	
Lymphocyte rich	1 (1,3)	1 (100)	0	
Classical NOS	9 (12,3)	8 (88,9)	1 (11,1)	
Bulky mediastinal mass (73)				
Yes	16 (21,9)	9 (56,2)	7 (43,8)	0,36
No	57 (78,1)	39 (68,4)	18 (31,6)	
Number of nodal areas (73)				
≥ 3	33 (45,2)	20 (60,6)	13 (39,4)	0,39
< 3	40 (54,8)	28 (70)	12 (30)	
Extranodal disease (73)				
Present	22 (30,1)	18 (81,8)	4 (18,2)	0,05
Absent	51 (69,9)	30 (58,8)	21 (41,2)	
Abdominal disease (73)				
Present	25 (34,3)	15 (60)	10 (40)	0,45
Absent	48 (65,7)	33 (68,7)	15 (31,3)	

Table VI (continued). Associations of SNP/ $\text{iNF}\kappa\text{B1}$ with clinical features of patients with cHL.

Features (n)	Patients (%)	$\text{NF}\kappa\text{B1}$		P
		AA	AG	
Bone marrow involvement (73)				
Present	10 (13,7)	9 (90)	1 (10)	0,14
Absent	63 (86,3)	39 (61,9)	24 (38,1)	
Hemoglobin <10,5g/dL (73)				
Present	18 (24,7)	13 (72,2)	5 (27,8)	0,50
Absent	55 (75,3)	35 (63,6)	20 (63,4)	
Leukocytes $\geq 15,000/\text{mm}^3$ (72)				
Present	10 (13,9)	4 (40)	6 (60)	0,06
Absent	62 (86,1)	44 (71)	18 (29)	
Lymphocytes < 800/mm^3 (72)				
Present	11 (15,3)	6 (54,5)	5 (45,5)	0,24
Absent	61 (84,7)	45 (68,8)	19 (31,2)	
High ESR (34)				
Yes	20 (58,5)	12 (60)	8 (40)	0,86
No	14 (41,2)	8 (57,1)	6 (42,9)	
EBV infection (61)				
Present	21 (34,4)	13 (61,9)	8 (38,1)	0,66
Absent	40 (65,6)	27 (67,5)	13 (32,5)	
Serum albumin (68)				
Normal	33 (48,5)	24 (72,7)	9 (27,3)	0,52
Low	35 (51,5)	21 (60)	14 (40)	
LDH (71)				
Normal	56 (78,9)	35 (62,5)	21 (37,5)	0,43
High	15 (21,1)	11 (73,3)	4 (26,7)	

NOS = not otherwise specified; ESR = erythrocyte sedimentation rate; EBV = Epstein Barr virus; LDH = lactate dehydrogenase.

Table VII. Associations of SNP/iNF κ B1 with monocyte counts and time to diagnosis

iNF κ B1	Monocytes (cells/mm ³) N=64	P	Time to diagnosis (months)	P
AA	666,3	0,07	4,8	0,01
AG	848,8		12,1	

Genotype analysis and clinical outcome in cHL

Univariate analysis revealed no association between genotypes (individual or grouped) of the studied SNPs and FFTF. For survival analysis, different genotypes of cytokine genes SNPs were combined as described previously in this paper. As shown in Figs 1-3, no differences were found in terms of FFTF between groups.

Freedom from treatment failure was associated with weight loss, advanced stage and presence of mediastinal mass, as demonstrated by the multivariate logistic regression analysis adjusted by IPS. There was also a weak association of time to diagnosis and outcome. None of the genotypes found for the evaluated SNPs were associated with FFTF (Table VIII).

Table VIII. Hazard Ratio for freedom from treatment failure (FFTF) in multivariate logistic regression analysis.

Variable	HR	95% CI	P
SNP/pTNF α -238 – GG x AG	0,98	0,17 – 5,47	0,98
SNP/pTNF α -862 - CC x AC/AA	0,69	0,23 – 2,08	0,55
SNP/pIL10-592 - AA x AC/CC	0,40	0,04 – 3,59	0,42
SNP/pIL10-1082 - AA x AG/GG	0,43	0,14 – 1,37	0,15
SNP/iNF κ B1 – AA x AG	0,56	0,18 – 1,69	0,31
Weight loss	4,53	1,18 – 17,68	0,03
Stage	1,97	1,0 – 3,8	0,04
Mediastinal mass	3,89	1,08 – 14,01	0,03
Time to diagnosis	1,05	0,99 – 1,11	0,06

HR: Hazard ratio; CI: Confidence interval.

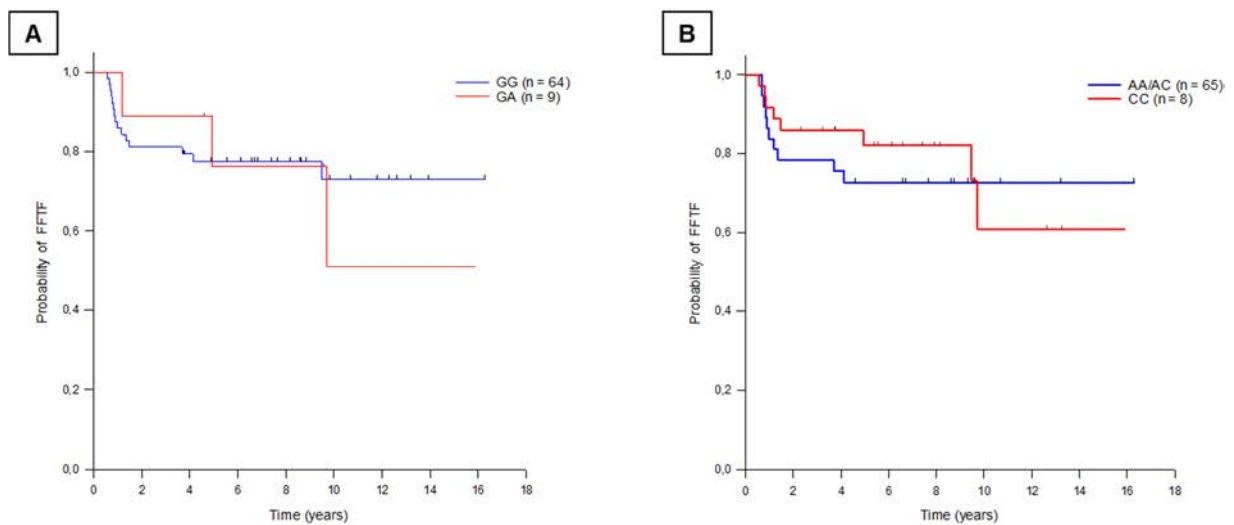


Figure 1. Kaplan-Meier plot for freedom from treatment failure (FFTF) probabilities in 73 patients with cHL with respect to SNPs/pTNF- α genotypes. (A) Comparison of patients with TNF- α -238 GG and GA genotypes revealed no differences in FFTF between groups ($p = 0,76$). (B) Comparison of patients with homozygous TNF- α -862 CC with AC/AA group revealed no differences in FFTF ($p = 0,71$).

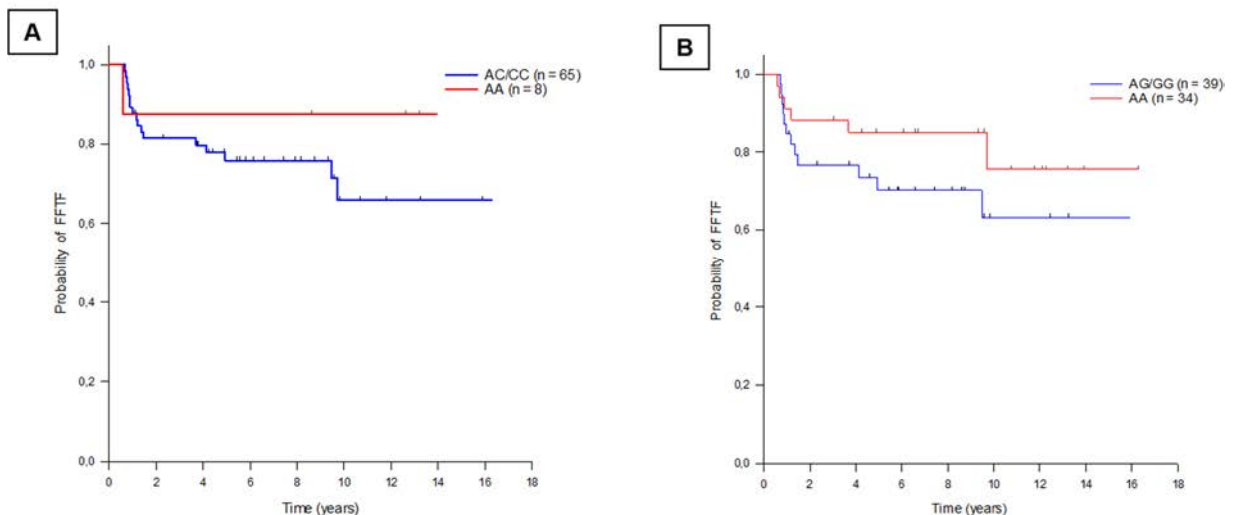


Figure 2. Kaplan-Meier plot for freedom from treatment failure (FFTF) probabilities in 73 patients with cHL with respect to SNPs/pIL-10 genotypes. (A) Comparison of patients with IL10 -592 AA X AC/CC genotypes revealed no differences in FFTF between groups ($p = 0,37$).

(B) Comparison of patients with homozygous IL10-1082 AA with AG/GG group revealed no differences in FFTF. ($p = 0,19$).

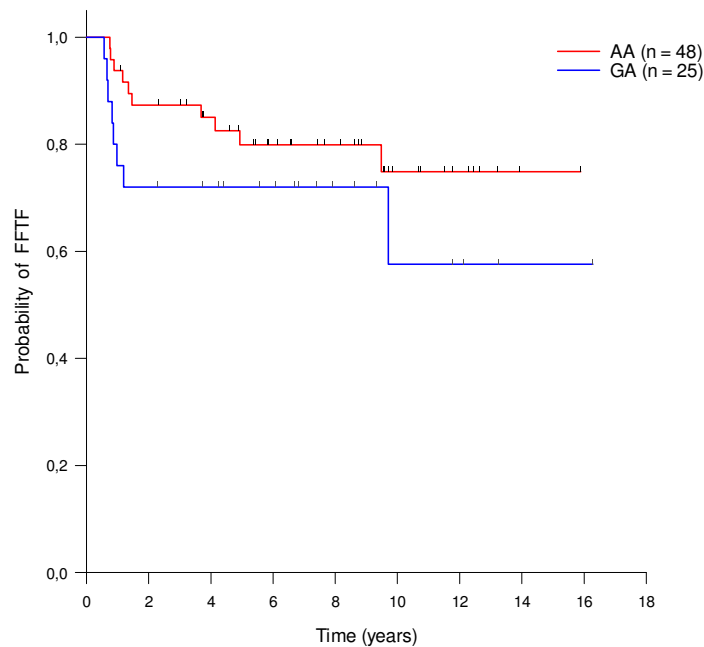


Figure 3. Kaplan-Meier plot for freedom from treatment failure (FFTF) probabilities in 73 patients with cHL with respect to SNP/iNF κ B1 genotypes. Comparison of patients with *NF κ B1* AA and GA genotypes revealed no differences in FFTF between groups ($p = 0,21$).

Discussion

A number of studies reported the association of SNPs in cytokine genes with augmented risk for developing HL (Monroy *et al*, 2011; Chang *et al*, 2009; Torres-Espindola *et al*, 2014), but the role of these polymorphic variations in the outcome of cHL is somewhat controversial. In this study, the possible associations between SNPs in TNF- α , IL-10, and NF κ B1 genes with clinical features and outcome in patients with cHL were investigated.

TNF- α production is transcriptionally regulated (Raabe *et al*, 1998; Ugliandolo *et al*, 1998), and differences among individuals may be influenced by SNPs in the promoter region of TNF- α encoding gene. For instance, in experimental models a C \rightarrow A substitution at position -862 and a G \rightarrow A substitution at position -238 were associated with reduced serum levels of TNF- α , and the former have been verified also in healthy individuals (Skoog *et al*, 1999; Kaluza *et al*, 2000).

Although high serum levels of TNF- α were associated with clinical features and poorer prognosis in cHL (Warzocha *et al*, 1998), data on the role of SNPs in the TNF- α gene in cHL are scarce. In this study, a significant association of SNP/pTNF- α -238 AG genotype with EBV-associated cHL is reported. Furthermore, patients carrying the CC genotype at SNP/pTNF- α -862 were more likely to have lower lymphocyte counts compared to AC carriers. Previously, it was suggested that these genotypes are associated with decreased transcriptional activity of TNF- α , as they probably affect binding of nuclear proteins to the gene promoter region (Kaluza *et al*, 2000; Skoog *et al*, 1999). In cHL, TNF- α is mainly produced by H-RS, and it has an important role in modulation of T-cell response attracting Th1 cells into the tumor microenvironment and regulating the production of other proinflammatory cytokines (Steidl *et al*, 2011). As Th1 response is required against EBV infection (Young & Rickinson, 2004), it could be speculated that the presence of SNPs that impair TNF- α production would impact the viral clearance, allowing the persistence of EBV-positive H-RS cells.

No association of SNPs/pTNF- α with cHL outcome was found in this study. Likewise, a previous study by Hohaus *et al* showed no association of SNPs/pTNF- α at positions -308 and -862 and with FFTF in 184 patients with HL (Hohaus *et al*, 2007). Noteworthy, tissue levels of TNF- α is not influenced by the genetic background of the host alone, but also by post-transcriptional regulatory mechanisms, which contribute to the final result concerning the cytokine's biological activity. Indeed, the effect of polymorphism in TNF- α production is highly complex, with several variants possibly showing cooperative effects (Bayley *et al*, 2004).

The prognostic value of IL-10 serum levels in HL has been established in other studies (Sarris *et al*, 1999; Herling *et al*, 2003; Vassilakopoulos *et al*, 2001; Bohlen *et al*, 2000; Viviani *et al*, 2000). The circulating levels of IL10 seems to be influenced by SNPs/pIL10 at positions -592 and -1082, with impact on prognosis (Hohaus *et al*, 2009). Considering that IL-10 levels are partially influenced by genetic background, it is conceivable that some SNPs within the IL-10 gene influence the clinical presentation and outcomes in cHL. Indeed, in this study the genotype AA at SNPs/pIL-10 positions -592 and -1082 were associated with leukocytosis and lower lymphocyte counts at diagnosis. Moreover, the AA genotype at SNP/pIL-10 -592 was strongly associated with less frequent mediastinum involvement, and it had weak association with higher eosinophil counts and lower LDH values.

The presence of the A allele at either SNP/pIL-10 positions -592 or -1082 seems to be associated with lower IL-10 production compared to the G and C alleles at SNPs/pIL-10 -1082 and -592, respectively (Eskdale *et al*, 1998; Crawley *et al*, 1999; Gibson *et al*, 2001). It has been proposed that A allele confers high ligation affinity to nuclear proteins, like PU.1 at -592 site and STAT3 at -1082 site, both of which repress IL-10 transcription (Eskdale *et al*, 1998; Crawley *et al*, 1999; Kurreeman, 2004). In this setting, the anti-inflammatory effects of IL-10 would be diminished, leading to a shift towards the production of proinflammatory cytokines, including TNF- α and IL-6, which are known to influence leukocyte chemoattraction (including eosinophils) and tissue

redistribution, as well as lymphocyte apoptosis (Ulich *et al*, 1989; Jundt *et al*, 1999). However, studies on the impact of SNPs/pIL-10 -592 and -1082 in cytokine production generated conflicting results: for instance, it was suggested that haplotypes containing the G allele at SNP/pIL-10 -1082 are associated with decreased IL-10 production (Gibson *et al*, 2001; Kilpinen *et al*, 2002). It is important to note that these studies employed different cell types and experimental conditions, including a sort of cell stimulation methods that could account for the conflicting data. Additionally, *in vitro* models are not reliable mimics for real tumor microenvironment, where many other stimuli influence cytokine production. Although AC/CC group for SNP/pIL-10 -592 was found to have more mediastinum involvement, it was not necessarily bulky disease. In fact, SNP/pIL-10 -592 genotypes were not associated with any other particular site of cHL presentation (data not shown). Altogether, these findings do not allow any conclusion about the influence of IL-10 production in anatomic distribution of cHL.

In this study, the AA genotype for SNP/pIL-10 -592 in cHL patients was significantly associated with lower levels of ESR compared to the AC or CC genotypes. ESR (an important prognostic factor in cHL) increases due to high synthesis of acute phase proteins, especially fibrinogen. Reduction in IL-10 production would be expected in AA carriers for SNP/pIL-10, so that it would be associated with higher ESR values due to a shift towards activity of proinflammatory cytokines. Although it typically acts as an anti-inflammatory cytokine, IL-10 induces the synthesis of a plethora of plasmatic proteins which might influence ESR values (Acuner-Ozbabacan *et al*, 2014). Furthermore, it is important to point out that ESR values in this study were available only for 34 cHL patients, so that this association must be evaluated with caution.

Likewise SNPs/pTNF- α , SNPs/pIL10 -592 and -1082 genotypes showed no association with FFTF, although some associations have been reported elsewhere (Hohaus *et al*, 2007; Schoof *et al*, 2013). One possible explanation for these conflicting findings is the low number of patients included in the present

cohort. Notheworthy, due to the study design, most of cHL cases were retrospectively included thus inducing a potential selection bias.

Different mechanisms are involved in NF κ B activation in cHL, including mutations in the genes of the NF κ B inhibitors (NF κ BIA and NF κ BIE) (Lake *et al*, 2009; Liu *et al*, 2010) and genomic gains of *REL* (Martin-Subero *et al*, 2002). In cHL, SNP/iNF κ B1 was shown to influence risk of developing the disease (Chang *et al*, 2009). As far as it could be verified, this study was the first to report associations between SNP/iNF κ B1 with prognostic parameters in cHL. Compared to AG genotype for SNP/iNF κ B1, the AA genotype was significantly associated with advanced clinical stage and presence of extranodal disease at diagnosis, suggesting a possible association of this polymorphism with a more aggressive behavior of cHL. This may explain why patients carrying AA for SNP/iNF κ B1 had shorter duration of symptoms until the first medical appointment.. Conversely, the AA genotype for SNP/iNF κ B1 was less likely to present with leukocytosis, a condition usually associated with less aggressive cHL presentation. However, the number of patients with leukocyte counts above 15.000 cells/mm³ was low (10/73) which could eventually have influenced final results. Unfortunately not enough is known about the role of this intronic SNP in the regulation of NF κ B1 gene.

By the multivariate analysis, well-established associations with shorter FFTF were confirmed in this study (e.g., weight loss, advanced stage and presence of mediastinal mass), but no associations were found with any of the SNPs genotypes identified.

Some limitations of this study must be highlighted. A higher number of cHL cases enrolled would be desirable to strength - or even disclose - relevant associations among the SNPs and prognostic parameters evaluated. For instance, as our cohort have only 73 patients and the occurrence of censoring events in cHL is not frequent, the power to survival analysis performed may have been adversely affected. A bigger cohort in this study could not be achieved due to the number of cHL patients assisted in our academic hospital; on the other hand, a multicenter study in our setting would be challenging in respect to

standardization of protocols for patient's treatment and follow-up. Moreover, as many of our patients were recruited retrospectively, a potential selection bias cannot be ruled out. Finally, it should be noted that any evaluation of genotype-phenotype associations must consider the possible effects of SNPs, gene-gene, and gene-environment interactions that can influence the regulatory activity of cytokines.

In conclusion, this study showed that some genotypes for SNPs in genes encoding for IL-10 and TNF-alpha, as well as in NFKB1 gene, are associated with prognostic parameters of cHL, but no association was observed regarding disease outcome. Further analysis including haplotype combinations and a gene-gene interaction model based on related gene functions would be useful to define more precisely the role of polymorphisms in cHL and its applicability in clinical practice.

Acknowledgements

The authors wish to thank Eloisa Elena Paschoalinotte, PhD, Prof. Paulo Eduardo Martins Ribolla, Prof. Marcos Ferreira Minicucci and Prof. Paula Schmidt Azevedo Gaiolla for their support with the statistical analysis.

RDG has selected the subjects, retrieved medical data, performed clinical follow-up and experiments, analyzed data, and wrote the paper. MPTM performed all histopathological diagnosis and reviews. DEO designed the research study, evaluated the results, contributed with expertise, essential reagents/equipment, and wrote the paper. This study was partially funded with research grants awarded to DEO by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) and the State University of Sao Paulo (UNESP). RDG had scholarship awarded by the Brazilian Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES; Proc. BEX: 9370/12-9).

References

- Acuner-Ozbabacan, E.S., Engin, B.H., Guven-Maiorov, E., Kuzu, G., Muratcioglu, S., Baspinar, A., Chen, Z., Van Waes, C., Gursoy, A. & Keskin, O. (2014) The structural network of Interleukin-10 and its implications in inflammation and cancer. *BMC Genomics*, **15**, S2.
- Adamzik, M., Schafer, S., Frey, U.H., Becker, A., Kreuzer, M., Winning, S., Frede, S., Steinmann, J., Fandrey, J., Zacharowski, K., Siffert, W., Peters, J. & Hartmann, M. (2013) The NFKB1 promoter polymorphism (-94ins/delATTG) alters nuclear translocation of NF- κ B1 in monocytes after lipopolysaccharide stimulation and is associated with increased mortality in sepsis. *Anesthesiology*, **118**, 123-133.
- Aldinucci, D., Gloghini, A., Pinto, A., De Filippi, R. & Carbone, A. (2010) The classical Hodgkin's lymphoma microenvironment and its role in promoting tumour growth and immune escape. *The Journal of Pathology*, **221**, 248-263.
- Bayley, J.-P., Ottenhoff, T.H.M. & Verweij, C.L. (2004) Is there a future for TNF promoter polymorphisms? *Genes and Immunity*, **5**, 315-329.
- Bohlen, H., Kessler, M., Sextro, M., Diehl, V. & Tesch, H. (2000) Poor clinical outcome of patients with Hodgkin's disease and elevated interleukin-10 serum levels. Clinical significance of interleukin-10 serum levels for Hodgkin's disease. *Annals of Hematology*, **79**, 110-113.
- Casasnovas, R.-O., Mounier, N., Brice, P., Divine, M., Morschhauser, F., Gabarre, J., Blay, J.-Y., Voillat, L., Lederlin, P., Stamatoullas, A., Biennu, J., Guiguet, M., Intrator, L., Grandjean, M., Brière, J., Ferme, C. & Salles, G. (2007) Plasma cytokine and soluble receptor signature predicts outcome of patients with classical Hodgkin's lymphoma: a study from the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *Journal of Clinical Oncology*, **25**, 1732-1740.

- Chang, E.T., Birmann, B.M., Kasperzyk, J.L., Conti, D.V., Kraft, P., Ambinder, R.F., Zheng, T. & Mueller, N.E. (2009) Polymorphic Variation in NFKB1 and Other Aspirin-Related Genes and Risk of Hodgkin Lymphoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, **18**, 976-986.
- Cheson, B.D., Fisher, R.I., Barrington, S.F., Cavalli, F., Schwartz, L.H., Zucca, E. & Lister, T.A. (2014) Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *Journal of Clinical Oncology*, **32**, 3059-3067.
- Connors, J.M. (2015) Risk assessment in the management of newly diagnosed classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, **125**, 1693-1702.
- Crawley, E., Kay, R., Sillibourne, J., Patel, P., Hutchinson, I. & Woo, P. (1999) 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 and Rheumatism*, **42**, 1101-1108.
- Diehl, V., Thomas, R.K. & Re, D. (2004) Part II: Hodgkin's lymphoma--diagnosis and treatment. *The Lancet Oncology*, **5**, 19-26.
- Eichenauer, D.A. & Engert, A. (2012) Advances in the treatment of Hodgkin lymphoma. *International Journal of Hematology*, **96**, 535-543.
- Eskdale, J., Gallagher, G., Verweij, C.L., Keijsers, V., Westendorp, R.G. & Huizinga, T.W. (1998) Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**, 9465-9470.
- Foss, H.D., Herbst, H., Oelmann, E., Samol, J., Grebe, M., Blankenstein, T., Matthes, J., Qin, Z.H., Falini, B. & Pileri, S. (1993) Lymphotoxin, tumour necrosis factor and interleukin-6 gene transcripts are present in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of most Hodgkin's disease cases. *British Journal of Haematology*, **84**, 627-635.

- Gibson, A.W., Edberg, J.C., Wu, J., Westendorp, R.G., Huizinga, T.W. & Kimberly, R.P. (2001) Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **166**, 3915-3922.
- Hasenclever, D. & Diehl, V. (1998) A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. *The New England Journal of Medicine*, **339**, 1506-1514.
- Hayden, M.S. (2004) Signaling to NF- κ B. *Genes & Development*, **18**, 2195-2224.
- Herbst, H., Foss, H.D., Samol, J., Araujo, I., Klotzbach, H., Krause, H., Agathangelou, A., Niedobitek, G. & Stein, H. (1996) Frequent expression of interleukin-10 by Epstein-Barr virus-harboring tumor cells of Hodgkin's disease. *Blood*, **87**, 2918-2929.
- Herling, M., Rassidakis, G.Z., Medeiros, L.J., Vassilakopoulos, T.P., Kliche, K.-O., Nadali, G., Viviani, S., Bonfante, V., Giardini, R., Chilosi, M., Kittas, C., Gianni, A.M., Bonadonna, G., Pizzolo, G., Pangalis, G.A., Cabanillas, F. & Sarris, A.H. (2003) Expression of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's lymphoma: associations with presenting features, serum interleukin 10 levels, and clinical outcome. *Clinical Cancer Research*, **9**, 2114-2120.
- Hohaus, S., Giachelia, M., Di Febo, A., Martini, M., Massini, G., Vannata, B., Alo', F. D', Guidi, F., Greco, M., Pierconti, F., Larocca, L., Voso, M. & Leone, G. (2007) Polymorphism in cytokine genes as prognostic markers in Hodgkin's lymphoma. *Annals of Oncology*, **18**, 1376-1381.
- Hohaus, S., Giachelia, M., Massini, G., Vannata, B., Criscuolo, M., Martini, M., Alo', F. D', Voso, M.T., Larocca, L.M. & Leone, G. (2009) Clinical significance of interleukin-10 gene polymorphisms and plasma levels in Hodgkin lymphoma. *Leukemia Research*, **33**, 1352-1356.

- Jost, P.J. & Ruland, J. (2006) Aberrant NF- κ B signaling in lymphoma: mechanisms, consequences and therapeutic implications. *Blood*, **109**, 2700-2707.
- Jundt, F., Anagnostopoulos, I., Bommert, K., Emmerich, F., Muller, G., Foss, H.D., Royer, H.D., Stein, H. & Dorken, B. (1999) Hodgkin/Reed-Sternberg cells induce fibroblasts to secrete eotaxin, a potent chemoattractant for T cells and eosinophils. *Blood*, **94**, 2065-2071.
- Kaluza, W., Reuss, E., Grossmann, S., Hug, R., Schopf, R.E., Galle, P.R., Maerker-Hermann, E. & Hoehler, T. (2000) Different transcriptional activity and in vitro TNF- α production in psoriasis patients carrying the TNF- α 238A promoter polymorphism. *Journal of Investigative Dermatology*, **114**, 1180-1183.
- Kilpinen, S., Huhtala, H. & Hurme, M. (2002) 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. *European Cytokine Network*, **13**, 66-71.
- Koc, A., Batar, B., Celik, O., Onaran, I., Tasan, E. & Sultuybek, G.K. (2014) Polymorphism of the NFKB1 affects the serum inflammatory levels of IL-6 in Hashimoto thyroiditis in a Turkish population. *Immunobiology*, **219**, 531-536.
- Kononen, J., Bubendorf, L., Kallioniemi, A., Barlund, M., Schraml, P., Leighton, S., Torhorst, J., Mihatsch, M.J., Sauter, G. & Kallioniemi, O.P. (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Medicine*, **4**, 844-847.
- Küppers, R. (2008) The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nature Reviews Cancer*, **9**, 15-27.
- Kurreeman, F.A.S. (2004) Transcription of the IL10 gene reveals allele-specific regulation at the mRNA level. *Human Molecular Genetics*, **13**, 1755-1762.
- Lake, A., Shield, L.A., Cordano, P., Chui, D.T.Y., Osborne, J., Crae, S., Wilson, K.S., Tosi, S., Knight, S.J.L., Gesk, S., Siebert, R., Hay, R.T. & Jarrett, R.F. (2009)

- Mutations of *NFKBIA*, encoding $I\kappa B\alpha$, are a recurrent finding in classical Hodgkin lymphoma but are not a unifying feature of non-EBV-associated cases. *International Journal of Cancer*, **125**, 1334-1342.
- Levy, Y. & Brouet, J.C. (1994) Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. *The Journal of Clinical Investigation*, **93**, 424-428.
- Lister, T.A., Crowther, D., Sutcliffe, S.B., Glatstein, E., Canellos, G.P., Young, R.C., Rosenberg, S.A., Coltman, C.A. & Tubiana, M. (1989) Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *Journal of Clinical Oncology*, **7**, 1630-1636.
- Liu, X., Yu, H., Yang, W., Zhou, X., Lu, H. & Shi, D. (2010) Mutations of *NFKBIA* in biopsy specimens from Hodgkin lymphoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, **197**, 152-157.
- Martin-Subero, J.I., Gesk, S., Harder, L., Sonoki, T., Tucker, P.W., Schlegelberger, B., Grote, W., Novo, F.J., Calasanz, M.J., Hansmann, M.L., Dyer, M.J.S. & Siebert, R. (2002) Recurrent involvement of the *REL* and *BCL11A* loci in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, **99**, 1474-1477.
- Matsuki, E. & Younes, A. (2015) Lymphomagenesis in Hodgkin lymphoma. *Seminars in Cancer Biology*, in press.
- Monroy, C.M., Cortes, A.C., Lopez, M.S., Amelio, A.M. D', Etzel, C.J., Younes, A., Strom, S.S. & El-Zein, R.A. (2011) Hodgkin disease risk: Role of genetic polymorphisms and gene-gene interactions in inflammation pathway genes. *Molecular Carcinogenesis*, **50**, 36-46.
- Nakayama, S., Yokote, T., Tsuji, M., Akioka, T., Miyoshi, T., Hirata, Y., Hiraoka, N., Iwaki, K., Takayama, A., Nishiwaki, U. & others (2014) Expression of tumour necrosis factor- α and its receptors in Hodgkin lymphoma. *British Journal of Haematology*, **167**, 574-577.
- de Oliveira, D.E., Ballon, G. & Cesarman, E. (2010) NF-kappaB signaling modulation by EBV and KSHV. *Trends in Microbiology*, **18**, 248-257.

- Packer, B.R., Yeager, M., Burdett, L., Welch, R., Beerman, M., Qi, L., Sicotte, H., Staats, B., Acharya, M., Crenshaw, A., Eckert, A., Puri, V., Gerhard, D.S. & Chanock, S.J. (2006) SNP500Cancer: a public resource for sequence validation, assay development, and frequency analysis for genetic variation in candidate genes. *Nucleic Acids Research*, **34**, D617-621.
- Raabe, T., Bukrinsky, M. & Currie, R.A. (1998) Relative contribution of transcription and translation to the induction of tumor necrosis factor- α by lipopolysaccharide. *The Journal of Biological Chemistry*, **273**, 974-980.
- R Core Team (2015) R: A Language and Environment for Statistical Computing Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing Available at: <http://www.R-project.org>.
- Reuss, E., Fimmers, R., Kruger, A., Becker, C., Rittner, C. & Höhler, T. (2002) Differential regulation of interleukin-10 production by genetic and environmental factors - a twin study. *Genes and Immunity*, **3**, 407-413.
- Sarris, A.H., Kliche, K.O., Pethambaram, P., Preti, A., Tucker, S., Jackow, C., Messina, O., Pugh, W., Hagemester, F.B., McLaughlin, P., Rodriguez, M.A., Romaguera, J., Fritsche, H., Witzig, T., Duvic, M., Andreeff, M. & Cabanillas, F. (1999) Interleukin-10 levels are often elevated in serum of adults with Hodgkin's disease and are associated with inferior failure-free survival. *Annals of Oncology*, **10**, 433-440.
- Schoof, N., Franklin, J., Furst, R., Zander, T., Bonin, F. von, Peyrade, F., Trumper, L., Diehl, V., Engert, A., Kube, D. & Re, D. (2013) Interleukin-10 Gene Polymorphisms are Associated With Freedom From Treatment Failure for Patients With Hodgkin Lymphoma. *The Oncologist*, **18**, 80-89.
- Da Silva, G.N., Bacchi, M.M., Rainho, C.A. & De Oliveira, D.E. (2007) Epstein-Barr virus infection and single nucleotide polymorphisms in the promoter region of interleukin 10 gene in patients with Hodgkin lymphoma. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, **131**, 1691-1696.

- Skinnider, B.F. (2002) The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, **99**, 4283-4297.
- Skoog, T., van't Hooft, F.M., Kallin, B., Jovinge, S., Boquist, S., Nilsson, J., Eriksson, P. & Hamsten, A. (1999) A common functional polymorphism (C→ A substitution at position- 863) in the promoter region of the tumour necrosis factor- α (TNF- α) gene associated with reduced circulating levels of TNF- α . *Human Molecular Genetics*, **8**, 1443-1449.
- Smith, A.J.P. & Humphries, S.E. (2009) Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **20**, 43-59.
- Steidl, C., Connors, J.M. & Gascoyne, R.D. (2011) Molecular Pathogenesis of Hodgkin's Lymphoma: Increasing Evidence of the Importance of the Microenvironment. *Journal of Clinical Oncology*, **29**, 1812-1826.
- Strassberg, S.S., Cristea, I.A., Qian, D. & Parton, L.A. (2007) Single nucleotide polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha and the susceptibility to bronchopulmonary dysplasia. *Pediatric Pulmonology*, **42**, 29-36.
- Torres-Espindola, L.M., Velazquez-Cruz, R., Falfan-Valencia, R., Chavez-Pacheco, J.L., Salcedo-Vargas, M., de Jesus Nambo-Lucio, M., Salinas-Lara, C., Alemon-Medina, R., Granados-Montiel, J., Reyes-Servin, M.A., Granados, J. & de Jesus Castillejos-Lopez, M. (2014) Genetic polymorphism of tumor necrosis factor promoter region and susceptibility to develop Hodgkin lymphoma in a Mexican population. *Leukemia & Lymphoma*, **55**, 1295-1299.
- Ugialoro, A.M., Turbay, D., Pesavento, P.A., Delgado, J.C., McKenzie, F.E., Gribben, J.G., Hartl, D., Yunis, E.J. & Goldfeld, A.E. (1998) Identification of three new single nucleotide polymorphisms in the human tumor necrosis factor-alpha gene promoter. *Tissue Antigens*, **52**, 359-367.
- Ulich, T.R., del Castillo, J., Ni, R.X., Bikhazi, N. & Calvin, L. (1989) Mechanisms of tumor necrosis factor alpha-induced lymphopenia, neutropenia, and biphasic neutrophilia: a study of lymphocyte recirculation and hematologic

- interactions of TNF alpha with endogenous mediators of leukocyte trafficking. *Journal of Leukocyte Biology*, **45**, 155-167.
- Varga, G., Mikala, G., Andrikovics, H., Koszarska, M., Balassa, K., Ádám, E., Kozma, A., Tordai, A. & Masszi, T. (2015) *NFKB1* – 94ins/delATTG polymorphism is a novel prognostic marker in first line-treated multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, **168**, 679-688.
- Vassalli, P. (1992) The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annual Review of Immunology*, **10**, 411-452.
- Vassilakopoulos, T.P., Nadali, G., Angelopoulou, M.K., Siakantaris, M.P., Dimopoulou, M.N., Kontopidou, F.N., Rassidakis, G.Z., Doussis-Anagnostopoulou, I.A., Hatzioannou, M., Vaiopoulos, G., Kittas, C., Sarris, A.H., Pizzolo, G. & Pangalis, G.A. (2001) Serum interleukin-10 levels are an independent prognostic factor for patients with Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*, **86**, 274-281.
- Venkataraman, G., Mirza, M.K., Eichenauer, D.A. & Diehl, V. (2014) Current status of prognostication in classical Hodgkin lymphoma. *British Journal of Haematology*, **165**, 287-299.
- Viviani, S., Notti, P., Bonfante, V., Verderio, P., Valagussa, P. & Bonadonna, G. (2000) Elevated pretreatment serum levels of Il-10 are associated with a poor prognosis in Hodgkin's disease, the milan cancer institute experience. *Medical Oncology*, **17**, 59-63.
- Warzocha, K., Bienvenu, J., Ribeiro, P., Moullet, I., Dumontet, C., Neidhardt-Berard, E.M., Coiffier, B. & Salles, G. (1998) Plasma levels of tumour necrosis factor and its soluble receptors correlate with clinical features and outcome of Hodgkin's disease patients. *British Journal of Cancer*, **77**, 2357.
- Yang, X., Li, P., Tao, J., Qin, C., Cao, Q., Gu, J., Deng, X., Wang, J., Liu, X., Wang, Z., Wu, B., Gu, M., Lu, Q. & Yin, C. (2014) Association between *NFKB1* –94ins/del ATTG Promoter Polymorphism and Cancer Susceptibility: An Updated Meta-Analysis. *International Journal of Genomics*, **2014**, 1-8.

Young, L.S. & Rickinson, A.B. (2004) Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nature Reviews Cancer*, **4**, 757-768.

Conclusão

- A distribuição dos diferentes genótipos dos SNPs estudados foi semelhante entre o grupo de pacientes e o grupo-controle, com exceção do homozigoto GG para o SNP/pIL-10 -1082 que foi menos frequentemente observado no grupo de pacientes com LHc;
- Em relação aos SNPs no gene de TNF- α , o genótipo AG do SNP/pTNF- α -238 foi mais frequentemente associado à infecção pelo EBV e o homozigoto CC do SNP/pTNF- α -862 foi associado à contagem mais baixa de linfócitos quando comparado aos genótipos AC/AA agrupados. Não foram observadas outras associações entre SNPs/pTNF- α com as demais variáveis clínicas e laboratoriais;
- Para os SNPs/pIL10, o homozigoto AA do SNP/pIL10 -1082 foi significativamente associado à apresentação clínica com leucócitos $\geq 15.000/\text{mm}^3$ e apresentou tendência à associação com menores contagens de linfócitos e menores valores de albumina quando comparado aos genótipos AG e GG. Já os homozigotos AA do SNP/pIL10 -592 apresentaram associação com leucócitos $\geq 15.000/\text{mm}^3$, linfócitos < 800 células/ mm^3 , menores valores de VHS e menor frequência de acometimento mediastinal ao diagnóstico quando comparado ao grupo AC/CC. Adicionalmente, homozigoto AA do SNP/pIL10 -592 apresentou tendência à associação com maiores contagens de eosinófilos e menores valores de DHL em comparação ao grupo AC/CC.
- Homozigotos AA do SNP/iNF κ B1 apresentaram-se mais frequentemente com doença extranodal e estágio IV ao diagnóstico e estiveram associados a tempo mais curto entre o início dos sintomas e a primeira avaliação médica quando comparados ao genótipo AG. Adicionalmente, foi observada menor frequência de contagem de leucócitos $\geq 15.000/\text{mm}^3$ e tendência à associação com menores contagens de monócitos em pacientes com genótipo AA do SNP/iNF κ B1 em comparação ao genótipo AG;

- Perda de peso, presença de massa mediastinal e estágio avançado foram significativamente associados a menor sobrevida livre de falha de tratamento, enquanto tempo para diagnóstico do LHc apresentou tendência para essa associação;
- Nenhum dos SNPs estudados apresentou associação significativa com a sobrevida livre de falha de tratamento.

ANEXOS (SUPPORTING INFORMATION)

Table S1. Oligonucleotide sequences used to detect SNPs/pTNF- α at positions -238 and -862, SNPs/pIL-10 at positions -592 and -1082 and SNP/iNF κ B1 using qPCR-HRM.

Target	Oligonucleotide (Sequence 5'-3')	Amplicon
SNP/pTNF- α -238	CAGTCAGTGGCCCAGAAGAC AGCATCAAGGATACCCCTCACA	75 pb
SNP/pTNF- α -862	ATGTAGCGGCTCTGAGGAATGGGTTAC CTACATGGCCCTGTCTTCGTTAAG	132 pb
SNP/pIL-10 -1082	ATCCAAGACAACACTACTAA GTGGAAGAAGTTGAAATAAC	130 pb
SNP/pIL-10 -592	GAAGAGGTGGAAACATGTG TAAATATCCTCAAAGTTCC	146 pb
SNP/iNF κ B1	AGCCAGCATGATAGAACTC TCTGAGTCCTTCAGAACATG	201 pb

Table S2. qPCR conditions and cycling pattern used to amplify SNPs/pTNF- α at positions -238 and -862, SNPs/pIL-10 at positions -592 and -1082 and SNP/iNF κ B1.

Reaction	Reaction Composition	Cycling Pattern
SNP/pTNF- α -238 G>A	Buffer (Tris-Cl 28 mM pH 8.4 / KCl 70mM) 1X, 2.0mM MgCl ₂ , 0.2mM each dNTP, 1.25U DNA polymerase (Taq), Eva Green 1X and 0.2 μ M of each primer.	94°C – 10min(1x); 94°C–30s, 58°C–20s, 72°C–20s (40x)
SNP/pTNF- α -862 C>A	Buffer (Tris-Cl 28mM pH 8.4 / KCl 70 mM) 1X, 2.5mM MgCl ₂ , 0.2mM each dNTP, 1.25U DNA polymerase (Taq) Eva Green 1X and 0.15 μ M of each primer.	94°C–5min(1x); 94°C–20s, 58°C–20s 72°C–20s (40x)
SNP/pIL-10 -592 C>A	Buffer (Tris-Cl 28 mM pH 8.4 / KCl 70mM) 1X, 2.0mM MgCl ₂ , 0.2mM each dNTP, 1.25U DNA polymerase (Taq), Eva Green 1X and 0.3 μ M of each primer.	94°C – 5min(1x); 94°C–60s, 55°C–60s, 72°C–60s (40x)
SNP/pIL-10 -1082 A>G	Buffer (Tris-Cl 28mM pH 8.4 / KCl 70 mM) 1X, 3.0mM MgCl ₂ , 0.2mM each dNTP, 1.25U DNA polymerase (Taq) Eva Green 1X and 0.4 μ M of each primer.	94°C–5min(1x); 94°C–60s, 55°C–60s 72°C–60s (40x)
SNP/iNF κ B1 A>G	Buffer (Tris-Cl 28mM pH 8.4 / KCl 70 mM) 1X, 2.5mM MgCl ₂ , 0.2mM each dNTP, 1.25U DNA polymerase (Taq) Eva Green 1X and 0.25 μ M of each primer.	94°C–5min(1x); 94°C–30s, 55°C–20s 72°C–30s (40x)

Table S3. Genotype distribution of SNP/pTNF- α -238 and -862, SNP/pIL10 -592 and -1082, and SNP/iNF κ B1 in cHL patients and controls.

Polymorphism	Genotype	Patients		Controls		P
		N	%	N	%	
TNF-238 (rs361525)	GG	64	87,7	68	93,2	0,25
	AG	9	12,3	5	6,8	
TNF-862 (rs1800630)	AA	8	11	7	9,6	0,3
	CA	29	39,7	21	28,8	
	CC	36	49,3	45	61,6	
IL-10-592 (rs1800872)	AA	8	11	8	11	0,98
	CA	34	46,6	33	45,2	
	CC	31	42,4	32	43,8	
IL10-1082 (rs1800896)	AA	34	46,6	28	38,4	0,04
	GA	37	50,7	35	47,9	
	GG	2	2,7	10	13,7	
NF κ B1 (rs1585215)	AA	48	65,8	43	58,9	0,49
	AG	25	34,2	29	39,7	
	GG	0	0	1	1,4	

Table S4. Associations of ungrouped SNP/pTNF- α -862 genotypes with clinical features of patients with cHL.

Features (n)	Patients (%)	TNF α -862			P
		AA	AC	CC	
Age (73)					
19-44 years	60 (82,2)	7 (11,66)	25 (41,66)	28 (46,66)	0,62
≥ 45 years	13 (17,8)	1 (7,7)	8 (61,5)	4 (30,8)	
Gender (73)					
Male	42 (57,5)	3 (7,1)	18 (42,9)	21 (50)	0,45
Female	31 (42,5)	5 (16,1)	11 (35,5)	15 (48,4)	
Ann-Arbor stage (73)					
I - II	42 (57,5)	3 (7,1)	19 (45,2)	20 (47,7)	0,32
III - IV	31 (42,5)	5 (16,1)	10 (32,3)	16 (51,6)	
B-symptoms (73)					
Present	43 (58,9)	5 (11,6)	18 (41,9)	20 (46,5)	0,89
Absent	30 (41,1)	3 (10)	11 (36,7)	16 (53,3)	
Histology (73)					
Nodular sclerosis	53 (72,6)	4 (7,5)	23 (43,4)	26 (49,1)	0,34
Mixed cellularity	10 (13,8)	3 (30)	2 (20)	5 (50)	
Lymphocyte rich	1 (1,3)	0	1 (100)	0	
Classical NOS	9 (12,3)	1 (11,1)	3 (33,3)	5 (55,6)	
Bulky mediastinal mass					
Yes	16 (21,9)	0	8 (50)	8 (50)	0,3
No	57 (78,1)	8 (14)	21 (36,9)	28 (49,1)	
Number of nodal areas (73)					
≥ 3	33 (45,2)	4 (12,1)	11 (33,3)	18 (55,6)	0,66
< 3	40 (54,8)	4 (10)	18 (45)	18 (45)	
Extranodal disease (73)					
Present	22 (30,1)	2 (9,1)	7 (31,8)	13 (59,1)	0,54
Absent	51 (69,9)	6 (11,8)	22 (43,1)	23 (45,1)	
Abdominal disease (73)					
Present	25 (34,3)	3 (12)	9 (36)	13 (52)	0,93
Absent	48 (65,7)	5 (10,4)	20 (41,7)	23 (47,9)	
Bone marrow involvement (73)					
Present	10 (13,7)	1 (10)	4 (40)	5 (50)	1,0
Absent	63 (86,3)	7 (11,1)	25 (39,7)	31 (49,2)	

Table S4 continued. Associations of ungrouped SNP/pTNF- α -862 genotypes with clinical features of patients with cHL.

Features (n)	Patients (%)	TNF α -862			P
		AA	CA	CC	
Hemoglobin <10,5g/dL (73)					
Present	18 (24,7)	2 (11,1)	5 (27,8)	11 (61,1)	0,42
Absent	55 (75,3)	6 (10,9)	24 (43,6)	25 (45,5)	
Leukocytes \geq 15,000/mm³ (72)					
Present	10 (13,9)	1 (10)	4 (40)	5 (50)	0,99
Absent	62 (86,1)	7 (11,3)	25 (40,3)	30 (48,4)	
Lymphocytes < 800/mm³ (72)					
Present	11 (15,3)	2 (18,2)	3 (27,3)	6 (54,5)	0,54
Absent	61 (84,7)	6 (9,8)	26 (42,6)	29 (47,6)	
High ESR (34)					
Yes	20 (58,5)	1 (5)	9 (45)	10 (50)	0,73
No	14 (41,2)	1 (7,1)	4 (28,6)	9 (64,3)	
EBV infection (61)					
Present	21 (34,4)	4 (19)	7 (33,3)	10 (47,7)	0,4
Absent	40 (65,6)	3 (7,5)	16 (40)	16 (52,5)	
Serum albumin (68)					
Normal	33 (48,5)	4 (12,1)	13 (39,4)	16 (48,5)	0,97
Low	35 (51,5)	4 (11,4)	13 (37,1)	18 (51,5)	
LDH (71)					
Normal	56 (78,9)	6 (10,7)	23 (41,1)	27 (48,2)	1,0
High	15 (21,1)	2 (13,3)	6 (40)	7 (46,7)	

NOS = not otherwise specified; ESR = erythrocyte sedimentation rate; EBV = Epstein Barr virus; LDH = lactate dehydrogenase.

Table S5. Associations of ungrouped SNP/pIL-10 -592 and -1082 genotypes with clinical features of patients with cHL.

Features (n)	Patients (%)	IL10-592			P	IL10-1082			P
		AA	AC	CC		AA	AG	GG	
Age (73)									
19 - 44 years	60 (82,2)	7(11,7)	28 (46,7)	25 (41,6)	0,92	29 (48,3)	29 (48,3)	2 (3,4)	0,69
≥ 45 years	13 (17,8)	1 (7,8)	6 (46,1)	6 (46,1)		5 (38,5)	8 (61,5)	0	
Gender (73)									
Male	42 (57,5)	6 (14,3)	21 (50)	15 (35,7)	0,31	20 (47,6)	21 (50)	1 (2,4)	0,96
Female	31 (42,5)	2 (6,5)	13 (41,9)	16 (51,6)		14 (45,2)	16 (51,6)	1 (3,2)	
Ann-Arbor stage (73)									
I - II	42 (57,5)	3 (7,1)	19 (45,2)	20 (47,7)	0,36	18 (42,9)	23 (57,8)	1 (2,3)	0,74
III - IV	31(42,5)	5 (16,1)	15 (48,4)	11 (35,5)		16 (51,6)	14 (45,2)	1 (3,2)	
B-symptoms (73)									
Present	43 (58,9)	4 (9,3)	19 (44,2)	20 (46,5)	0,74	21 (48,8)	20 (46,5)	2 (4,7)	0,49
Absent	30 (41,1)	4 (13,3)	15 (50)	11 (36,7)		13 (43,3)	17 (56,7)	0	
Histology (73)									
Nodular sclerosis	53 (72,6)	7 (13,2)	24 (45,3)	22 (41,5)	0,83	27 (50,9)	24 (45,3)	2 (3,8)	0,6
Mixed cellularity	10 (13,8)	1 (10)	5 (50)	4 (40)		3 (30)	7 (70)	0	
Lymphocyte rich	1 (1,3)	0	1 (100)	0		1 (100)	0	0	
Classical NOS	9 (12,3)	0	4 (44,4)	5 (50,6)		3 (33,3)	6 (66,7)	0	
Bulky mediastinal mass (73)									
Yes	16 (21,9)	1 (6,25)	8 (50)	7 (43,75)	0,92	9 (56,2)	6 (37,5)	1 (6,3)	0,27
No	57 (78,1)	7 (12,28)	26 (45,61)	24 (42,11)		25 (43,9)	31 (54,4)	1 (1,7)	
Number of nodal areas (73)									
≥ 3	33 (45,2)	3 (9,1)	18 (54,5)	12 (36,4)	0,50	16 (48,5)	16 (48,5)	1 (3)	0,9
< 3	40 (54,8)	5 (12,5)	16 (40)	19 (47,5)		18 (45)	21 (52,5)	1 (2,5)	
Extranodal disease (73)									
Present	22 (30,1)	1 (4,5)	12 (54,5)	9 (41)	0,44	9 (41)	12 (54,5)	1 (4,5)	0,71
Absent	51 (69,9)	7 (13,8)	22 (43,1)	22 (43,1)		25 (49)	25 (49)	1 (2)	
Abdominal disease (73)									
Present	25 (34,25)	4 (16)	13 (52)	8 (32)	0,33	13 (52)	12 (48)	0	0,66
Absent	48 (65,75)	4 (8,33)	21 (43,75)	23 (47,92)		21 (43,7)	25 (52,1)	2 (4,2)	
Bone marrow involvement (73)									
Present	10 (13,7)	1 (10)	4 (40)	5 (50)	0,88	3 (30)	7 (70)	0	0,48
Absent	63 (86,3)	7 (11,11)	30 (47,62)	26 (41,27)		31 (49,2)	30 (47,6)	2 (3,2)	

Table S5 continued. Associations of non-grouped SNP/pIL-10 -592 and -1082 genotypes with clinical features of patients with cHL.

Features	Patients (%)	IL10-592			P	IL10-1082			P
		AA	CA	CC		AA	GA	GG	
Hemoglobin <10,5g/dL (73)									
Present	18 (24,7)	2 (11,2)	8 (44,4)	8 (44,4)	1,0	10 (55,6)	7 (38,9)	1 (5,5)	0,31
Absent	55 (75,3)	6 (10,9)	26 (47,3)	23 (41,8)		24 (43,6)	30 (54,6)	1 (1,8)	
Leukocytes ≥ 15,000/mm³ (72)									
Present	10 (13,9)	2 (20)	2 (20)	6 (60)	0,14	7 (70)	2 (20)	1 (10)	0,05
Absent	62 (86,1)	5 (8,1)	32 (51,6)	25 (40,3)		26 (41,9)	35 (56,5)	1 (1,6)	
Lymphocytes < 800/mm³ (72)									
Present	11 (15,3)	1 (9,1)	6 (54,5)	4 (36,4)	0,86	7 (63,6)	4 (36,4)	0	0,4
Absent	61 (84,7)	6 (9,8)	28 (45,9)	27 (46,3)		26 (42,6)	33 (54,1)	2 (3,3)	
High ESR (34)									
Yes	20 (58,8)	0	10 (50)	10 (50)	0,12	9 (45)	10 (50)	1 (5)	0,84
No	14 (41,2)	3 (21,4)	5 (35,7)	6 (42,9)		8 (57,1)	6 (42,9)	0	
EBV infection(61)									
Present	21 (34,4)	2 (9,5)	10 (47,6)	9 (42,9)	0,9	8 (38)	13 (62)	0	0,54
Absent	40 (65,6)	5 (12,5)	17 (42,5)	18 (45)		18 (45)	20 (50)	2 (5)	
Serum albumin (68)									
Normal	33 (48,5)	4 (12,1)	16 (48,5)	13 (39,4)	0,72	15 (45,5)	17 (51,5)	1 (3)	0,96
Low	35 (51,5)	3 (8,6)	15 (42,8)	17 (56,6)		17 (48,6)	17 (48,6)	1 (2,8)	
LDH (71)									
Normal	56 (78,9)	7 (12,5)	25 (44,6)	24 (42,9)	0,84	26 (46,4)	29 (51,8)	1 (1,8)	0,53
High	15 (21,1)	1 (6,7)	8 (53,3)	6 (40)		7 (46,7)	7 (46,7)	1 (6,6)	

NOS = not otherwise specified; ESR = erythrocyte sedimentation rate; EBV = Epstein Barr virus; LDH = lactate dehydrogenase.

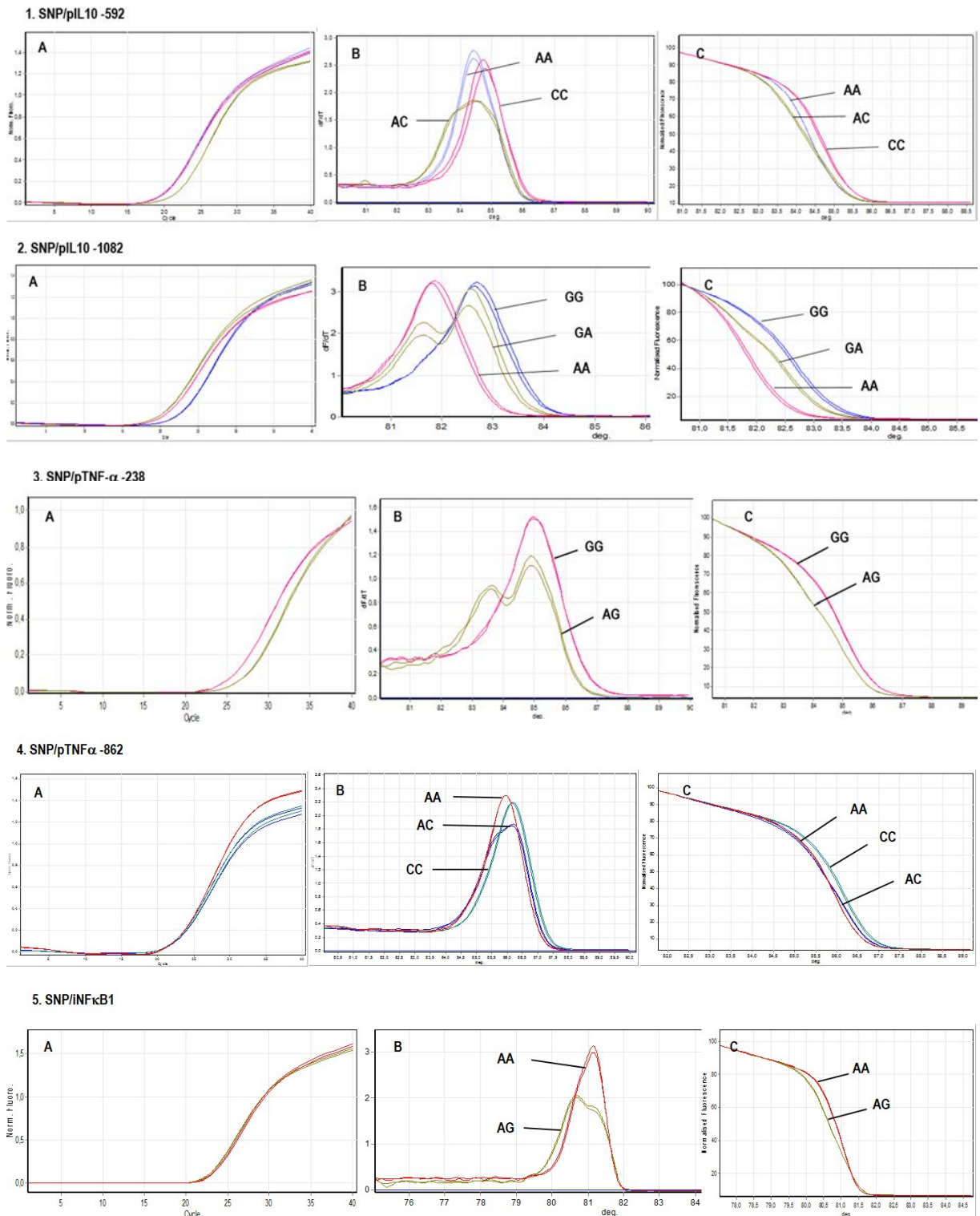


Figure S1. qPCR-HRM-based genotyping of the SNPs/pTNF- α -238 and -862, SNPs/pIL-10 -592 and -1082 and SNP/iNF κ B1. A) Amplification plot; B) Conventional melting analysis; C) High Resolution Melting Analysis (HRM).

Artigo científico referente ao trabalho desenvolvido durante programa de doutorado-sanduiche realizado na Weill Cornell Medical College, Cornell University, NY, EUA.