

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular

**INFLUÊNCIA DOS GENES *CCR2* E *CCR5* EM HIPERPLASIA E CÂNCER DE
PRÓSTATA**

Francis Maria Báó Zambra

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. José Artur Bogo Chies

Porto Alegre, março de 2012.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Instituição de origem:

- Laboratório de Imunogenética
Departamento de Genética
Instituto de Biociências
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Instituição colaboradora:

- Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral
Departamento de Fisiologia
UFRGS

Instituições Financiadoras:

- CNPq
- CAPES
- FAPERGS

*Para Jorge e Clair, meus pais,
e Para Diorge, meu irmão.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jorge e Clair, por todo amor, apoio e segurança que sempre me foi dado, por todos os ensinamentos, por investirem tanto em minha educação, por serem exemplos de amor, caráter e dedicação, e pela confiança em mim depositada.

Ao meu irmão Diorge, por todo amor, apoio, incentivo e confiança, pelos sábios conselhos, por sempre cuidar de mim e pelo exemplo que representa.

Ao meu namorado Caio, por seu amor, companheirismo, paciência e incentivo constante, pelas preciosas dicas que contribuíram para melhorar esse trabalho e por tornar meus dias melhores durante esta etapa.

À minha cunhada Fernanda, pessoa muito especial, por todo carinho, apoio, pelas boas conversas e conselhos, e por sempre garantir boas risadas.

Ao meu orientador Prof^o. Dr. José Artur Bogo Chies, por ter aceitado me orientar, pelo tanto que aprendi em seu laboratório, pela liberdade e oportunidade de crescimento profissional e pessoal, pela confiança, paciência, amizade, disposição e pelo exemplo de pesquisador que representa para mim.

À Prof^a. Ilma Brum e ao Dr. Vanderlei Biolchi, pelo empenho, colaboração e pelas amostras fornecidas. Em especial ao Vanderlei, por sua disposição e ajuda com todas as análises estatísticas. À Patrícia Martiny e suas ICs, pela ajuda com algumas informações do banco de dados.

Aos pacientes e indivíduos controle, por aceitarem participar desse estudo, tornando possível sua realização.

A todos os colegas do Laboratório de Imunogenética: Pedro, Bel, Jacque Priscila, Nayê, Camile, Tássia, Camila, Vivian, Raquel, Maurício B., Daniel G., Guilherme, Fernanda P., Fernanda R., Tatiana, Gabriela, Bruno e Cíntia, pelo auxílio, apoio e convivência. Em especial, à Pietra, ao Tiago D. e ao Bruno B., pelo companheirismo constante e pelos fortes laços de amizade criados, pelas boas conversas, conselhos e apoio, pelas brincadeiras e desabafos, pela parceria em disciplinas e estágio didático, por toda ajuda no laboratório e por saber que posso sempre contar com eles. À Juliana, com quem aprendi a preparar lindos géis de poliacrilamida, pela disposição e ajuda no laboratório. À Nadine, por sua ótima companhia dentro e fora da bancada, pelas angústias e boas risadas compartilhadas, pela ajuda no lab. e pela amizade. Ao Tiago V.,

pela troca de idéias, ajuda no lab., pelo apoio e incentivo. À Paula, pelas dicas e por sua importantíssima ajuda com as análises estatísticas na véspera do meu seminário de dados.

A todos os colegas do Núcleo de Bioinformática, Samuel, Dani, Jáder, Roberto (e seus bolos deliciosos), mas especialmente à Meg, ao Maurício R., Dinler e Gustavo, pelos laços de amizade criados, pelo companheirismo, pelas brincadeiras e boas risadas, pelos cafés e almoços animados, pela confiança e oportunidade de aprender sobre Bioinformática com eles. Agradeço ainda à Meg, por toda amizade, ajuda, apoio e por me ensinar muito sobre bioinformática. Ao Gustavo, por ter me recebido tão bem no lab. de Bioinformática e até pelas musiquinhas que cantava ao entrar na sala (e que permanecem eternamente na cabeça! hehe). Ao Dinler, por me ensinar muito sobre bioinformática, pelas ótimas conversas, por ser muito parceiro e sempre tão prestativo, me ajudando até quando não podia. E ao Maurício R., pela cumplicidade, apoio e confiança, pelas brincadeiras e até pelos sustos, e por ter me ajudado com seu caderno de estudo e dicas para a seleção do mestrado.

Ao Felipe, que é como um irmão para mim, por toda ajuda e apoio desde a graduação, em especial quando vim morar em Porto Alegre, pelos sábios conselhos e por todo incentivo. À Ana, agradeço pela grande amizade, confiança, apoio e pelo ombro amigo nos momentos difíceis. Ao Tadeu, pela grande amizade, por seu companheirismo, e por entender minha ausência quando havia uma penca de artigos para ler para o dia seguinte.

À Prof^a. Maria Cátira Bortolini e ao pessoal do Laboratório de Evolução Humana e Molecular, Caio, Vanessa, Clênio, Virgínia, Tábita, Eduardo, Rafael, Luana e Eli, pela convivência e por disponibilizarem seu banho-maria digital para parte dos meus experimentos.

Ao PPGBM e especialmente ao Elmo, por estar sempre disposto a ajudar a todos, mesmo assoberbado de trabalho, e por sua incrível eficiência e dedicação.

À UFRGS e ao CNPq, pelo apoio financeiro indispensável para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	7
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	10
<i>Capítulo 1</i> INTRODUÇÃO	11
1.1. Hiperplasia, câncer e quimiocinas.....	12
1.2. Hiperplasia Prostática Benigna.....	16
1.3. O câncer no Brasil e no mundo.....	19
1.4. Câncer de Próstata.....	20
1.5. Receptores de quimiocinas e seus ligantes.....	24
1.6. CCR2.....	29
1.7. CCR5.....	33
<i>Capítulo 2</i> JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	39
2.1. Justificativa.....	40
2.2. Objetivos.....	41
2.2.1. Gerais.....	41
2.2.2. Específicos.....	41
<i>Capítulo 3</i> MANUSCRITO EM PREPARAÇÃO	42
<i>Capítulo 4</i> DISCUSSÃO	65
<i>Capítulo 5</i> REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CaP	Câncer de próstata
CCL2	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i>
CCL5	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 5</i>
CCR2	<i>Chemokine (C-C motif) receptor 2</i>
CCR5	<i>Chemokine (C-C motif) receptor 5</i>
I	Isoleucina
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
IFN γ	Interferon-gama
IL-2	Interleucina-2
IL-12	Interleucina-12
Kb	quilobase
kDa	quilodalton
pb	pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PSA	Antígeno Prostático Específico
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
TAM	Macrófagos tumor-associados
Tregs	T regulatórias
V	Valina

RESUMO

A hiperplasia prostática benigna (HPB) e o câncer de próstata (CaP) são duas condições crônicas muito comuns em homens com idade avançada e têm sido relacionadas a processos inflamatórios. As quimiocinas são reconhecidas como mediadores críticos da resposta inflamatória por regular a migração das células imunológicas através da ativação de receptores de quimiocinas na superfície destas células. As quimiocinas estão relacionadas à patogênese tumoral, embora não seja claro de que modo afetam a progressão tumoral humana. O objetivo desse estudo foi investigar a associação de dois polimorfismos de receptores de quimiocinas, CCR2-64I e CCR5-delta32, com HPB e CaP. Neste trabalho foram genotipadas 385 amostras de DNA genômico de homens do sul do Brasil, predominantemente euro-descendentes, incluindo 130 casos de HPB, 136 casos de CaP e 119 indivíduos controle saudáveis. Para o polimorfismo CCR2-64I a genotipagem foi realizada por PCR-RFLP e para o CCR5-delta32 foi por PCR convencional. As frequências alélicas do CCR2-64I foram 14,0%; 15,8% e 11,1% nos grupos controle, HPB e CaP, respectivamente; enquanto as do CCR5-delta32 foram 5,1%; 7,1% e 6,2%, respectivamente. A mediana referente aos níveis de PSA foi de 0,79; 1,45 e 6,91 ng/mL nos grupos controle, HPB e CaP, respectivamente; diferindo significativamente entre estes (todos $p < 0,001$). A mediana do volume da próstata foi 20,00 cm³ no grupo controle, portanto, menor que dos grupos HPB (35,35 cm³) e CaP (35,80 cm³) (ambos $p < 0,001$); no entanto, não foi observada diferença entre pacientes com HPB e CaP ($p = 0,172$). Algo interessante observado foi CCR2-64I como um fator protetor para CaP quando comparado com HPB (OR=0,550; IC_{95%}=0,311–0,975), mas não quando comparado com o grupo controle ($p = 0,448$). Não foi observada associação do CCR2-64I com os estados clinicopatológicos do CaP (estadiamento tumoral e escore de Gleason) (todos $p \geq 0,308$). Não foi observada associação significativa da variante CCR5-delta32 com HPB ou CaP (todos $p \geq 0,072$), ou com os estados clinicopatológicos do CaP (todos $p \geq 0,253$). Assim, nossos dados sugerem a influência da variante CCR2-64I, observada como fator protetor para CaP quando comparada com HPB, no desenvolvimento do câncer de próstata.

Palavras-chave: Receptor de quimiocinas, CCR2-64I, CCR5-delta32, polimorfismo, hiperplasia prostática benigna, câncer de próstata.

ABSTRACT

Benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer (PCa) are two chronic conditions very common in aged men and have been related to inflammatory process. Chemokines are recognized as critical mediators of inflammatory responses by regulating the migration of immune cells through the activation of chemokine receptors on the surface of these cells. Chemokines are implicated in tumor pathogenesis, although it is not clear how it affects human tumor progression. The aim of this study was to investigate the association of two chemokine receptor gene polymorphisms, CCR2-64I and CCR5-delta32, with BPH and PCa. In this study were genotyped 385 genomic DNA samples from southernmost Brazilian men, predominantly euro-descendants, including 130 BPH, 136 PCa and 119 healthy control subjects. To CCR2-64I polymorphism the genotyping was performed by PCR-RFLP and to CCR5-delta32 by conventional PCR. The allele frequencies of CCR2-64I were 14.0%, 15.8% and 11.1% in control, BPH and PCa, respectively; while of CCR5-delta32 were 5.1%, 7.1% and 6.2%, respectively. Median of serum PSA levels were 0.79, 1.45 and 6.91 ng/mL in control, BPH and PCa group, respectively (all $p < 0.001$). The prostate volume median was 20.00 cm³ in the control group, thus, lower than BPH (35.35 cm³) and PCa (35.80 cm³) group (both $p < 0.001$), nevertheless no difference was observed between BPH and PCa patients ($p = 0.172$). Interestingly, CCR2-64I was detected as a protective factor to PCa when compared with BPH (OR=0.550; 95%CI=0.311–0.975), but not when compared with control group ($p = 0.448$). No significant associations of the CCR2-64I were observed with PCa clinicopathologic states (tumor stage and Gleason score) (all $p \geq 0.308$). No significant associations of the CCR5-delta32 variant were observed with BPH or PCa (all $p \geq 0.072$), or with PCa clinicopathologic status (all $p \geq 0.253$). Thus, our data suggest a influence of the CCR2-64I variant, that was observed as a protective factor in PCa when compared with BPH, in prostate cancer development.

Keywords: Chemokine Receptor, CCR2-64I, CCR5-delta32, Polymorphism, Benign Prostatic Hyperplasia, Prostate Cancer.

Capítulo 1 INTRODUÇÃO

1.1. Hiperplasia, câncer e quimiocinas

A descoberta no século XIX de que todas as células de um organismo descendem de óvulos fertilizados levou à conclusão de que tumores não são corpos estranhos, mas sim crescimentos derivados de tecidos anormais. A partir da análise comparativa da arquitetura desorganizada de tecidos tumorais, o câncer foi apontado como uma doença de células em mau funcionamento (Weinberg, 2008). Os tumores podem ser benignos (localizados, não-invasivos) ou malignos (metastáticos, invasivos), de acordo com seu comportamento biológico. As metástases são tumores secundários, formados por células cancerígenas, liberadas de tumores malignos primários, que migram para diferentes locais do corpo. São elas as responsáveis pela maioria dos óbitos causados pelo câncer (INCA, 2008).

A formação de tecidos de arquitetura complexa e de organismos completos seria impossível se não houvesse uma forma efetiva de comunicação entre as células, já que o comportamento de células individuais não poderia ser coordenado. Assim, os processos de sinalização celular são extremamente relevantes na comunicação entre as células, sendo que esta depende da capacidade de algumas células emitirem e de outras receberem e reagirem especificamente a determinados sinais. Os sinais transmitidos são, em sua maioria, transportados por proteínas. A emissão deles é realizada por células capazes de liberar proteínas para o espaço extracelular, e a recepção dos sinais é realizada por células capazes de detectar a presença das proteínas sinalizadoras à sua volta. A regulação ineficaz desse processo de sinalização exerce grande influência na formação de células cancerígenas. Nesse sentido, o câncer, frequentemente definido como uma doença de proliferação celular inapropriada, pode ser considerado na verdade, uma doença de processamento de sinalização (Weinberg, 2008).

Muitos estudos têm demonstrado que a sinalização de quimiocinas (pequenas proteínas solúveis que por quimiotaxia ativam e recrutam células que expressam receptores de quimiocinas específicos) regula vários processos durante a progressão tumoral, incluindo o crescimento primário do tumor, a angiogênese tumoral e a metástase. As quimiocinas também parecem mediar

as interações estroma-epiteliais no microambiente do tumor primário para regular o crescimento e a invasão tumoral. Além disso, há indícios de que elas regulam o *homing* do receptor de quimiocinas expresso nas células cancerosas para locais distantes na doença metastática, ou seja, a metástase de células tumorais parece ser guiada pela expressão de receptores de quimiocinas e moléculas de adesão nessas células (Hembruuff & Cheng, 2009).

A transformação maligna e a progressão do câncer são eventos imunologicamente relevantes em indivíduos imunocompetentes (Dunn *et al.*, 2002). A capacidade que as células imunitárias tem de montar uma resposta antitumoral pode ser parcialmente dependente de fatores solúveis, como as quimiocinas, expressos no microambiente tumoral (Lewis & Pollard, 2006). As quimiocinas apresentam um relevante papel na regulação do recrutamento das células do sistema imune durante as respostas imunológicas, visto que estas células imunitárias podem apresentar em sua superfície certos receptores de quimiocinas que permitem sua migração em direção a um gradiente quimiotático. A expressão de quimiocinas já foi correlacionada à presença das células imunitárias em vários tipos de câncer (mama, pulmão, esôfago, ovário, sarcoma, melanoma), podendo representar tanto um prognóstico positivo quanto negativo da doença (Kleine-Lowinski *et al.*, 1999; Ueno *et al.*, 2000; Koizumi *et al.*, 2007) e podendo ser dependente do tipo tecidual (Hembruuff & Cheng, 2009). Tanto as respostas imunológicas benéficas como as prejudiciais são mediadas principalmente por linfócitos T e B, que possuem grande diversidade no reconhecimento de antígenos, alta especificidade aos antígenos, atividade efetora potente e memória imunológica duradoura. Devido ao potencial dessas células, sérios danos podem ser causados ao indivíduo se houver respostas aberrantes (Sakaguchi *et al.*, 2008).

Sabe-se que as células T desempenham um papel fundamental na reação imunológica aos tumores e apresentam o potencial para prevenir a disseminação tumoral. Existem duas populações principais de células T envolvidas na resposta antitumoral: a das células T efectoras e das T regulatórias (Tregs). As células T efectoras são capazes de destruir células tumorais (por atividade citotóxica), apresentar antígenos e produzir altos níveis de citocinas estimulatórias de células T (Lewis & Pollard, 2006). Já as células Tregs, produzidas pelo sistema imune normal, consistem numa população

especializada na supressão imunológica (por exemplo, das células T efectoras) e na manutenção da não-responsividade aos auto-antígenos. Problemas no desenvolvimento ou função dessas Tregs têm sido apontados como uma causa básica das doenças inflamatórias e autoimunes, tanto em humanos como em animais (Sakaguchi *et al.*, 2008). Assim, uma idéia emergente no momento é a de que cada resposta imune adaptativa envolve o recrutamento e ativação não apenas das células T efectoras e células B, mas também das Tregs, e que o balanço entre as duas populações é crítico para o controle apropriado da qualidade e magnitude da resposta imune adaptativa e para o estabelecimento ou violação da tolerância aos antígenos próprios e não-próprios (Sakaguchi *et al.*, 2008). Há relatos na literatura científica de migração de células Tregs para o microambiente tumoral (Belkaid *et al.*, 2002). Esse tipo de linfócito, além de expressar os receptores de células T (TCRs), capazes de reconhecer antígenos específicos (como os antígenos tumorais), expressa também um espectro de receptores de *homing*, incluindo os receptores de quimiocinas (Huehn & Hamann, 2005) como o CCR2, CCR4, CCR5, CCR7, CCR8, CXCR4; e são capazes de migrar em resposta a uma ampla variedade de quimiocinas: CCL22, CCL17, CCL1, CCL4 (Yang & Ansell, 2009; Watanabe *et al.*, 2010; Shimizu *et al.*, 2010). Assim, a expressão desses receptores de *homing* nas Tregs controla seu tráfego e localização, e conseqüentemente a compartimentalização das respostas imunológicas controladas pelas Tregs (Sakaguchi *et al.*, 2008).

Estudos já demonstraram que a expressão desregulada e a atividade de várias vias de sinalização de quimiocinas, incluindo CCL2 e CCL5 (principal ligante do CCR2 e CCR5, respectivamente), estão relacionadas à progressão do câncer. Alguns estudos chegam a sugerir que as quimiocinas são críticas para o desenvolvimento da doença e que suas funções são diversas e complexas no microambiente tumoral. Assim, ao regular o recrutamento de células do sistema imunológico para o tumor primário, a expressão de quimiocinas no câncer pode desencadear conseqüências em vários níveis no estabelecimento e progressão dessa patologia (Hembruff & Cheng, 2009).

Quanto à evolução, o câncer parece desenvolver-se progressivamente. Entre os dois extremos, da arquitetura do tecido normal e do tecido maligno, encontra-se uma gama de tecidos com arquitetura intermediária. Diferentes

graus de anormalidade tecidual podem refletir populações celulares que estão se desenvolvendo de forma progressiva, afastando-se do seu normal rumo a altos graus de agressividade e comportamento invasivo. Cada tipo de crescimento tumoral pode representar um passo distinto ao longo dessa evolução. Se realmente for assim, tais arquiteturas sugerem que o desenvolvimento dos tumores é um processo complexo e composto por várias etapas (Weinberg, 2008).

Os tumores ditos hiperplásicos possuem células minimamente diferenciadas daquelas do tecido normal, mas que podem ser anormais quando encontradas em número massivo de células. Apesar de apresentarem proliferação aparentemente desregulada, as células hiperplásicas mantêm a capacidade de agregar-se em tecidos com aparência razoavelmente normal. Já os tumores que alcançam a membrana basal e invadem tecidos subjacentes são ditos malignos ou câncer, e representam um grau mais avançado de anormalidade tecidual. Um grau ainda maior de anormalidade ocorre com a formação das metástases, quando há a dispersão de colônias tumorais para diferentes locais do organismo. A metástase requer invasividade e novas características adquiridas, como mobilidade e adaptação a ambientes diferentes do seu tecido de origem (Weinberg, 2008).

Como os vários tipos de crescimento tumoral existentes representam um aumento no grau de anormalidade tecidual, é provável que eles possuam diferentes pontos de parada ao longo da progressão tumoral, na qual o tecido normal desenvolve-se progressivamente em outro altamente maligno. De qualquer forma, as relações entre precursor e produto desses diversos tipos de crescimento (crescimento normal → hiperplásico → displásico → neoplásico → metastático) são apenas sugeridas, mas não comprovadas. Já se sabe que alguns tumores podem desenvolver-se através de uma série de crescimentos intermediários, mas também é possível que alguns dos tipos teciduais, descritos como intermediários nessa sequência, representem finais e não etapas para tumores mais avançados. Em órgãos como próstata, cólon, mama, estômago, pulmões e pâncreas, o desenvolvimento de carcinomas pode assemelhar-se a esse desenvolvimento em múltiplas etapas. Muitos desses tecidos exibem padrões de proliferação que podem ser chamados de hiperplásico, displásico e adenomatoso, e tais padrões poderiam ser os

precursores benignos dos carcinomas que surgem nesses órgãos (Weinberg, 2008).

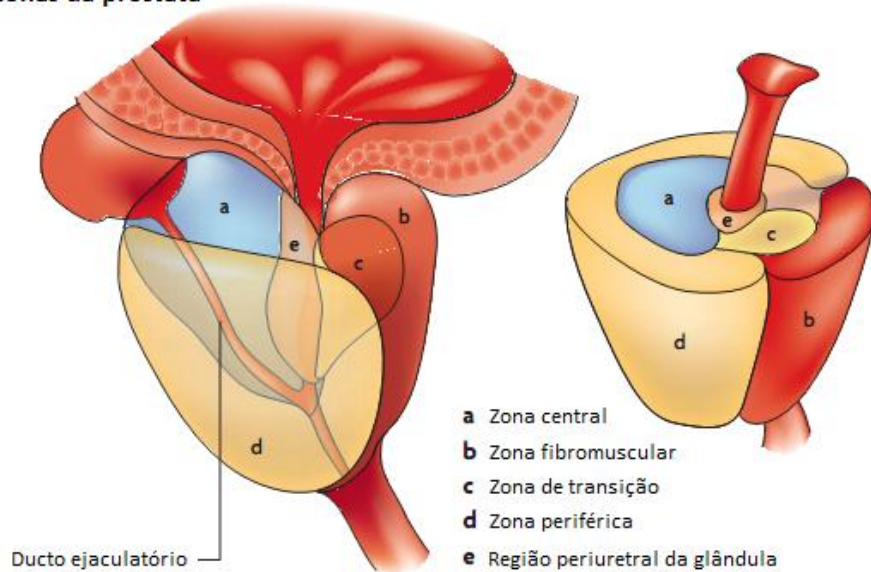
Apesar de tantas investigações nessa área, permanece obscuro se a atividade biológica das quimiocinas no microambiente tumoral contribui para o crescimento e disseminação do câncer ou para uma resposta antitumoral e regressão do câncer (Mañes *et al.*, 2003). Porém, a importância da expressão de quimiocinas tem se tornado muito reconhecida no desenvolvimento dessa patologia, tanto que, atualmente, diversos inibidores de quimiocinas e de seus receptores têm sido testados e mostrado-se eficazes no tratamento do câncer em alguns modelos pré-clínicos (Hembruff & Cheng, 2009).

1.2. Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)

A hiperplasia prostática benigna é uma anormalidade proliferativa relacionada à idade e é muito frequente entre os homens (Kirby, 2000). Esta condição consiste no crescimento excessivo do tecido epitelial e fibromuscular da zona de transição da área periuretral da glândula prostática (McNeal, 1990) (observar Figura 1). A HPB é considerada uma doença progressiva, determinada pelo crescimento contínuo da próstata, que leva à intensificação dos sintomas e ao aumento dos riscos de complicações, como a retenção aguda urinária (Carson III & Rittmaster, 2003). Embora não represente risco de morte, ela pode alterar significativamente a qualidade de vida do indivíduo afetado. A HPB manifesta-se clinicamente com sintomas referentes ao trato urinário e pode estar associada à disfunção sexual (Shabbir & Mumtaz, 2004; Tang & Yang, 2009).

A incidência da HPB ainda é difícil de ser determinada, embora muitos estudos epidemiológicos tenham sido realizados no mundo nos últimos 20 anos. A prevalência da HPB é dependente da idade, com evidência histológica de HPB rara antes dos 50 anos, mas muito comum por volta dos 80 anos, quando aparentemente todos os homens apresentam alguma evidência histológica desse processo (Kesarwani & Mittal, 2010). Abaixo dos 40 anos, somente cerca de 10% dos homens são afetados (Tang & Yang, 2009); aos 50 anos, de 40 a 50%, enquanto que aos 70 anos cerca de 80% dos homens apresentam HPB (Kirby, 2000).

Zonas da próstata



	Zonas da próstata		
	Periférica	Transição	Central
Inflamação aguda			
Inflamação crônica			
Hiperplasia Prostática Benigna			
Câncer de próstata			

	Alta prevalência		Baixa prevalência
	Média-alta prevalência		Nenhuma

Figura 1. Zonas de predisposição para doenças prostáticas. A maioria das lesões de hiperplasia prostática benigna (HPB) desenvolvem-se na zona de transição, podendo expandir consideravelmente para além do que é mostrado. A inflamação encontrada na zona de transição está associada com nódulos de HPB. A inflamação aguda pode ser proeminente tanto na zona periférica como na de transição, mas é muito variável. A maioria das lesões cancerosas ocorrem na zona periférica da glândula, poucas na zona de transição e quase nenhuma na zona central [modificado de (De Marzo *et al.*, 2007)].

A etiopatogênese da HPB ainda não está bem esclarecida, mas muitas das teorias que têm sido propostas sobrepõem-se parcialmente e complementam-se (Tang & Yang, 2009). Os androgênios e o envelhecimento têm sido tradicionalmente considerados os principais determinantes do aumento no tamanho da próstata, mas nos últimos anos tem emergido um papel importante da inflamação na patogênese desta doença (Fibbi *et al.*,

2010). Investigações sobre prostatite induzida experimentalmente em camundongos e ratos têm apontado como possíveis fatores causais a herança genética, as respostas auto-imunes e os desequilíbrios hormonais decorrentes da idade. Outros trabalhos recentes sugerem um papel da inflamação no desenvolvimento da doença. A inflamação foi pela primeira vez apontada como possível causa dessa condição em 1937 (Tang & Yang, 2009). Há 35 anos, Kohnen e Schaeffer retomaram a discussão sobre a natureza inflamatória da doença. Um infiltrado inflamatório crônico, composto principalmente de células T cronicamente ativas e de macrófagos, tem sido associado a nódulos de HPB (Tang & Yang, 2009). Estas células infiltrantes são responsáveis pela produção de citocinas (IL-2 e IFN γ) que podem apoiar o crescimento fibromuscular que ocorre na doença (Kramer *et al.*, 2002). Porém, ainda se desconhece por qual motivo a população de linfócitos aumenta na HPB (Tang & Yang, 2009).

Alguns modelos animais fornecem evidências da presença de um conjunto único de células T que podem suprimir a auto-imunidade em ratos *Sprague-Dawley* saudáveis e resistentes à prostatite não-bacteriana crônica. (Vykhovanets *et al.*, 2005). Acredita-se na possibilidade de que o enfraquecimento do sistema imune devido à idade, aliado à secreção hormonal modificada, leve à deterioração das células que suprimem ativamente o reconhecimento de antígenos prostáticos, o que provocaria a infiltração gradual de linfócitos na próstata e à cascata de eventos subsequentes que ocasionaria a HPB (Kramer *et al.*, 2007). Independente das causas da doença, o efeito final de uma inflamação crônica é um meio atípico, rico em citocinas, que pode levar a alterações no microambiente e a uma cicatrização crônica e repetitiva de feridas, culminando no desenvolvimento dos nódulos de HPB (Kramer & Marberger, 2006).

Há relatos de que mudanças nos níveis sistêmicos de hormônios sexuais esteróides relacionadas à idade, acompanhadas por alterações no metabolismo local do androgênio, poderiam ser um dos principais mecanismos de iniciação da doença (Sampson *et al.*, 2008). Estudos sugerem que este processo poderia levar à quebra do delicado balanço das interações entre as vias de sinalização dos fatores de crescimento e das interações estroma-epiteliais, promovendo o crescimento e um microambiente remodelador do tecido que levaria ao aumento do volume da próstata (Sampson *et al.*, 2008).

Secundariamente, a produção alterada de quimiocinas e citocinas pelo estroma remodelado poderia promover inflamação local, que então contribuiria para a progressão da doença via citocinas inflamatórias derivadas de linfócitos e espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (Sampson *et al.*, 2008).

Há indícios de que uma ampla variedade de quimiocinas é ativamente secretada pelo microambiente prostático em virtude de perturbações na homeostasia do tecido normal relacionadas ao processo de envelhecimento ou de respostas inflamatórias. O acúmulo de fibroblastos estromais senescentes e, possivelmente, de células epiteliais, pode estimular a secreção de quimiocinas no envelhecimento e o crescimento da próstata humana. Prostatites crônicas e inflamações histológicas podem também contribuir potencialmente como ricas fontes de secreção de quimiocinas na próstata (Macoska, 2011). Ao ligarem-se aos seus receptores específicos, as quimiocinas podem estimular poderosas vias de transdução de sinais pró-proliferativos, atuando assim como potentes fatores de crescimento no desenvolvimento e progressão da HPB. Alguns relatos também sugerem que a angiogênese mediada por quimiocinas poderia ser um fator contribuinte para o desenvolvimento e progressão da doença. Assim, alguns pesquisadores sugerem que a secreção de baixos níveis de múltiplas quimiocinas dentro do microambiente prostático em envelhecimento poderia promover baixos níveis concomitantes de quimiocinas, mas cumulativos, e proliferação excessiva de fibroblastos estromais e de células epiteliais associadas com o aumento do volume prostático. Portanto, as evidências indicam que as quimiocinas podem promover o crescimento da próstata e os consequentes sintomas associados ao trato urinário (Macoska, 2011).

1.3. O câncer no Brasil e no mundo

O câncer tem sido apontado como um problema de saúde pública mundial, apresentando-se como principal causa de morte em alguns países desenvolvidos (INCA, 2010). A Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC), recentemente publicou um relatório mostrando que o impacto global do câncer duplicou em número de casos em trinta anos (IARC, 2008).

No Brasil, o câncer representa a segunda principal causa de morte (INCA, 2012). Em 2005, levou a óbito aproximadamente 190 mil pessoas, das quais 113 mil tinham menos de 70 anos de idade (Prado, 2010). As estimativas para o ano de 2012 indicam a ocorrência de 518.510 casos novos no Brasil. Com exceção do câncer de pele do tipo não-melanoma, os tipos mais incidentes serão o câncer de próstata e de traquéia/brônquio/pulmão no sexo masculino, e o de mama e de cólon do útero no sexo feminino (INCA, 2012).

Apesar dos progressos no desenvolvimento e uso de estratégias de prevenção e tratamento, o câncer permanece como uma das causas que lideram a mortalidade no mundo, sendo que quase 8 milhões de pessoas morrem anualmente – cerca de 13% de todas as mortes no mundo. Estima-se que essa taxa de mortalidade continuará crescendo e que, em 2030, contabilizará em torno de 12 milhões de mortes. O impacto dessa doença não se restringe ao grande número de casos (Prado, 2010). O custo econômico é elevado e, aliado ao sofrimento do paciente e de sua família, constitui um grande peso para a sociedade (Chang *et al.*, 2004). Os custos do SUS, por exemplo, aumentaram 450% apenas com tratamentos quimioterápicos nos últimos anos, indo de 18 milhões para 82 milhões de reais (Prado, 2010).

1.4. Câncer de Próstata (CaP)

O câncer de próstata é uma doença relativamente comum no mundo e em alguns países já representa uma das principais causas de morte entre a população masculina. No Brasil, é o segundo mais incidente tipo de câncer na população em geral e também no sexo masculino, e a segunda principal causa de morte entre os homens (Lefort & Almeida, 2004; INCA, 2012). O número de casos novos estimado para o ano de 2012, segundo o INCA (Instituto Nacional de Câncer), é de 60.180 (INCA, 2012). A distribuição de casos entre Estados e capitais do país varia em incidência por região. Nas regiões Sudeste (78/100.000) e Nordeste (43/100.000), o câncer de próstata é o mais incidente entre os homens. Sem considerar os tumores de pele não-melanoma, o CaP é o mais frequente nas regiões Centro-Oeste (75/100.000), Sul (68/100.000) e Norte (30/100.000). A capital do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, apresenta frequência elevada da doença, 95/100.000. No Brasil, o aumento da

expectativa de vida, a melhoria e a evolução dos métodos diagnósticos e da qualidade dos sistemas de informação do país podem explicar o aumento das taxas de incidência ao longo dos anos (INCA, 2012).

A incidência dessa doença em termos globais também varia geograficamente. Na região leste do mediterrâneo, a incidência de CaP é de 6% entre os homens, enquanto na região das Américas é de 26% entre os homens (Globocan, 2008). As últimas estimativas da *American Cancer Society* (ACS) para 2010 nos Estados Unidos mostraram que cerca de 1 em 6 homens será diagnosticado com CaP durante sua vida. Cerca de 1 em 36 homens morrerá por causa dessa doença que contribui com aproximadamente 11% das mortes por câncer nos homens (ACS, 2010).

O CaP é considerado raro antes dos 50 anos e sua incidência aumenta progressivamente com a idade. Cerca de 60% dos homens acima dos 80 anos apresentam neoplasia primária da próstata. Apenas 5% desses casos manifestam-se clinicamente, indicando que os tumores descobertos incidentalmente apresentam evolução mais benigna (IARC, 2010). Em média, 80% dos casos ocorrem em indivíduos com idade superior a 65 anos (Lefort & Almeida, 2004). Embora exista certa controvérsia quanto ao comportamento biológico do câncer de próstata em indivíduos jovens, alguns estudos sugerem maior agressividade do tumor nesse grupo etário, provavelmente por ser resultado da influência de fatores genéticos (IARC, 2010).

A hereditariedade é um dos fatores envolvidos na etiologia do CaP. Homens com um único familiar de primeiro grau com esta doença têm um risco 2 vezes maior de desenvolvê-la quando comparados com aqueles que não possuem histórico familiar. Este risco eleva-se para até onze vezes se houver 2 ou 3 membros da família acometidos. Homens com um irmão afetado têm maior probabilidade de ter a neoplasia em relação àqueles cujo pai teve a doença (Reiter & Kernion, 2002). Além da hereditariedade, outros fatores que podem contribuir para um risco aumentado de desenvolver CaP são envelhecimento, dieta, fatores étnicos, ambientais e influências hormonais (androgênio) (Carter & Partin, 2002).

O adenocarcinoma de próstata é um dos tipos de tumor maligno com maior importância clínica em virtude de sua frequência elevada. Nos estágios iniciais ele parece limitar-se à próstata, mas quando não tratado geralmente

invade órgãos próximos (vesículas seminais, uretra e bexiga) e espalha-se para órgãos mais distantes (ossos, fígado e pulmões), provocando sérias consequências (Lefort & Almeida, 2004). Um dos agravantes do CaP para os afetados é que os tumores só produzem manifestações clínicas quando a neoplasia atinge a cápsula prostática, isto é, quando a doença já apresenta-se relativamente avançada (IARC, 2010). Assim, na fase inicial da doença, muitos pacientes não apresentam sintomas ou, quando apresentam, são semelhantes aos da hiperplasia prostática benigna (dificuldade de urinar ou necessidade de urinar com maior frequência). Na fase avançada, o CaP pode provocar dor óssea, sintomas urinários ou, quando mais grave, infecção generalizada ou insuficiência renal (INCA, 2012). As terapias padrão potencialmente curativas e atualmente disponíveis para esse tipo de neoplasia são limitadas à prostatectomia radical ou radioterapia, sendo eficazes somente em casos de doença localizada. Para CaP localmente avançado utiliza-se radioterapia ou cirurgia em combinação com terapia hormonal (Satoh *et al.*, 2003; INCA, 2012). Para a doença metastática, o tratamento utilizado é a terapia hormonal (INCA, 2012).

Muitas investigações têm sido realizadas na busca por explicações para o desenvolvimento do câncer. A relação funcional entre inflamação e câncer, por exemplo, já é aceita amplamente na comunidade científica. Sabe-se que, apesar de células inflamatórias e quimiocinas contribuírem para a resposta antitumoral do hospedeiro, a inflamação pode também promover o crescimento e a progressão tumoral (Balkwill & Mantovani, 2001). A inflamação crônica tem sido reconhecida como um fator de risco para vários tipos de câncer humano, dentre eles os carcinomas de próstata, fígado, cólon e pulmão (Coussens & Werb, 2002; Nelson *et al.*, 2003; Vaday *et al.*, 2006). Acredita-se que a inflamação prolongada potencialize a carcinogênese por proporcionar um microambiente ideal para o desenvolvimento do tumor (Balkwill & Mantovani, 2001; Coussens & Werb, 2002; Vaday *et al.*, 2006).

As causas para a sinalização crônica das quimiocinas ainda estão sob investigação, mas acredita-se que mutações nos genes de receptores de quimiocinas em células do sistema imunológico e o aumento da expressão de citocinas que regulam a expressão dessas quimiocinas no sítio de inflamação possam ser importantes fatores contribuintes. Essa perda de controle sobre a

sinalização por quimiocinas resulta em consequências de amplo alcance, com mudanças prejudiciais nos tecidos. Estudos atuais sugerem que a atividade e expressão desregulada dos ligantes e dos receptores de quimiocinas no câncer podem alterar o microambiente tumoral com consequências a longo prazo. Pesquisadores também têm observado que os mesmos receptores de quimiocinas envolvidos em doenças inflamatórias crônicas apresentam-se superexpressos no câncer, incluindo CCR2 e CCR5 (Hembruff & Cheng, 2009).

Alguns estudos mostram que a deleção de certos receptores de quimiocinas da classe CC ou dos seus ligantes, em camundongos, aumenta a suscetibilidade a infecções virais ou bacterianas e leva à diminuição da captura de patógenos devido ao diminuído recrutamento de células do sistema imune. Além disso, parece aliviar os fenótipos de doenças inflamatórias, como artrite reumatóide, esclerose múltipla, encefalite auto-imune e degeneração macular. A sinalização crônica de quimiocinas tem sido associada ao acúmulo de macrófagos e células T em locais de inflamação, e estudos mostram que a ativação crônica dos macrófagos pode levar a alterações na arquitetura normal do tecido, à angiogênese anormal e a danos no DNA pelo excesso de secreção de espécies reativas de oxigênio (Gillitzer & Goebeler, 2001; Moll *et al.*, 2009).

Apesar da reconhecida influência da inflamação na progressão do câncer, os mecanismos moleculares e celulares que regulam esta relação permanecem obscuros. A caracterização das funções específicas das moléculas inflamatórias envolvidas localmente em um tumor pode contribuir para o conhecimento de como se origina e desenvolve-se a doença. Evidências sugerem que agentes anti-inflamatórios podem ter efeitos benéficos na prevenção ou tratamento do CaP (Chen *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2004). Já foi demonstrado que a expressão alterada de certos genes envolvidos na inflamação está associada a um aumento na incidência do CaP (De Marzo *et al.*, 2003; Nelson *et al.*, 2003; Vaday *et al.*, 2006).

De modo geral, os estudos têm analisado diferenças na expressão local de quimiocinas, oferecendo uma associação mais forte e consistente entre prognóstico do câncer e mudanças nos padrões de quimiocinas ligantes e seus receptores no tumor primário e nas lesões metastáticas, que aqueles estudos que medem os níveis de quimiocinas no soro. Atualmente, a ligação genética entre os padrões de expressão de quimiocinas e o câncer permanece incerta.

Como certos fatores solúveis podem regular a expressão dos ligantes de quimiocinas e de seus receptores, é provável que alterações na expressão destes reguladores combinadas com possíveis mutações genéticas possam contribuir para expressão desregulada das quimiocinas e dos seus receptores (Hembruff & Cheng, 2009). Enquanto não for possível manipular a arquitetura genômica para interferência e modificações estruturais de unidades gênicas que determinam o crescimento anaplásico dos tecidos, o que resta é determinar a presença e influência do gene, detectar o grau de sua expressão e reconhecer precocemente as modificações teciduais que precedem o câncer prostático (Lefort & Almeida, 2004).

1.5. Receptores de quimiocinas e seus ligantes

Polimorfismos em receptores de quimiocinas e/ou em quimiocinas na população humana representam um modelo pelo qual se estuda a contribuição de quimiocinas específicas envolvidas nas patogêneses (Mañes *et al.*, 2003). As quimiocinas são pequenas proteínas básicas (de 8 a 14 kDa) reconhecidas como mediadores críticos da resposta inflamatória por regularem o recrutamento de células tanto do sistema imune inato quanto do adaptativo para o sítio de injúria ou infecção (Zabel *et al.*, 2006; Koizumi *et al.*, 2007; De Paepe *et al.*, 2008; Hembruff & Cheng, 2009). Elas são moléculas importantes não apenas nas respostas inflamatórias, mas também como imunoreguladoras. As quimiocinas garantem a recirculação contínua das células imunológicas entre os variados microambientes anatômicos e são essenciais para a manutenção da homeostasia imunológica. Além disso, têm funções críticas no desenvolvimento linfocitário (Hasegawa & Fujita, 2001). Todas as quimiocinas induzem a quimiotaxia da célula que expressa seu receptor específico em direção às áreas com maior concentração de quimiocinas (Kuschert *et al.*, 1999). Elas estão criticamente envolvidas no processo que leva o sistema imune a gerar uma resposta eficaz no organismo, uma vez que exercem ações quimiotáticas e imunomoduladoras (Ahlenstiel *et al.*, 2004). Dessa forma, podem ser benéficas ou prejudiciais tanto por estimular uma resposta imune apropriada contra microorganismos invasores, por exemplo, quanto por mediar

a destruição patológica de tecidos em várias doenças humanas (Christopherson & Hromas, 2001).

Não só as células do sistema imune expressam receptores de quimiocinas, outros tipos celulares também, como as células endoteliais, estromais, epiteliais, do músculo liso e os neurônios. Assim, além de posicionar as células do sistema imunológico em compartimentos particulares, as quimiocinas podem estar envolvidas em outros aspectos da homeostasia tecidual (Gerard & Rollins, 2001). As quimiocinas participam da regulação de inúmeros processos biológicos como embriogênese, angiogênese (Rostene *et al.*, 2007; Salamonsen *et al.*, 2007; Beider *et al.*, 2008; Li & Ransohoff, 2009), hematopoiese, aterosclerose, infecção pelo HIV, crescimento tumoral e metástase (Mackay, 1997; Luster, 1998; Yoshie *et al.*, 2001; Struyf *et al.*, 2003; Vandercappellen *et al.*, 2008; Narter *et al.*, 2010). Também regulam a migração, proliferação e os sinais de sobrevivência nos diversos tipos celulares do organismo (DeVries *et al.*, 2006; Zlotnick *et al.*, 2006).

As quimiocinas são subdivididas em 4 classes de acordo com a distância dos resíduos de cisteína à porção amino-terminal (NH₂) da molécula. As classes da família de quimiocinas são denominadas XC, CC, CXC e CX3C. O X corresponde a um resíduo de aminoácido não-cisteína que separa um motivo conservado de cisteína (C). Os receptores de quimiocinas também podem ser subdivididos em 4 classes: XCR, CCR, CXCR e CX3CR, sendo que a presença do R indica tratar-se de um receptor. Estes receptores podem ser expressos em vários tipos celulares onde medeiam as funções de suas quimiocinas ligantes específicas (Rollins, 1997; Rossi & Zlotnik, 2000; Vicari & Caux, 2002; Narter *et al.*, 2010). Os receptores de quimiocinas são moléculas transmembrana de 340 a 370 aminoácidos, que apresentam sete domínios transmembrana acoplados à proteína G e pertencem a uma superfamília de rodopsina (Murphy *et al.*, 2000). Cada receptor tem a capacidade de ligar-se a mais de uma quimiocina dentro de uma subfamília, assim como uma mesma quimiocina pode ligar-se a distintos receptores (Christopherson & Hromas, 2001), criando a possibilidade de sinalização redundante (Cotton & Claing, 2009), como pode ser observado na Figura 2.

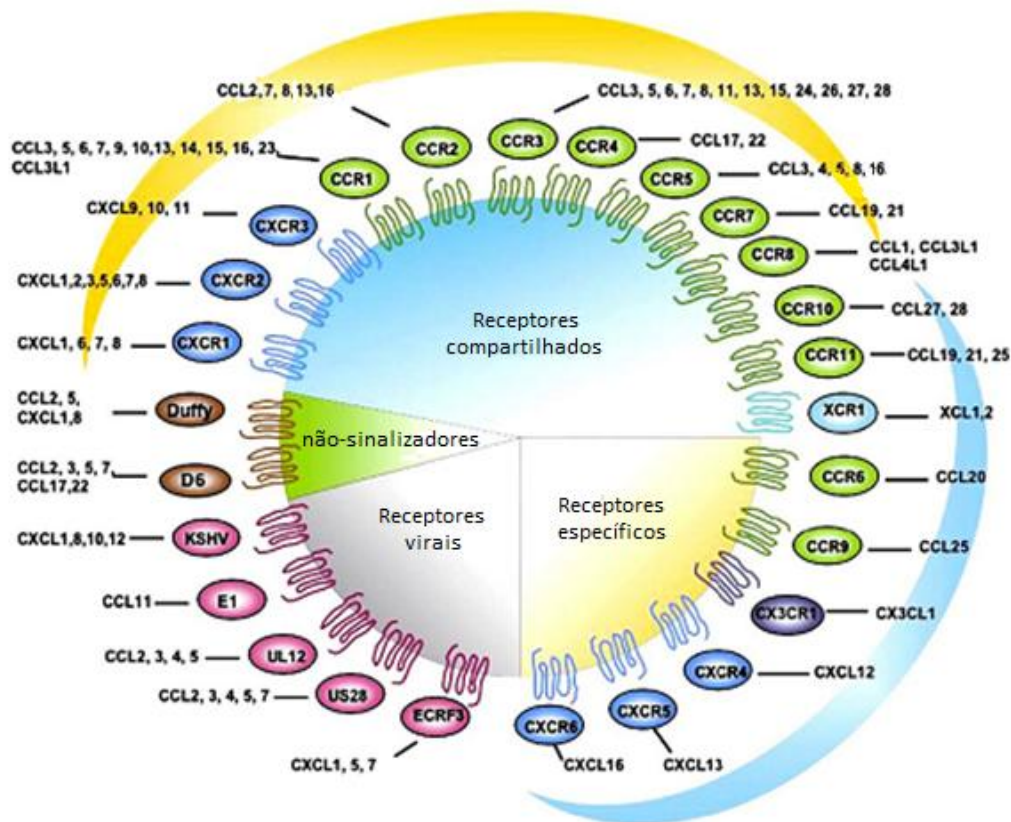


Figura 2. Receptores de quimiocinas e suas quimiocinas ligantes [modificado de (Balkwill, 2004; Slettenaar & Wilson, 2006)].

Contudo, também há evidências suportando a possibilidade de funções únicas para cada par ligante/receptor de quimiocinas (Devalaraja & Richmond, 1999; Rajagopalan & Rajarathnam, 2006). Até o momento, cerca de 50 quimiocinas e pelo menos 20 receptores foram descritos (Koizumi *et al.*, 2007). Os receptores compartilham algumas características: porção amino-terminal ácida, uma cisteína em cada um dos quatro domínios extracelulares e uma sequência conservada de 10 aminoácidos na segunda alça intracelular. O sítio de ligação das quimiocinas é complexo e envolve vários sítios não-contíguos, dentre eles o segmento amino-terminal (Murphy *et al.*, 2000).

Nesse trabalho, focaremos nos receptores da classe CCR (especificamente CCR2 e CCR5), cujas quimiocinas ligantes são capazes de regular o recrutamento das células T, células B e de recrutar células derivadas da medula óssea, incluindo monócitos e células dendríticas (Laing & Secombes, 2004; DeVries *et al.*, 2006; Hembruff & Cheng, 2009). Quimiocinas-CC específicas ligam-se em seus respectivos receptores para então

desencadear a ativação e migração celular (Loetscher *et al.*, 1998; Luster, 1998; Qin *et al.*, 1998; Ahlenstiel *et al.*, 2004).

Muitos tipos de células cancerígenas expressam uma ampla rede de quimiocinas e receptores de quimiocinas (Rollins, 1997; Rossi & Zlotnik, 2000; Balkwill & Mantovani, 2001; Murphy, 2001; Vicari & Caux, 2002; Mañes *et al.*, 2003; Narter *et al.*, 2010). A indução da quimiotaxia pelas quimiocinas já foi observada em várias linhagens celulares de carcinoma, incluindo as de próstata, mama, melanoma e pulmão (Prest *et al.*, 1999; Woodward *et al.*, 2002; Loberg *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008). Também foi demonstrado que as quimiocinas regulam o crescimento de algumas linhagens de células cancerosas. Exemplo disso são CCL2 e CCL5, que estimulam a proliferação de células do CaP, melanoma e glioma (Payne & Cornelius, 2002; Darash-Yahana *et al.*, 2004; Loberg *et al.*, 2006; Vaday *et al.*, 2006), e parecem estimular principalmente sinais migratórios em células de câncer de mama. CCL2 e CCL5 também atuam como potentes fatores angiogênicos, estimulando a migração de células endoteliais e a formação de vasos (Hembruff & Cheng, 2009).

O recrutamento de células do sistema imune pelas quimiocinas pode promover atividades antitumorais, como a eliminação de células do câncer por macrófagos ou linfócitos. No entanto, ao longo da progressão tumoral, esse recrutamento pode causar mais prejuízo que benefício. As quimiocinas secretadas pelo tumor e outros fatores atraem leucócitos para aumentar o crescimento tumoral e suprir fatores de sobrevivência, bem como mediadores angiogênicos para a vasculatura do tumor. Em muitos casos, os receptores de uma quimiocina particular são superexpressos nas células tumorais, permitindo que as quimiocinas persistam no microambiente por mais tempo (Raman *et al.*, 2007). Assim, o tumor parece sequestrar a habilidade das células imunitárias de secretar quimiocinas para contribuir com seu desenvolvimento. Exemplo disso é que os macrófagos presentes em lesões neoplásicas secretam quimiocinas envolvidas no processo tumorigênico (Raman *et al.*, 2007).

Embora já se saiba do envolvimento dessas moléculas na patogênese do tumor, ainda não está claro se elas afetam de modo positivo ou negativo a progressão do câncer humano (Mañes *et al.*, 2003), pois elas parecem estar envolvidas tanto no desenvolvimento e metastatização do câncer, como no

processo que leva o organismo a gerar uma resposta imune antitumoral. Além de CCL2 e CCL5, outras quimiocinas podem apresentar tais efeitos opostos (pró e antitumoral) na progressão dos tumores (Balkwill & Mantovani, 2001). A ocorrência de um desses efeitos pode depender do contexto tumoral, como a presença de outros mediadores celulares e moleculares, ou da quantidade de quimiocinas presentes (Raman *et al.*, 2007). Desse modo, as quimiocinas podem regular as funções de inúmeros tipos celulares com importantes implicações no microambiente tumoral (Hembruff & Cheng, 2009).

Acredita-se que as quimiocinas produzidas pelo tumor desempenhem papéis distintos na biologia da doença primária e metastática quanto ao direcionamento da infiltração de leucócitos para dentro do tumor; à regulação da resposta imunológica antitumoral; ao controle da angiogênese tumoral; ao remodelamento da matriz; e quanto ao controle do movimento das células tumorais (Mañes *et al.*, 2003). Apesar do desenvolvimento de antagonistas de receptores de quimiocinas para a inibição da sinalização destas ser promissor no tratamento da doença, as funções complexas e os mecanismos de sinalização de quimiocinas no microambiente tumoral podem dificultar a eficácia destes agentes. Com isso, torna-se importante investigar e compreender as funções da sinalização de quimiocinas inflamatórias na progressão do câncer nos níveis molecular, celular e de todo organismo.

As mutações e polimorfismos genéticos estão atualmente sob investigação por potencialmente interferirem na expressão normal das quimiocinas. Polimorfismos em genes de quimiocinas e receptores, dentre eles CCR2-64I (G>A), CCR5-delta32 e CCL5-403 (G>A), foram analisados em câncer de próstata, embora não tenha sido encontrada associação destes com um risco aumentado de desenvolver a doença (Petersen *et al.*, 2008). No entanto, outro estudo mostra que o polimorfismo CCL5-403 (G>A), por exemplo, apresenta associação com um aumento da suscetibilidade ao CaP (Saenz-Lopez *et al.*, 2008). Embora mudanças na expressão de receptores de quimiocinas e ligantes estejam fortemente associadas à progressão de vários tipos de câncer, poucos estudos sobre polimorfismos têm detectado associação significativa com risco ou invasividade. Assim, o significado funcional destas variantes genéticas permanece incerto. Novos estudos devem

ser realizados para investigar e compreender os mecanismos funcionais destas variantes genéticas durante a progressão do câncer (Hembruff & Cheng, 2009).

1.6. CCR2 [*Chemokine (C-C motif) receptor 2*]

O receptor CCR2 é codificado por um gene denominado *CCR2* que localiza-se no cromossomo 3p21 (Murphy *et al.*, 2000). É um receptor de quimiocinas CC com afinidade pelas quimiocinas CCL2, CCL7, CCL8 e CCL13 (Yoshie *et al.*, 2001; Narter *et al.*, 2010). A contribuição relacionada a cada um desses ligantes *in vivo*, cuja função é mediada pelo CCR2, permanece por ser esclarecida (Gerard & Rollins, 2001; Charo & Ransohoff, 2006). Dos seus ligantes, CCL2 é o que apresenta maior afinidade e é o mais estudado (Gerard & Rollins, 2001; Charo & Ransohoff, 2006). Diferente do CCL2, a expressão de CCR2 é relativamente restrita a certos tipos celulares (Deshmane *et al.*, 2009). O CCR2 é expresso principalmente por monócitos, linfócitos T de memória, células dendríticas, células B e basófilos (Smith *et al.*, 1997). Consistente com seu importante papel no tráfego de monócitos, o CCR2 parece dirigir a inflamação em alguns modelos animais de doenças. Estas incluem desordens imunológicas (como artrite reumatóide, doença de Crohn, rejeição a transplantes), bem como doenças cardiovasculares, incluindo aterosclerose e hiperplasia intimal (Zhao, 2010).

O alelo variante do gene *CCR2* que sofreu uma substituição nucleotídica de G para A (SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*, rs1799864) na posição 190, substitui o resíduo de aminoácido valina na posição 64 por uma isoleucina (CCR2-64I) (Smith *et al.*, 1997), uma mudança conservativa de aminoácidos no primeiro domínio transmembrana do receptor CCR2 (Narter *et al.*, 2010), como pode ser observado na Figura 3.

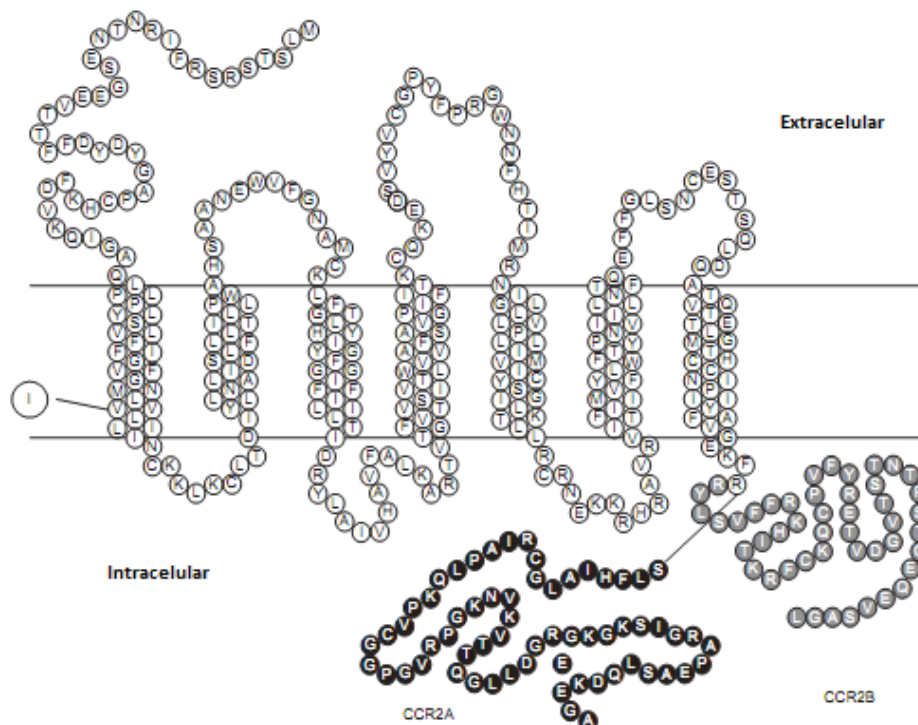


Figura 3. Estrutura da molécula CCR2 (isoforma CCR2A e CCR2B). A letra “I” na esfera maior denota a substituição na posição 64, de uma valina (V) por uma isoleucina (I), presente na variante polimórfica CCR2-64I. As esferas em cor preta correspondem aos resíduos de aminoácidos presentes apenas na isoforma CCR2A, enquanto as esferas em cinza correspondem aos presentes apenas na isoforma CCR2B. As duas linhas paralelas horizontais representam a membrana plasmática [modificado de (Nakayama *et al.*, 2004)].

Esse primeiro domínio tem a sequência de aminoácidos totalmente conservada, em identidade com o CCR5 (que será abordado mais adiante), sugerindo restrições funcionais sobre a variação mutacional. O alelo mutante CCR2-64I tem uma sequência transmembrana idêntica à do alelo selvagem CCR5. A alteração CCR2-64I parece ser comum a todos os grupos étnicos. Sua frequência alélica é de 0,098 em Caucasianos; 0,151 em Afro-americanos; 0,172 em Hispânicos; e 0,250 em Asiáticos (Smith *et al.*, 1997).

A variante polimórfica CCR2-64I tem sido muito investigada nos estudos relacionados à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) (Zafiroopoulos *et al.*, 2004). Estudos iniciais demonstraram que esse polimorfismo, embora não exerça nenhuma influência sobre a incidência da infecção pelo HIV-1, está associado a um retardo na progressão da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) (Smith *et al.*, 1997). Porém, até o momento, se desconhece por que motivo isso ocorre. Há várias publicações

tentando desvendar uma possível diferença funcional de CCR2-64I com relação ao CCR2 e tentando entender de que modo o alelo variante poderia influenciar no desenvolvimento de várias doenças. Assim, alguns estudos têm sido realizados com o intuito de elucidar o mecanismo molecular referente ao efeito desse alelo (Mummidi *et al.*, 1998; Bartoli *et al.*, 2001; Nakayama *et al.*, 2004; Navratilova, 2006; Deshmane *et al.*, 2009; Narter *et al.*, 2010).

Sabe-se que o *CCR2* origina por *splicing* alternativo duas isoformas: CCR2A (360 aminoácidos) e CCR2B (374 aa). Estas isoformas diferem apenas na sequência da região da cauda citoplasmática C-terminal (Narter *et al.*, 2010) (observar Figura 3), o que pode representar um mecanismo para o aumento da diversidade das respostas celulares aos ligantes (Bartoli *et al.*, 2001). Tal sequência determina o transporte de CCR2B para a superfície celular, enquanto a maior parte de CCR2A permanece no citoplasma (principalmente no complexo de Golgi e pequena parte no retículo endoplasmático) (Navratilova, 2006). Com base numa série de experimentos, Nakayama *et al.* (2004) verificaram que o nível de expressão do CCR2A-64I é significativamente maior que o do CCR2A, mas que o polimorfismo não afeta os níveis de expressão de CCR2B-64I. Também observaram um aumento da meia-vida do CCR2A-64I na célula. Quando CCR2A-64I ou CCR2A foram co-expressos com o CCR5 para verificar se estariam influenciando na expressão deste, observaram que CCR2A-64I interferiu mais severamente com a expressão do CCR5 na superfície celular que o CCR2A. Baseados em seus resultados, esses autores sugerem que a isoforma CCR2A poderia ligar-se ao CCR5 no citoplasma diminuindo a expressão deste na superfície celular, e propõem então que essa habilidade aumentada do CCR2A-64I em diminuir a expressão do CCR5 poderia ser uma possível causa do retardo na progressão da AIDS nos pacientes portadores desse alelo mutante (Nakayama *et al.*, 2004). Outro trabalho sugere que o CCR2-64I poderia afetar a disponibilidade do CCR5, através da formação de heterodímeros (Zafiropoulos *et al.*, 2004).

Estudos sobre as isoformas do CCR2 selvagem mostram que CCR2A é a principal isoforma expressa por células mononucleares e células vasculares da musculatura lisa (Bartoli *et al.*, 2001), enquanto monócitos e células NK ativadas expressam predominantemente a isoforma CCR2B. É possível que essas duas isoformas possam ativar diferentes vias de sinalização e exercer

ações diferentes (Sanders *et al.*, 2000; Cho *et al.*, 2007). Tem sido relatado que CCL2 é capaz de aumentar a expressão de CCR2A mas não de CCR2B em sinoviócitos obtidos de pacientes com artrite reumatóide (Cho *et al.*, 2007). É importante notar que CCR2 apresenta um duplo papel, com ações proinflamatórias e anti-inflamatórias. O papel proinflamatório do CCR2 é dependente de células apresentadoras de antígenos (CAAs) e de células T, enquanto o papel anti-inflamatório é dependente da expressão de CCR2 sobre as células T regulatórias (Deshmane *et al.*, 2009).

A principal quimiocina ligante do CCR2, a CCL2, é amplamente expressa em muitos carcinomas humanos e sua produção corresponde ao recrutamento de macrófagos (Balkwill, 2004; Biswas *et al.*, 2006). Esses macrófagos são derivados de monócitos recrutados de sítios neoplásicos e estimulados por quimiocinas específicas secretadas pelas células tumorais, como CCL2 (Mantovani *et al.*, 2002). CCL2 é secretada também por macrófagos associados ao tumor (TAMs) (Ueno *et al.*, 2000). Até o momento, nas neoplasias de mama e esôfago, o aumento da expressão de CCL2 tem sido associado ao aumento do influxo de TAMs e correlacionado com um fenótipo invasivo, metástases de linfonodos e pobre prognóstico (Hembruff & Cheng, 2009; Raman *et al.*, 2007).

O efeito de CCL2 sobre as células neoplásicas parece variar de acordo com sua quantidade no microambiente tumoral. No melanoma, baixa expressão de CCL2 com modesta infiltração macrófágica parecem promover o crescimento tumoral (Nesbit *et al.*, 2001). De modo semelhante, no câncer de colo do útero a perda da expressão de CCL2 tem sido associada à diminuição dos níveis de macrófagos, e correlacionada com pobre prognóstico (Kleine-Lowinski *et al.*, 1999; Narter *et al.*, 2010). No entanto, a perda de expressão de CCL2 no câncer de ovário (Arnold *et al.*, 2005), assim como a reduzida expressão de CCR2 nos pacientes com mieloma (Van de Broek *et al.*, 2006) indicam um possível papel de supressão tumoral para a sinalização de quimiocinas (Hembruff & Cheng, 2009). No câncer pancreático e melanoma observou-se que a elevada expressão de CCL2 está associada com alta infiltração de macrófagos e parece exercer atividades antitumorais (bom prognóstico) (Monti *et al.*, 2003; Raman *et al.*, 2007; Nesbit *et al.*, 2001). Uma observação importante é que os TAMs são capazes de destruir o tumor após a

ativação de IL-2, IL-12 e IFN- γ (Coussens & Werb, 2002; Raman *et al.*, 2007). Desse modo, é possível perceber que a quimiocina CCL2 que parece apresentar papéis na promoção do câncer de mama, por exemplo, também pode afetar outros tipos de câncer de diferentes formas. A superexpressão de CCL2 em células de carcinoma de cólon e de gliossarcoma em camundongos parece suprimir a formação de tumores quando essas células tumorais são injetadas nos animais. Este fenótipo antitumoral correlaciona-se com o aumento do acúmulo e ativação de macrófagos no local da injeção nos camundongos imunodeprimidos e aumento das respostas de células T em camundongos imunocompetentes (Hembruff & Cheng, 2009). Juntos, esses estudos demonstram um padrão de expressão e função das quimiocinas e de células do sistema imune que podem ser tecido-dependentes na progressão do câncer (Hembruff & Cheng, 2009).

A variante polimórfica CCR2-64I tem sido relatada como protetora no desenvolvimento e progressão de doenças inflamatórias, como esclerose múltipla, e no desenvolvimento de câncer de mama. Porém, contrariamente, parece ser um fator de risco no desenvolvimento de câncer de bexiga (Narter *et al.*, 2010), câncer hepatocelular (Yeh *et al.*, 2010) e de endométrio (Attar *et al.*, 2010). Portanto, inconsistências na literatura científica quanto ao papel do CCR2-64I ainda são observadas quanto ao desenvolvimento do câncer, fazendo-se necessária a realização de mais estudos na área.

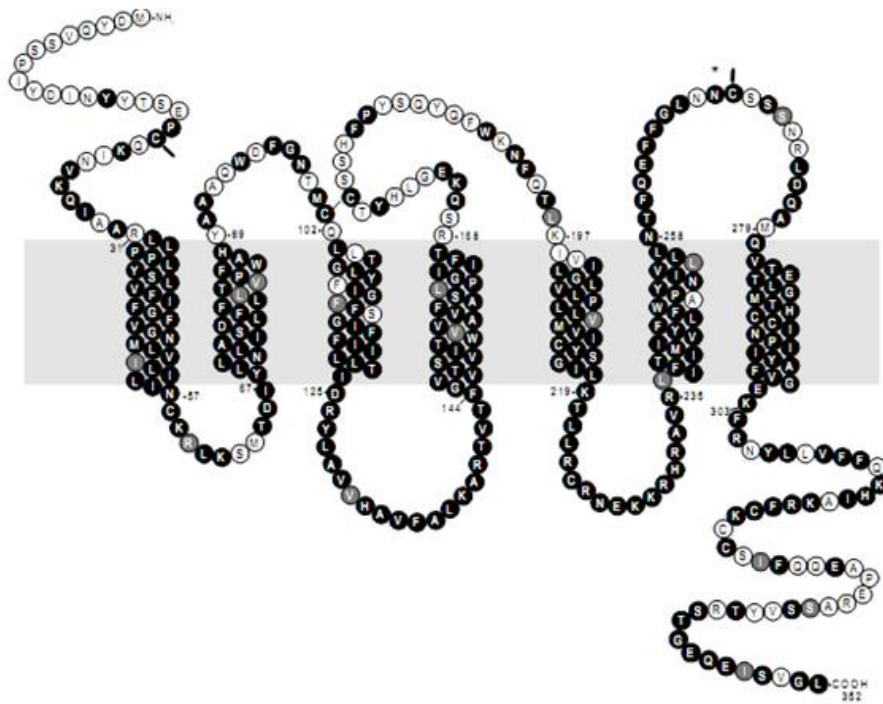
1.7. CCR5 [*Chemokine (C-C motif) receptor 5*]

O CCR5 [*chemokine (C-C motif) receptor 5*] é um receptor de quimiocinas pertencente à classe CC, responsável por mediar as funções das quimiocinas CCL3 (MIP-1 α) (Nibbs *et al.*, 1999), CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES) e CCL8 (Combadiere *et al.*, 1996; Raport *et al.*, 1996; Samson *et al.*, 1996a; Gong *et al.*, 1998). Está presente principalmente em células do sistema imunológico como linfócitos T e macrófagos, desempenhando um importante papel na migração dessas células. Há indícios de que cerca de 20 a 30% das células T periféricas e cerca de 10% dos monócitos expressam o CCR5. Esse receptor também é expresso por células dendríticas, células endoteliais e epiteliais, músculo liso vascular, fibroblastos, neurônios, astrócitos e timócitos

(Murphy *et al.*, 2000; Yoshie *et al.*, 2001). O gene que codifica este receptor está localizado na região p21.3 do cromossomo 3 humano (Vargas *et al.*, 2006), em um *cluster* juntamente com outros genes de receptores de quimiocinas, incluindo o *CCR2*, distante apenas cerca de 10 kb dele (Smith *et al.*, 1997). Há relatos de que as variantes alélicas *CCR2-64I* e *CCR5-delta32* estão em forte desequilíbrio de ligação em algumas populações, como na norte-americana (Smith *et al.*, 1997).

O gene *CCR5* está sujeito a várias mutações que afetam sua expressão. Foi identificado um alelo mutante cuja deleção de 32 pares de bases (pb) encontra-se dentro da região codificante do *CCR5*, resultando em uma mudança no quadro de leitura que gera um receptor não funcional, denominado *CCR5-delta32* (Liu *et al.*, 1996) (ver Figura 4). Assim, a proteína truncada resultante não é expressa na superfície celular, permanecendo no retículo endoplasmático (Zafiroopoulos *et al.*, 2004). Esse alelo variante ganhou grande destaque na literatura científica quando se descobriu que indivíduos homocigotos eram resistentes à infecção pelo HIV-1 (Ahlenstiel *et al.*, 2004). Posteriormente, verificou-se que os indivíduos heterocigotos não eram resistentes à infecção, mas apresentavam menor carga viral e progressão mais lenta da doença. Além disso, dentre os indivíduos soropositivos, os heterocigotos apresentavam-se em menor frequência (Kohem *et al.*, 2005). A deleção *CCR5-delta32* leva à completa perda do receptor funcional *CCR5* na superfície das células dos indivíduos homocigotos para esta mutação e à expressão altamente reduzida nos heterocigotos. Embora tanto indivíduos homocigotos *CCR5-delta32* quanto os heterocigotos pareçam saudáveis e não apresentem qualquer fenótipo aparente, a expressão alterada devido à mutação deve afetar as vias mediadas pelo *CCR5* nas respostas imunológicas. Com relação a isso, pesquisadores já observaram em indivíduos com hepatite C crônica, por exemplo, diminuição da necrose periportal e lobular e da inflamação portal naqueles que são heterocigotos para a mutação (Ahlenstiel *et al.*, 2004).

(a) CCR5



(b) CCR5-delta32



Figura 4. Estrutura prevista das moléculas CCR5 e CCR5-delta32. (a) Estrutura prevista da molécula do CCR5 e sua sequência de aminoácidos. A estrutura típica de serpentina está representada com três *loops* (alças) extracelulares (superiores), três *loops* intracelulares (inferiores) e sete domínios transmembrana. A faixa horizontal sombreada representa a membrana celular. Os aminoácidos são representados por uma única letra. Resíduos de aminoácidos idênticos aos da isoforma CCR2B estão em cor preta. Resíduos de cisteína

extracelular são indicados por barras. (b) Estrutura prevista da forma mutante humana CCR5-delta32 e sua sequência de aminoácidos. Na proteína mutante falta os últimos 3 segmentos transmembrana do CCR5, bem como as regiões envolvidas no acoplamento à proteína-G. A faixa horizontal sombreada representa a membrana de organelas intracelulares [modificado de (McNicholl *et al.*, 1997)].

A frequência deste alelo polimórfico varia de zero, em populações afro-subsarianas, a aproximadamente 14%, em populações europeias. Cerca de 1% da população caucasóide é homozigota para o polimorfismo (Mañes *et al.*, 2003). É possível que as frequências elevadas do CCR5-delta32 em europeus sejam atribuídas a uma forte pressão seletiva exercida por patógenos como *Yersinia pestis* (agente da peste bubônica), *Shigella*, *Salmonella* e *Mycobacterium tuberculosis*, que são alvos de macrófagos, ou por outras doenças infecciosas como sífilis, varíola e influenza. O CCR5-delta32 pode ser considerado um alelo europeu e pesquisadores sugerem que ele poderia ser utilizado, em conjunto com outros marcadores genéticos, em estudos de ancestralidade genômica de populações miscigenadas. Nas populações brasileiras em geral, a frequência do CCR5-delta32 varia de 4,2% na região Norte a 6,4% na Sul. Quando estratificadas por origem étnica, as frequências são baixas entre afro-descendentes, variando de 0,7% a 2,6% e entre euro-descendentes do Rio Grande do Sul a frequência alcança 6,6% (Vargas *et al.*, 2006).

Alguns indícios sugerem que a perda de expressão do alelo normal CCR5 afeta as respostas inflamatórias. Já foi demonstrado que a expressão do alelo delta32 leva à proteção contra o surgimento e severidade de doenças inflamatórias como artrite reumatóide (Mañes *et al.*, 2003; Prahalad, 2006), doenças auto-imunes e inflamatórias crônicas como asma, esclerose múltipla e glomerulonefrites (Kohem *et al.*, 2005). Também está associada com maior sobrevivência dos transplantes renais e risco reduzido de infarto do miocárdio. Estes resultados sugerem um papel funcional do CCR5 nestas patologias (Mañes *et al.*, 2003).

O par receptor de quimiocina CCR5 / ligante CCL5 tem sido estudado no câncer e relacionado com o crescimento e metástase de muitos tipos de carcinomas, como os de mama e mieloma múltiplo (Narter *et al.*, 2010).

Srivastava *et al.* (2008) relatam que o genótipo heterozigoto CCR5-selvagem/delta32 e o alelo CCR5-delta32 conferem risco significativo para câncer de vesícula biliar, particularmente em pacientes com desenvolvimento precoce da doença. Sabe-se que os receptores de quimiocinas desempenham um papel crucial na imunidade antitumoral e que estão envolvidos na inflamação e patogênese das neoplasias (Srivastava *et al.*, 2008). Várias evidências sugerem que o CCR5 pode regular as respostas imunológicas por mediar o recrutamento de células Tregs, uma subpopulação de células T CD4⁺, com função essencial na homeostasia imunológica e auto-tolerância (Josefowicz & Rudensky, 2009). Há estudos mostrando que a sinalização do CCR5 parece ser essencial para o *homing* de Tregs tumor-associadas em um modelo de câncer pancreático (Tan *et al.*, 2009) e um sinal regulatório chave na migração de Tregs para sítios de infecção *Paracoccidioides* (Moreira *et al.*, 2008). O CCR5 também parece estar criticamente envolvido no recrutamento de Tregs na inflamação intestinal crônica (Kang *et al.*, 2007).

A quimiocina CCL5 no ambiente tumoral parece contribuir para melhorar a resposta imune contra o câncer de mama e de pulmão, mas também tem sua expressão correlacionada com mau prognóstico e estágios mais avançados no câncer de mama (Mañes *et al.*, 2003, Raman *et al.*, 2007). Este último efeito pode estar relacionado ao fato de células cancerosas expressando CCR5 serem capazes de migrar na presença de um gradiente de quimiocinas ligantes, o que poderia contribuir para o processo de metástase do câncer (Mañes *et al.*, 2003). Já foi demonstrado que anticorpos monoclonais para CCR5 bloqueiam significativamente a sinalização de CCL5 em células cancerosas de mama *in vitro*. Além disso, o tratamento sistêmico de camundongos portadores de tumor com anti-CCR5 parece inibir a propagação metastática das células (Narter *et al.*, 2010).

Mañes *et al.* (2003) identificaram uma via (dependente de Gi – proteína Gi, JAK2 - Janus quinase 2, e p38 - *p38 mitogen-activated protein kinase*) pela qual o CCR5 regula a atividade transcricional do gene p53 (um supressor tumoral). Esta via parece ser silenciada ou severamente prejudicada em indivíduos portadores do alelo delta32. Como consequência, indivíduos portadores do alelo delta32 e com o p53 selvagem têm tumores de mama que crescem mais rápido e tem recidivas mais cedo que indivíduos com CCR5

selvagem. Acredita-se que esta relação entre CCR5 e o supressor tumoral p53 representa mais um mecanismo de controle da progressão tumoral em humanos (Mañes *et al.*, 2003).

O estroma circundante ao tumor apresenta mudanças significativas para a expressão de quimiocinas. O aumento dessa expressão no estroma tem sido correlacionado com o tamanho do tumor e a invasão dos linfonodos (Hembruff & Cheng, 2009). Recentemente, alguns trabalhos verificaram a expressão de CCR5 e CCL5 em tecidos de CaP humano. A expressão de CCR5 pode ser observada na superfície das células de CaP e em grandes reservatórios intracelulares. Em linhagens de células de CaP *in vitro*, CCL5 parece induzir a proliferação celular, enquanto um antagonista do CCR5 (TAK-779) parece inibir tal proliferação (Vaday *et al.*, 2006), indicando que os antagonistas do CCR5 também afetam a sinalização autócrina nas células cancerosas (Hembruff & Cheng, 2009). Entretanto, o mecanismo dessa composição e eficácia em outros tipos de câncer *in vitro* e *in vivo* permanece incerto. De acordo com tais evidências, acredita-se que quimiocinas inflamatórias como CCL5, expressas pelas células da próstata, possam atuar diretamente sobre o crescimento e sobrevivência celular nessa neoplasia. Com base nisso, especula-se que antagonistas dos receptores de quimiocinas poderiam bloquear os mecanismos autócrinos e parácrinos de progressão do CaP (Vaday *et al.*, 2006).

Em conjunto, esses trabalhos mostram que o papel dos receptores de quimiocinas e de seus ligantes na progressão tumoral é complexo e pouco entendido (Mañes *et al.*, 2003). Também fornecem indícios que CCR5/CCL5 representa uma via de sinalização por quimiocinas potencialmente significativa no desenvolvimento tumoral (Hembruff & Cheng, 2009), relacionada com a suscetibilidade, bem como um possível fator genético modificador do quadro e progressão da doença.

Capítulo 2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1. JUSTIFICATIVA

Considerando que os receptores de quimiocinas CCR2 e CCR5 estão envolvidos em processos inflamatórios, que tais processos inflamatórios estão relacionados (dependendo do caso) ao desenvolvimento de uma resposta pró tumoral ou antitumoral pelo sistema imunológico, torna-se relevante a análise de polimorfismos, como CCR2-64I e CCR5-delta32, nos três grupos estudados: câncer de próstata, hiperplasia prostática benigna e controle, para assim verificarmos se há alguma associação entre o quadro clínico e o genótipo desses pacientes.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. Objetivos gerais

Avaliar o envolvimento de variantes polimórficas dos receptores de quimiocinas CCR2 e CCR5 no desenvolvimento de hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata.

2.2.2. Objetivos específicos

- ✓ Analisar a frequência e os aspectos fisiopatológicos dos alelos CCR2-64I e CCR5-delta32 em pacientes com hiperplasia prostática benigna, câncer de próstata e em indivíduos controle.
- ✓ Comparar as frequências das variantes polimórficas entre os grupos de estudo e verificar possíveis associações.
- ✓ Comparar as frequências do CCR2-64I e CCR5-delta32 com os estados clinicopatológicos dos pacientes com CaP, verificando estadiamento tumoral e escore de Gleason, e buscar possíveis associações.

Capítulo 3 MANUSCRITO EM PREPARAÇÃO

Para ser submetido à revista científica *The Prostate*.

Título: The genetic influence of CCR2-64I and CCR5-Δ32 in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer

The genetic influence of CCR2-64I and CCR5-Δ32 in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer

Francis Maria Bão Zambra, BSc¹, Vanderlei Biolchi, PhD², Ilma Simoni Brum, PhD², José Artur Bogo Chies, PhD¹.

¹Departament of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Departament of Physiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

Correspondence: Dr. José Artur Bogo Chies

Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS, Caixa Postal 15053, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

Fax: +55-51-3308-7311 / e-mail: jabchies@terra.com.br

Short Title: CCR2 and CCR5 in hyperplasia and prostate cancer

Acknowledgments

Grant sponsor: CNPq; grant number 306349/2011-6 and 473115/2011-5.

ABSTRACT

BACKGROUND. Benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer (PCa) are two chronic conditions very common in aged men and have been related to inflammatory process. Chemokines and their receptors are recognized as critical mediators of inflammatory responses by regulating the migration of immune cells and are implicated in tumor pathogenesis. Our aim was to investigate the impact of two chemokine receptor gene polymorphisms, CCR2-64I and CCR5-Δ32, in BPH and PCa.

METHODS. The subjects included 385 genomic DNA samples from southernmost Brazilian men (130 BPH, 136 PCa and 119 healthy control), genotyped by PCR-RFLP (CCR2-64I) or PCR (CCR5-Δ32).

RESULTS. The allele frequencies of CCR2-64I were 14.0%, 15.8% and 11.1% in control, BPH and PCa, respectively; while of CCR5-Δ32 were 5.1%, 7.1% and 6.2% respectively. Median of serum PSA levels was different between groups, that is, 0.79, 1.45 and 6.91ng/mL in control, BPH and PCa group, respectively (all $p < 0.001$). The prostate volume median was 20.00cm³ in the control group, thus, lower than BPH (35.35cm³) and PCa (35.80cm³) groups (both $p < 0.001$), nevertheless no difference was observed between BPH and PCa patients ($p = 0.172$). Interestingly, CCR2-64I was detected as a protective factor to PCa when compared with BPH (OR=0.550; 95%CI=0.311–0.975; $p = 0.041$), but not when compared with control group. No significant associations of the CCR5-Δ32 variant were observed with BPH or PCa (all $p \geq 0.072$), or with PCa clinicopathologic status (all $p \geq 0.253$).

CONCLUSIONS. We found the CCR2-64I variant as protective factor to PCa when compared to BPH, suggesting its influence in the development of prostate cancer.

Key words: Chemokine Receptor genes, Polymorphism, CCR2, CCR5, benign prostatic hyperplasia, prostate cancer.

INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa) represents the second leading cause of death among all cancer types in men from Brazil, North America and Europe [1,2]. Benign prostatic hyperplasia (BPH) is one of the most common proliferative diseases affecting aged men [3,4]. Both conditions are considered chronic diseases with early onset and slow progression [5]. BPH and PCa are also conditions associated with prostatic inflammation, are hormone dependent, their incidence and prevalence rise with the advance of age and, even though there is no clear genetic and molecular relationship between them and that both conditions present two different pathogenetic pathways, a possible common denominator was suggested [6].

Chemokines and chemokine receptors are amongst the suspected factors that may influence PCa and BPH incidence and progression [1,7]. Chemokines are small chemotactic soluble proteins recognized as critical mediators of the inflammatory response by regulating the migration of immune cells through the interaction with chemokine receptors on the surface of these cells [8]. These molecules, due to their immunomodulatory activities, are critically involved in the processes that allow the development of effective responses by the immune system [9]. Although it is already known that chemokines and chemokine receptors can be involved in tumor pathogenesis, it is not yet clear how they affect human cancer progression since they seem to be involved in both tumor development and cancer metastasis, as well as in anti-tumor responses [10].

According to the number and spacing of their conserved cysteine residues (C) chemokines are divided into four classes: XC, CC, CXC and CX3C. Chemokine receptors are molecules that present seven transmembrane domains and couples to G-protein for signal transduction [11]. CCR2 is a CC chemokine receptor that can bind CCL2, CCL7, CCL8 and CCL13 chemokines [12,13]. Of this ligands, CCL2 has the highest affinity to CCR2 [14,15]. CCR2 is mainly expressed by macrophages, T lymphocytes, dendritic cells, B cells and basophils [16]. Recent investigations about PCa and BPH has focused in the CCR2 and its CCL2 ligand, and suggested that CCR2 may contribute to tumoral progression [7,17,18,19,20,21]. Regarding this, it was observed that the CCR2

mRNA expression is significantly higher in metastatic PCa tissue as compared to localized PCa (intermediary expression) or benign prostate tissue (the lowest expression) [22]. The CCR2 allelic variant (CCR2-64I – rs1799864) has a G-to-A nucleotide substitution at position 190 that substitutes the amino acid residue valine (V) at position 64 by isoleucine (I) within the first transmembrane domain of the CCR2 receptor [13]. CCR2-64I has been reported as a risk factor to hepatocellular cancer [23], bladder cancer [13] and, otherwise, as protective factor to breast cancer [24]. The role of this genetic variant in tumor progression is uncertain.

CCR5 is a member of the CC chemokine receptor class capable to bind to CCL3, CCL4, CCL5 and CCL8 chemokines [25,26,27,28,29]. CCR5 regulates trafficking and effector functions of memory/effector T cells, macrophages, immature dendritic cells and NK cells [30]. The CCR5/CCL5 axis has been investigated at recent studies in PCa and BPH progression [31,32,33,34,35]. The CCR5-Δ32 is a variant allele whose 32 bp deletion in the coding region of CCR5 gene results in a nonfunctional receptor [36,37,38]. The CCR5-Δ32 was reported as a risk factor to gallbladder cancer [39], but as a protective factor to prostate cancer [40]. CCR5 can regulate immune responses by mediating the recruitment of regulatory T cells (which are essential to immune homeostasis) [41], as observed in studies such as chronic intestinal inflammation [42] and in a pancreatic cancer model [43]. Interestingly, it should be pointed out that chemokine receptors such as CCR2 and CCR5 can be involved in both cancer development and in chronic inflammatory diseases [44].

Considering that CCR2 and CCR5 are involved in inflammatory processes and in immune system regulation, that such processes may be related to pro- or anti-tumor activity in the host, and that there are still many doubts about its functional significance in tumor development and progression, our aim was to investigate the impact of two chemokine receptor gene polymorphisms, CCR2-64I and CCR5-Δ32, in BPH and PCa development.

MATERIALS AND METHODS

Study population

In this case-control study 385 samples provided for the Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral (UFRGS) were analysed (130 from BPH patients, 136 PCa patients and 119 healthy control subjects). All individuals came from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, the southernmost state of Brazil and were diagnosed between 2004 and 2009. Inclusion criteria, according to Biolchi *et al.* [45], for BPH, were: age between 40-80 years, prostate volume larger than 30cm³ (evaluated by abdominal ultrasound to define BPH group), no past or current hormone-ablation therapy or 5 α -reductase inhibitor therapy, and no other concomitant neoplasia. Patients were submitted to surgery and the diagnosis of BPH was confirmed by pathological examination. According to Neto *et al.* [46], inclusion criteria for the PCa group were: age 45-80 years old, no current hormone-ablative therapy and no other concomitant neoplasia. Controls were selected from a prostate cancer prevention program conducted since 2004. Inclusion criteria were age between 40-80 years, prostate volume smaller than 30cm³, PSA value less than 2.0 ng/mL, digital rectal examination with normal result and absence of any concomitant neoplasia. Factors such as age, ethnic origin, tumor stage, Gleason score and total serum PSA levels at diagnosis were recorded. The study was approved by the local and national Ethics Committee and informed consent was obtained from every subject.

Genotyping

CCR2 typing was performed by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) assay. The CCR2-64I polymorphism was genotyped using specific primers previously described by Smith *et al.* [16]. The PCR samples were prepared to a final volume of 25 μ l as follows: 1 μ l of DNA (0.2-0.5 μ g), 2.5 μ l of 10X PCR buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl], 1 μ l of 50mM MgCl₂, 1 μ l of 3 mM dNTP mix, 1 μ l of 10pmol primer mix and 0.2 μ l *Taq* DNA polymerase 5U/ μ l (Invitrogen Corporation, California, USA). Samples were submitted to 40 cycles of 1 min at 94°C, 1 min

at 55°C, and 1 min at 72°C. The PCR product resulting was a 128 base pairs (bp) fragment. It was digested with 4U of the restriction enzyme *Bsa*BI for 16h (overnight) at 60°C, producing 110 bp and 18 bp fragments (CCR2-64I allele) or a single undigested 128 bp fragment (wild-type allele), which were visualized under UV irradiation in a 8% polyacrylamide gel stained with ethidium bromide.

CCR5 typing was performed by PCR and the genotypes were visualized on 3% agarose gel stained with ethidium bromide, as described in Chies & Hutz [47]. Amplification of the CCR5-wt allele generates a 137 bp band and the CCR5-Δ32 allele generates a 105 bp band.

Statistical Analysis

Hardy-Weinberg equilibrium was assessed using a Chi-square test. Differences between means in the continuous variables were analyzed by T test, with 95% significance. The Kruskal-Wallis non-parametric test, following by Dunn's test was performed to analyze the median differences of serum PSA and prostate volume values between groups. For analysis, the genotypic frequencies of CCR2-64I as well as CCR5-Δ32 were grouped for the presence of at least one variant allele, while haplotypes were compounds by the presence of at least one variant allele versus double wild-type genotypes, considering a small number of homozygous individuals to CCR2-64I and CCR5-Δ32 in the sample and a dominant effect to the genetic variants. The individuals were classified in two groups based in tumor stage, as having evidence of localized PCa (T1 and T2 stages) or extraprostatic disease (T3 and T4 stages), while to biopsy Gleason score patients were divided in two groups: $\leq 6(3+3)$ and $\geq 7(3+4)$, as representative of less or more aggressive disease, respectively. Logistic regression models (age-adjusted) or Chi-square tests were used to provide odds ratio (OR), 95% confidence intervals (CI) and p-values for the risk of CCR2-64I, CCR5-Δ32 and haplotypes with diseases, tumor stage and Gleason score. All tests were two-sided and 5% level was used as threshold for statistical significance. Data analysis was performed using the computer software SPSS version 17.0 for windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

RESULTS

Population

In the study of the polymorphic variants CCR2-64I and CCR5-Δ32, 385 samples divided into three groups were analysed: control (119 individuals), BPH (130) and PCa (136). The characteristics of the studied population are shown in Table I. The participants are predominantly euro-descendants (83.5% control, 91.6% BPH and 86.0% PCa). The mean age observed at diagnosis in the control group was 57.21 ± 7.91 years (range: 41 to 75 years), in the BPH group was 63.08 ± 8.99 (range: 42 to 82) and in PCa group was 63.30 ± 6.97 (range: 46 to 75). The average age of the control group was lower than the other groups (both $p < 0.001$), but did not differ significantly between BPH and PCa groups ($p = 0.975$) (Table I).

The serum PSA median was 0.79 (0.56 to 1.11) ng/mL in the control group, 1.45 (0.70 to 3.91) ng/mL in the BPH group and 6.91 (5.47 to 10.27) ng/mL in the PCa group, differing significantly between them (all $p < 0.001$). The prostate volume median was 20.00 (17.00 to 20.00) cm³ in the control group, thus, lower than the BPH group with 35.35 (30.00 to 50.00) cm³ and the PCa group with 35.80 (28.00 to 44.35) cm³ (both $p < 0.001$). However, there was no significant difference in prostate volume between BPH and PCa groups ($p = 0.172$). Among the PCa patients, 71 (55.5%) men had organ-confined disease (T1 or T2) at the time of surgery, while 52 (40.6%) men had extraprostatic tumor (T3 or T4). The biopsy Gleason score was $\leq 6(3+3)$ in 72 (52.9%) and $\geq 7(3+4)$ in 57 (41.9%) PCa patients (Table I).

The allelic and genotypic frequencies of CCR2-64I and CCR5-Δ32 among control, BPH and PCa groups are presented in Table II. The allelic frequencies of CCR2-64I were 14.0%, 15.8% and 11.1% in control, BPH and PCa groups, respectively; while of CCR5-Δ32 were 5.1%, 7.1% and 6.2%, respectively. The genotypic frequencies distribution was in agreement with the Hardy–Weinberg equilibrium in all sample groups (CCR2-64I - control: $\chi^2 = 0.281$, $p = \text{NS}$; BPH: $\chi^2 = 2.173$, $p = \text{NS}$; PCa: $\chi^2 = 0.084$, $p = \text{NS}$); (CCR5-Δ32 - control: $\chi^2 = 1.757$, $p = \text{NS}$; BPH: $\chi^2 = 0.739$, $p = \text{NS}$; PCa: $\chi^2 = 0.582$, $p = \text{NS}$).

CCR2-64I and CCR5-Δ32 influence in BPH and PCa risk

The association between CCR2-64I or CCR5-Δ32 with BPH or PCa risk was obtained by logistic regression analysis. Considering that the average age was different between the control group and BPH or PCa groups, and that such variable is associated with the risk of these diseases, age at diagnosis was included as a covariate in this analysis. Comparison for the presence (64I/64I + wt/64I) or the absence (wt/wt) of the CCR2-64I allele between BPH vs. control groups (OR=1.428, CI_{95%}=0.787–2.591, p=0.241) and between PCa vs. control groups (OR=0.786, CI_{95%}=0.422–1.464, p=0.448) do not yield statistically significant differences. The same comparison age-adjusted to PCa vs. BPH suggested CCR2-64I as a protective factor to PCa (OR=0.550, CI_{95%}=0.311–0.975, p=0.041) (Table III). Comparison for the presence (Δ32/Δ32 + wt/Δ32) or the absence (wt/wt) of the CCR5-Δ32 allele between BPH vs. control groups (OR=1.534, CI_{95%}=0.656–3.582, p=0.323), PCa vs. control groups (OR=1.142, CI_{95%}=0.476–2.739, p=0.767) or PCa vs. BPH groups (OR=0.746, CI_{95%}=0.357–1.563, p=0.438) do not yield statistically significant differences (Table III). The association of haplotypes between BPH vs. control groups (OR=1.412, CI_{95%}=0.809–2.467, p=0.225), PCa vs. control groups (OR=0.870, CI_{95%}=0.492–1.538, p=0.632) or PCa vs. BPH groups (OR=0.617, CI_{95%}=0.365–1.043, p=0.072) do not yield statistically significant differences (Table III).

CCR2-64I and CCR5-Δ32 influence in PCa clinicopathologic status

The association between CCR2-64I or CCR5-Δ32 with risk for PCa clinicopathologic status was estimated by Chi-square analysis. When analyzing the association of the CCR2-64I and CCR5-Δ32 genotypes or haplotypes with pathologic stages (T1-T2 and T3-T4) in PCa patients no association was observed (Table IV). Also, no associations between the presence or absence of the studied allelic variants or haplotypes were observed considering the Gleason score [$\leq 6(3+3)$ and $\geq 7(3+4)$] of PCa patients (Table V).

DISCUSSION

PCa is the most common cancer type in adult men and BPH is an age-related proliferative abnormality that represent the most common urologic diagnosis in men [3,4]. PCa shares a number of features with BPH [1,3,48] and therefore it is interesting to compare these two pathological conditions. In these conditions, chronic inflammation is commonly observed and the prostate tissue often contain increased inflammatory infiltrates, including T cells and macrophages [3,7]. The reason why the lymphocyte populations increase in BPH is still unknown [49]. Chemokines regulate the migration of immune cells through the activation of chemokine receptors on the surface of these cells [50]. Chemokines and chemokine receptors, such as CCR2 and CCR5, are involved in inflammatory processes and in immune system regulation, and such processes may be related to pro- or anti-tumor activity in the host [reviewed by 10,44]. In the present study we verified a possible association of the CCR2-64I and CCR5-Δ32 genetic variants with BPH and PCa.

The CCR2-64I single nucleotide polymorphism (SNP) results in a substitution of the amino acid valine to isoleucine at position 64 of the CCR2 receptor [16]. This genetic variant has been reported in association studies as a risk factor to hepatocellular cancer [23], bladder cancer [13] and endometrial cancer [51]. This same allele showed no association with prostate cancer [52]. In the present study, CCR2-64I was not associated with PCa clinicopathologic status (tumor stage and Gleason score). Interestingly we found the CCR2-64I as a protective factor for PCa when CCR2-64I genotypic frequencies (considering together CCR2-64I homozygous and heterozygotes individuals) were compared with BPH (OR=0.550; 95%CI=0.311–0.975; p=0.041), but not when compared with control group (OR=0.786, 95%CI=0.422–1.464, p=0.448). It is possible observe in this data that the CCR2-64I allelic and genotypic (64I/64I + wt/64I) frequencies were lower in PCa group (11.1% and 20.8%, respectively) when compared with BPH group (15.8% and 30.8%, respectively) or control group (14.0% and 25.4%, respectively; although do not reached statistical significance). Although we found an association only in comparison of PCa vs. BPH, the allelic frequencies distribution of CCR2-64I among the three groups strongly suggest a protective effect of this allele against prostate cancer. A

possible explanation to our results is that functional effects of the CCR2-64I variant could interfere (for example, inhibit) with some factors related to cancer progression. Various tissue cells are activated by chemokines through different chemokine receptors which trigger processes in cellular proliferation, angiogenesis and extravasation as well as neoplasia [31]. Some studies have verified a possible influence of the CCR2/CCL2 axis mainly in PCa development and progression, but also in BPH [7,17,18,19,53,54]. A positive association among CCR2 expression and PCa progression was already reported by Lu et al. [18], which had previously reported the CCR2 ligand CCL2 as a possible paracrine and autocrine factor for PCa growth and invasion [17]. These authors observed that increased CCR2 expression correlated with advancing of PCa clinicopathologic stages and Gleason score, while normal prostate tissues expressed low CCR2 levels [18]. A study with breast cancer showed the CCR2 ligand CCL2 expression associated with macrophages accumulation and correlated with the concentration of potent angiogenic factors in breast cancer, suggesting its influence in angiogenesis and tumor survival [50]. Concerning to breast cancer, the CCR2-64I variant was already reported as a protective factor [24]. Our results suggested a protective influence of CCR2-64I variant in PCa, although its role in prostate tumor development remains uncertain.

Recent studies approached a potential role of CCR5 and its ligand CCL5 in PCa and BPH [31,32,34,35]. High expression levels of CCR5 and its ligand CCL5 have been observed in human PCa tissues [32]. It was already observed that the functional CCR5 receptors expressed in PCa cells lines may mediate pro-tumor activities *in vitro* (like PCa cell proliferation and invasion) upon elevated levels of CCL5 [32]. Moreover, the CCR5 molecule may have also an indirect effect on cancer progression by controlling the anti-tumor immune response, for example through regulatory T cells or increased cytotoxic T cell activity [55]. The CCR5 gene variant, CCR5-Δ32, determines a complete loss of expression of functional CCR5 receptor on the cell surface of homozygous individuals and a greatly reduced expression in heterozygotes [36,37,38]. By altering CCR5 expression, the CCR5-Δ32 mutation should affect several CCR5-mediated pathways in the immune response, as demonstrated by numerous studies [9,10,16,44]. Although often considered as a “benign mutation” due to its role in HIV infection resistance, several associations with this variant and

negative effects were already reported, including cancer development [reviewed by 56]. In the present study no association of the CCR5-Δ32 variant was observed with PCa, PCa clinicopathologic status (tumor stage and biopsy Gleason score) or BPH. Our results (relative to CCR5-Δ32 in PCa) corroborate data from a large Australian case-control study by Petersen et al. [52], where CCR5-Δ32 variant was analyzed in a group of 815 PCa patients and 738 healthy controls [52]. CCR5-Δ32 was already reported as a protective factor to PCa by Balistreri et al. [40], but in a quite small cohort (n=50). To our knowledge, no other association studies were performed that compare CCR5-Δ32 with HPB.

A limitation of this study is the sample size and also the fact that the role of CCR2-64I and CCR5-Δ32 in BPH and PCa development is still poorly understood. Due to inconsistencies in the scientific literature about the role of both polymorphisms, further investigations with functional assessments, meta-analysis and larger samples in different populations could clarify the role of these genetic variants in prostate tumor development. Our study stands out by comparing three rather than two different groups, showing an important link among two prostatic tumor conditions. The understanding about CCR2-64I and CCR5-Δ32 genetic variants may be important to novel therapeutic approaches to PCa in the future and to survival improvement of affected subjects for this disease.

CONCLUSIONS

This study showed the presence of the CCR2-64I variant as a protective factor to PCa when compared with BPH. We have found no association of chemokine receptor CCR5-Δ32 polymorphism in BPH or PCa, and of CCR2-64I in PCa clinicopathologic status, in this sample. There are still inconsistencies and doubts in the scientific literature about the role of these genetic variants in prostate tumor processes, but the essential role of CCR2 and CCR5 in the immunological responses configuration suggests that these genetic variants may have key functions in prostate tumor development and progression.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge to M.Sc. Caio C. S. Cerqueira for suggestions that enriched this paper, to M.Sc. Paula Rohr, M.Sc. Caio C. S. Cerqueira and Vania N. Hirakata for their usefull review of statistical analysis and to Patrícia Martiny for help in some data bank informations.

REFERENCES

1. Vindrieux D, Escobar P, Lazennec G. Emerging roles of chemokines in prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer* 2009;16:663–673.
2. Instituto Nacional de Câncer (INCA), <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012> (February 09, 2012)
3. De Nunzio C, Kramer G, Marberger M, Montironi R, Nelson W, Schröder F, Sciarra A, Tubaro A. The controversial relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: the role of inflammation. *Eur Urol* 2011;60:106–117.
4. Kirby RS. The natural history of benign prostatic hyperplasia: what have we learned in the last decade? *Urology* 2000;1;56(5 Suppl 1):3-6.
5. Sciarra A, Di Silverio F, Salciccia S, Aufran Gomez AM, Gentilucci A, Gentile V. Inflammation and chronic prostatic diseases: evidence for a link? *Eur Urol* 2007;52:964–72.
6. Alcaraz A, Hammerer P, Tubaro A, Schröder FH, Castro R. Is there evidence of a relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer? Findings of a literature review. *Eur Urol* 2009;55:864–75.
7. Fujita K, Ewing CM, Getzenberg RH, Parsons JK, Isaacs WB, Pavlovich CP. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) is associated with prostatic growth dysregulation and benign prostatic hyperplasia. *Prostate* 2010;1;70(5):473-81.
8. Ruffini PA, Morandi P, Cabioglu N, Altundag K, Cristofanilli M. Manipulating the chemokine-chemokine receptor network to treat cancer. *Cancer* 2007;109(12):2392-404.
9. Ahlenstiel G, Woitas RP, Rockstroh J, Spengler U. CC-chemokine receptor 5 (CCR5) in hepatitis C--at the crossroads of the antiviral immune response? *J Antimicrobial Chemotherapy* 2004;53:895-8.
10. Mañes S, Mira E, Colomer R, Montero S, Real LM, Gómez-Moutón C, Jiménez-Baranda S, Garzón A, Lacalle RA, Harshman K, Ruíz A, Martínez-A C. CCR5 expression influences the progression of human breast cancer in a p53-dependent manner. *J Exp Med* 2003;198:1381–1389.
11. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Ver* 2000;52(1):145-76.
12. Yoshie O, Imai T and Nomiyama H. Chemokines in immunity. *Adv Immunol* 2001;78:57-110.
13. Narter KF, Agachan B, Sozen S, Cincin ZB, Isbir T. CCR2-64I is a risk factor for development of bladder cancer. *Genet Mol Res* 2010;9(2):685-692.

14. Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2001;2, 108–115.
15. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006;354, 610–621.
16. Smith MW, Carrington M, Winkler C, Lomb D, Dean M, Huttley G, O'Brien SJ. CCR2 chemokine receptor and AIDS progression. *Nat Med* 1997;3:1052-1053.
17. Lu Y, Cai Z, Galson DL, Xiao G, Liu Y, George DE, Melhem MF, Yao Z, Zhang J. Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1) Acts as a Paracrine and Autocrine Factor for Prostate Cancer Growth and Invasion. *Prostate* 2006;66(12):1311-1318.
18. Lu Y, Cai Z, Xiao G, Liu Y, Keller ET, Yao Z, Zhang J. CCR2 expression correlates with prostate cancer progression. *J Cell Biochem* 2007;101(3):676-85.
19. Loberg RD, Ying C, Craig M, Day LL, Sargent E, Neeley C, Wojno K, Snyder LA, Yan L, Pienta KJ. Targeting CCL2 with systemic delivery of neutralizing antibodies induces prostate cancer tumor regression in vivo. *Cancer Res* 2007;(19):9417–9424.
20. Zhang J, Lu Y and Pienta KJ. Multiple roles of chemokine (C-C motif) ligand 2 in promoting prostate cancer growth. *J Natl Cancer Inst* 2010;102(8):522-8.
21. Zhang J, Patel L and Pienta KJ. CC chemokine ligand 2 (CCL2) promotes prostate cancer tumorigenesis and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010;21(1):41-8.
22. Yu YP, Landsittel D, Jing L, Nelson J, Ren B, Liu L, McDonald C, Thomas R, Dhir R, Finkelstein S, Michalopoulos G, Becich M, Luo JH. Gene expression alterations in prostate cancer predicting tumor aggression and preceding development of malignancy. *J Clin Oncol* 2004;22:2790–2799.
23. Yeh CB, Tsai HT, Chen YC, Kuo WH, Chen TY, Hsieh YH, Chou MC, Yang SF. Genetic polymorphism of CCR2-64I increased the susceptibility of hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol* 2010;102(3):264-70.
24. Zafiroopoulos A, Crikas N, Passam AM, Spandidos DA. Significant involvement of CCR2-64I and CXCL12-3a in the development of sporadic breast cancer. *J Med Genet* 2004;41(5):e59.
25. Nibbs RJ, Yang J, Landau NR, Mao JH, Graham GJ. LD78beta, a non-allelic variant of human MIP-1alpha (LD78alpha), has enhanced receptor interactions and potent HIV suppressive activity. *J Biol Chem* 1999;274:17478–17483.

26. Combadiere C, Ahuja SK, Tiffany HL, Murphy PM. Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC chemokine receptor selective for MIP-1a, MIP-1b and RANTES. *J Leukoc Biol* 1996;60:147–152.
27. Raport CJ, Gosling J, Schweickart VL, Gray PW, Charo IF. Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1a, and MIP-1b. *J Biol Chem* 1996;271:17161–17166.
28. Samson M, Labbe O, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M. Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. *Biochemistry* 1996;35:3362–3367.
29. Gong W, Howard OM, Turpin JA, Grimm MC, Ueda H, Gray PW, Raport CJ, Oppenheim JJ, Wang JM. Monocyte chemotactic protein-2 activates CCR5 and blocks CD4/CCR5-mediated HIV-1 entry/replication. *J Biol Chem* 1998;273:4289–4292.
30. Balistreri CR, Caruso C, Grimaldi MP, Listi F, Vasto S, Orlando V, Campagna AM, Lio D, Candore G. CCR5 receptor: biologic and genetic implications in age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1100:162-72.
31. König JE, Senge T, Allhoff EP, König W. Analysis of the inflammatory network in benign prostate hyperplasia and prostate cancer. *The Prostate* 2004;58(2):121-9.
32. Vaday GG, Peehl DM, Kadam PA, Lawrence DM. Expression of CCL5 (RANTES) and CCR5 in prostate cancer. *The Prostate* 2006;66:124-134.
33. Zhang X, Haney KM, Richardson AC, Wilson E, Gewirtz DA, Ware JL, Zehner ZE and Zhang Y. Anibamine, a natural product CCR5 antagonist, as a novel lead for the development of anti-prostate cancer agents. *Bioorg Med Chem Lett* 2010;20(15):4627-30.
34. Haney KM, Zhang F, Arnatt CK, Yuan Y, Li G, Ware JL, Gewirtz DA, Zhang Y. The natural product CCR5 antagonist anibamine and its analogs as anti-prostate cancer agents. *Bioorg Med Chem Lett* 2011;21(18):5159-63.
35. Magnani M, Castro-Gomez RH, Aoki MN, Gregório EP, Libos F, Morimoto HK, Reiche EM, Watanabe MA. Analysis of peripheral T cells and the CC chemokine receptor (CCR5) delta32 polymorphism in prostate cancer patients treated with carboxymethyl-glucan (CM-G). *Nat Prod Res* 2011;Aug 9. [Epub ahead of print]. DOI:10.1080/14786419.2010.535159
36. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996;86(3):367-77.
37. Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cognaux J, Forceille C, Muyldermans G, Verhofstede C, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth RJ,

Collman RG, Doms RW, Vassart G, Parmentier M. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 1996;382(6593):722-5.

38. Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R, O'Brien SJ. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CCR5* structural gene. *Science* 1996;273(5283):1856-62.

39. Srivastava A, Pandey SN, Choudhuri G, Mittal B. *CCR5D32* Polymorphism: Associated with Gallbladder Cancer Susceptibility. *Scandinavian Journal of Immunology* 2008;67,516–522.

40. Balistreri CR, Carruba G, Calabrò M, Campisi I, Di Carlo D, Lio D, Colonna-Romano G, Candore G, Caruso C. *CCR5* proinflammatory allele in prostate cancer risk: a pilot study in patients and centenarians from Sicily. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1155:289–292.

41. Josefowicz SZ, Rudensky A. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity* 2009;30:616–625.

42. Kang SG, Piniacki RJ, Hogenesch H, Lim HW, Wiebke E, Braun SE, Matsumoto S, Kim CH. Identification of a chemokine network that recruits FoxP3(+) regulatory T cells into chronically inflamed intestine. *Gastroenterology* 2007;132:966–981.

43. Tan MC, Goedegebuure PS, Belt BA, Flaherty B, Sankpal N, Gillanders WE, Eberlein TJ, Hsieh CS, Linehan DC. Disruption of *CCR5*-dependent homing of regulatory T cells inhibits tumor growth in a murine model of pancreatic cancer. *J Immunol* 2009;182:1746–1755.

44. Hembruff SL, Cheng N. Chemokine signaling in cancer: Implications on the tumor microenvironment and therapeutic targeting. *Cancer therapy* 2009;7:254-267.

45. Biolchi V, Neto BS, Koff W, Brum IS. Androgen receptor CAG polymorphism and the risk of benign prostatic hyperplasia in a Brazilian population. *Int Braz J Urol* 2012; 38: 372-8.

46. Neto BS, Koff WJ, Biolchi V, Brenner C, Biolo KD, Spritzer PM, Brum IS. Polymorphic CAG and GGC Repeat Lengths in the Androgen Receptor Gene and Prostate Cancer Risk: Analysis of a Brazilian Population. *Cancer Invest* 2008;26(1):74–80.

47. Chies JA, Hutz MH. High frequency of the *CCR5*-delta32 variant among individuals from an admixed Brazilian population with sickle cell anemia. *Braz J Med Biol Res* 2003;36:71-75.

48. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB, Nelson WG. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 2007;7(4):256-69.

49. Tang J, Yang J. Etiopathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Indian J Urol* 2009;25(3):312–317.
50. Ueno T, Toi M, Saji H, Muta M, Bando H, Kuroi K, Koike M, Inadera H, Matsushima K. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, survival in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:3282–3289.
51. Attar R, Agachan B, Kuran SB, Cacina C, Sozen S, Yurdum LM, Attar E, Isbir T. Association of CCL2 and CCR2 Gene Variants with Endometrial Cancer in Turkish Women. *In Vivo* 2010;24:2243-248
52. Petersen DC, Severi G, Hoang HN, Padilla EJD, Southey MC, English DR, Hopper JL, Giles GG, Hayes VM. No Association between Common Chemokine and Chemokine Receptor Gene Variants and Prostate Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17(12):3615-7.
53. Mazzucchelli L, Loetscher P, Kappeler A, Ugucioni M, Baggiolini M, Laissue JA, Mueller C. Monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in prostatic hyperplasia and prostate adenocarcinoma. *Am J Pathol* 1996;149(2):501-9.
54. Loberg RD, Day LL, Harwood J, Ying C, St John LN, Giles R, Neeley CK, Pienta KJ. CCL2 is a potent regulator of prostate cancer cell migration and proliferation. *Neoplasia* 2006;8(7):578-86.
55. Degerli N, Yilmaz E, Bardakci F. The D32 allele distribution of the CCR5 gene and its relationship with certain cancers in a Turkish population. *Clinical Biochemistry* 2005;38:248–252.
56. Vargas AE, Cechim G, Correa JF, Gomes PA, Macedo Gde S, de Medeiros RM, Perotoni G, Rauber R, Villodre ES, Chies JA. Pros and cons of a missing chemokine receptor--comments on "Is the European spatial distribution of the HIV-1-resistant CCR5-D32 allele formed by a breakdown of the pathocenosis due to the historical Roman expansion?" by Eric Faure and Manuela Royer-Carenzi (2008). *Infect Genet Evol* 2009;9(4):387-9.

Table I. Characteristics of the sample assessed in the CCR2-64I and CCR5-Δ32 study.

	Control (n=119)	BPH (n=130)	PCa (n=136)
Ethnicity (euro-descendant) ^a	96 (83.5%)	109 (91.6%)	104 (86.0%)
Age (years)			
Mean ± SD	57.21 ± 7.91	63.08 ± 8.99	63.30 ± 6.97
Range	41 - 75	42 - 82	46 - 75
PSA (ng/mL) ^b	0.79 (0.56 – 1.11)	1.45 (0.70 – 3.93)	6.91 (5.41 – 10.33)
Prostate volume (cm ³) ^b	20.00 (16.65 – 25.00)	35.35 (30.00 – 50.00)	35.80 (28.70 – 44.52)
Tumor stage ^{a,c,d}			
(T1+T2)			71 (55.5%)
(T3+T4)			52 (40.6%)
Gleason score ^a			
4 (2+2)			1 (0.8%)
5 (3+2)			1 (0.8%)
6 (3+3)			70 (54.3%)
7 (3+4)			23 (17.8%)
7 (4+3)			21 (16.3%)
8 (3+5)			1 (0.8%)
8 (4+4)			6 (4.7%)
9 (4+5)			5 (3.9%)
9 (5+4)			1 (0.8%)

Sample assessed (n=385): 119 control subjects, 130 BPH patients and 136 PCa patients. PCa = prostate cancer, BPH = benign prostatic hyperplasia, SD = standard deviation; PSA = Prostate-Specific Antigen. Values expressed as ^anumber of cases and percentages, ^bmedians and 25/75 percentiles. ^cThere was no information available on pathologic tumor stage for 8 (5.9%) patients and on grade stage for 7 (5.1%) patients. ^dFive (3.9%) patients were submitted to radiotherapy. Ethnicity - PCa vs. BPH vs. control: $p_{\text{global}}=0.164$. Age - BPH or PCa vs. control: $p<0.001$; PCa vs. BPH: $p=0.975$. PSA - BPH or PCa vs. control and PCa vs. BPH: $p<0.001$. Prostate volume - BPH or PCa vs. control: $p<0.001$; PCa vs. BPH: $p=0.556$.

Table II. Distribution of CCR2-64I and CCR5-Δ32 alleles and genotypes among cases and control groups.

	Control, n (%)	BPH, n (%)	PCa, n (%)
CCR2-64I			
wt/wt	88 (74.6%)	90 (69.2%)	107 (79.3%)
wt/ 64I	27 (22.9%)	39 (30.0%)	26 (19.3%)
64I/64I	3 (2.5%)	1 (0.8%)	2 (1.5%)
wt	203 (86.0%)	219 (84.2%)	240 (88.9%)
64I	33 (14.0%)	41 (15.8%)	30 (11.1%)
CCR5-Δ32			
wt/wt	107 (90.7%)	109 (85.8%)	114 (88.4%)
wt/Δ32	10 (8.5%)	18 (14.2%)	14 (10.9%)
Δ32/Δ32	1 (0.8%)	0 (0.0%)	1 (0.8%)
wt	224 (94.9%)	236 (92.9%)	242 (93.8%)
Δ32	12 (5.1%)	18 (7.1%)	16 (6.2%)

Table III. Odds ratio analysis for PCa and BPH development according with genotypes and haplotypes.

BPH x Control	N	BPH, OR[#]	95%CI	p*
Genotypes				
64I/wt + 64I/64I wt/wt	70 178	1.428	0.787 – 2.591	0.241
Δ32/Δ32 + Δ32/wt wt/wt	29 216	1.534	0.656 – 3.582	0.323
Haplotypes				
At least 1 variant allele CCR2 & CCR5 wt/wt	91 153	1.412	0.809 – 2.467	0.225
PCa x Control	N	PCa, OR[#]	95%CI	p*
Genotypes				
64I/wt + 64I/64I wt/wt	58 195	0.786	0.422 – 1.464	0.448
Δ32/Δ32 + Δ32/wt wt/wt	26 221	1.142	0.476 – 2.739	0.767
Haplotypes				
At least 1 variant allele CCR2 & CCR5 wt/wt	79 166	0.870	0.492 – 1.538	0.632
PCa x BPH	N	PCa, OR[#]	95%CI	p*
Genotypes				
64I/wt + 64I/64I wt/wt	68 197	0.550	0.311 – 0.975	0.041
Δ32/Δ32 + Δ32/wt wt/wt	33 223	0.746	0.357 – 1.563	0.438
Haplotypes				
At least 1 variant allele CCR2 & CCR5 wt/wt	92 163	0.617	0.365 – 1.043	0.072

*Values obtained using polytomous logistic regression between BPH vs. control, PCa vs. control; and binary logistic regression between PCa vs. BPH; age-adjusted. [#]OR = Odds Ratio.

Table IV. Distribution of CCR2-64I and CCR5-Δ32 genotypic and haplotypic frequencies in groups of tumor stage.

	T1+T2, n (%)	T3+T4, n (%)	χ^2	OR	95% CI	p*
CCR2-64I						
wt/64I + 64I/64I	12 (17.1%)	12 (23.1%)	0.665	1.450	(0.592 – 3.552)	0.492
wt/wt	58 (82.9%)	40 (76.9%)				
CCR5-Δ32						
wt/Δ32 + Δ32/Δ32	7 (10.6%)	7 (14.0%)	0.309	1.372	(0.448 – 4.201)	0.581
wt/wt	59 (89.4%)	43 (86.0%)				
Haplotype						
At least 1 variant allele	17 (26.2%)	18 (36.0%)	1.294	1.588	(0.714 – 3.533)	0.308
CCR2 & CCR5 wt/wt	48 (73.8%)	32 (64.0%)				

*Values obtained using the Chi-square 2x2, with correction for continuity.

Table V. Distribution of CCR2-64I and CCR5-Δ32 genotypic and haplotypic frequencies in groups of Gleason score.

	≤ 6(3+3), n (%)	≥ 7(3+4), n (%)	χ^2	OR	95% CI	p*
CCR2-64I						
wt/64I + 64I/64I	14 (20.6%)	10 (18.5%)	0.082	0.877	0.355 – 2.165	0.822
wt/wt	54 (79.4%)	44 (81.5%)				
CCR5-Δ32						
wt/Δ32 + Δ32/Δ32	10 (15.9%)	4 (7.5%)	1.880	0.433	0.127 – 1.470	0.253
wt/wt	53 (84.1%)	49 (92.5%)				
Haplotype						
At least 1 variant allele	21 (33.9%)	14 (26.4%)	0.750	0.701	0.313 – 1.569	0.422
CCR2 & CCR5 wt/wt	41 (66.1%)	39 (73.6%)				

*Values obtained using the Chi-square 2x2, with correction for continuity.

Capítulo 4 DISCUSSÃO

O câncer de próstata é o tipo de câncer mais comum no homem adulto e a HPB é uma anormalidade proliferativa relacionada à idade que representa o diagnóstico urológico mais frequente entre os homens. Uma assinatura histológica de inflamação crônica é comumente encontrada no tecido prostático benigno e maligno (De Marzo *et al.*, 2007; De Nunzio *et al.*, 2011). As possíveis causas da inflamação na próstata são infecções bacterianas, refluxo urinário, fatores dietéticos, hormonais e resposta autoimune (De Marzo *et al.*, 2007). A HPB e o CaP formam-se em áreas diferentes da próstata. A HPB desenvolve-se da zona de transição e zona central da glândula, enquanto o adenocarcinoma desenvolve-se a partir da zona periférica. Essas doenças coexistem na mesma zona somente em cerca de 20% dos casos (McNeal, 1988; De Nunzio *et al.*, 2011). Ambas são consideradas doenças crônicas com início precoce e progressão lenta (Sciarra *et al.*, 2007). Embora não haja relação genética e molecular clara entre HPB e CaP, e tais condições apresentem duas vias patogênicas distintas, estudos epidemiológicos sugerem que, por ambas apresentarem sua incidência e prevalência aumentando com o avanço da idade, por serem condições hormônio-dependentes e por estarem associadas com inflamação prostática, poderiam apresentar um denominador comum (Alcaraz *et al.*, 2009). Assim, torna-se interessante a realização de trabalhos que envolvam e comparem ambas condições patológicas, como o presente estudo.

Receptores de quimiocinas como o CCR2 e CCR5 e seus ligantes estão entre os fatores suspeitos de influenciar na incidência e progressão de HPB e CaP (Konig *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2006; Vaday *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2007; Loberg *et al.*, 2007; Vindrieux *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010a; Zhang *et al.*, 2010b; Fujita *et al.*, 2010; Magnani *et al.*, 2011). No presente estudo, foi verificada a influência dos polimorfismos CCR2-64I e CCR5-delta32 em uma amostra de pacientes diagnosticados com HPB e CaP e em indivíduos controle (não afetados por HPB, CaP ou outra neoplasia), sendo tais grupos provenientes do Rio Grande do Sul e formados predominantemente por euro-descendentes.

No polimorfismo CCR2-64I aqui estudado, a substituição nucleotídica de G para A no gene *CCR2* leva à substituição do resíduo de aminoácido valina na posição 64 por uma isoleucina no receptor (Smith *et al.*, 1997). Essa

variante genética tem sido reportada em estudos de associação como fator de risco para câncer hepatocelular (mas não para a progressão patológica) (Yeh *et al.*, 2010), câncer de bexiga (Narter *et al.*, 2010) e de endométrio (Attar *et al.*, 2010). No presente estudo, não foi detectada associação significativa da variante CCR2-64I com CaP quando comparamos este grupo com o grupo controle. O mesmo pode ser observado no estudo de Petersen *et al.* (2008) para a variante CCR2-64I. Em nosso estudo, essa variante também não apresentou associação com o estado clinicopatológico dos pacientes com CaP (relacionado ao estadiamento tumoral e à agressividade das células cancerosas). Destaca-se em nosso estudo a observação da variante CCR2-64I como fator protetor para CaP em relação à HPB. Em nossa amostra, foi possível observarmos as frequências alélicas e genotípicas (considerando a presença ou não do alelo variante) do CCR2-64I significativamente menores nos pacientes com CaP que nos indivíduos com HPB, e relativamente menores às do grupo controle (embora estatisticamente não significativo). Com base nesses dados, é possível que CCR2-64I apresente função protetora para o desenvolvimento de CaP. A existência de efeitos funcionais da variante CCR2-64I que pudessem interferir (por exemplo, inibir) com alguns fatores relacionados à progressão do câncer (que caracterizam a malignidade dessa doença), poderia fornecer uma possível explicação para os resultados aqui encontrados. Porém, sabemos que uma limitação desse trabalho é o tamanho amostral, que pode ser responsável nos estudos por eventual observação de resultados falso negativos ou falso positivos. Estudos futuros com maior tamanho amostral poderão esclarecer nossos resultados. Investigações sobre os efeitos funcionais do CCR2-64I e sobre a rede de interações envolvidas com este receptor no microambiente tumoral também podem auxiliar no entendimento de sua função no desenvolvimento de CaP e HPB.

Já a variante genética CCR5-delta32, aqui analisada, é originada por uma deleção de 32 pb no gene *CCR5*. O produto gênico é uma proteína truncada que leva à completa perda do receptor funcional na superfície das células (Liu *et al.*, 1996; Samson *et al.*, 1996b; Dean *et al.*, 1996). A expressão alterada do CCR5 causada por essa mutação deve afetar várias vias mediadas por este receptor nas respostas imunológicas, conforme já demonstrado por diferentes estudos (Smith *et al.*, 1997; Mañes *et al.*, 2003; Ahlenstiel *et al.*,

2004; Hembruff & Cheng, 2009). Como um potencial papel do CCR5 e de seu ligante CCL5 tem sido apontado pela literatura científica com relação ao desenvolvimento de HPB e CaP, é possível que o CCR5-delta32 possa também afetar o desenvolvimento destas condições patológicas (König *et al.*, 2004; Vaday *et al.*, 2006; Haney *et al.*, 2011; Magnani *et al.*, 2011). Altos níveis de expressão do CCR5 e de seu ligante CCL5 já foram observados em tecidos de CaP humano (com escore de Gleason de 3+4 a 3+5) (Vaday *et al.*, 2006). Isto torna-se importante quando observamos, por exemplo, estudos que mostram elevada expressão do CCL5 sendo correlacionada com mau prognóstico em outros tipos de câncer, como no de mama, sugerindo um papel funcional desse ligante no seu desenvolvimento (Luboshits *et al.*, 1999; Niwa *et al.*, 2001). Também já foi observado que receptores funcionais de CCR5 são expressos em certas linhagens celulares de CaP humano (como DU145 e LNCaP) (Vaday *et al.*, 2006). Ensaios de proliferação e invasão celular *in vitro*, com estas mesmas linhagens celulares, mostraram que tais células proliferam na presença de CCL5 de modo dose-dependente, e que na presença de um antagonista do CCR5 (TAK-779) a proliferação induzida por CCL5 pode ser bloqueada (Vaday *et al.*, 2006). Com base em seus experimentos, Vaday *et al.* (2006) sugerem que o CCR5 pode mediar atividades pró-tumorais (como proliferação e invasão dessas células de CaP) sob elevados níveis de CCL5 (Vaday *et al.*, 2006). Outro antagonista do CCR5, conhecido como anibamine, também é capaz de inibir tais efeitos do CCL5 em linhagens celulares de CaP *in vitro*, sugerindo que tais antagonistas poderiam atuar como inibidores da progressão tumoral (Haney *et al.*, 2011). Assim, antagonistas do CCR5, como os anteriormente mencionados, tem ganhado destaque como possíveis anti-tumorais em estudos que buscam novas abordagens terapêuticas para o CaP (Vaday *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010c; Haney *et al.*, 2011). Deve-se salientar que, por outro lado, CCR5 também pode apresentar efeitos indiretos sobre a progressão do cancer através do controle da resposta imune antitumoral, pela atividade de células como as T regulatórias e T citotóxicas (Degerli *et al.*, 2005). Assim, há indícios de que o CCR5 esteja envolvido tanto em processos pró como antitumorais, mas a forma como atua no microambiente tumoral permanece obscuro.

Em nosso estudo, ao buscarmos por uma possível influência da variante CCR5-delta32 em HPB e CaP, não observamos associação dessa variante com tais patologias. Também não observamos associação dessa variante com o estado clinicopatológico dos pacientes com CaP. Em um grande estudo caso-controle australiano de Petersen *et al.* (2008), esta mesma variante genética foi testada em um grupo de 815 pacientes com CaP e 738 controles saudáveis, e também não foi encontrada associação do CCR5-delta32 com CaP. Contrariamente aos nossos resultados, Balistreri *et al.* (2009) observaram CCR5-delta32 como fator protetivo para CaP. Porém, o tamanho amostral utilizado por este grupo é bastante pequeno (n=50). Até o momento, não temos conhecimento de outro estudo de associação (além do nosso) que relacione a variante CCR5-delta32 com HPB para que possamos comparar com nossos dados.

Nosso estudo destaca-se pela comparação não de dois, mas de três grupos distintos, apresentando uma importante relação entre duas condições tumorais prostáticas. Nossos resultados sugerem um papel protetor da variante CCR2-64I para câncer de próstata, mas seu papel no desenvolvimento de tumores da próstata permanece incerto. Interações entre diferentes fatores genéticos e ambientais e a diversidade étnica das populações estudadas podem influenciar em resultados divergentes obtidos por diferentes estudos. É importante salientar que nossos achados também não excluem a possibilidade da combinação de outros genes que possam influenciar no desenvolvimento de HPB e CaP. O papel do CCR2-64I e do CCR5-delta32 em HPB e CaP ainda é pouco entendido, havendo necessidade de investigações quanto aos aspectos funcionais dessas moléculas no microambiente tumoral e ao estudo de diferentes populações. O entendimento sobre estas variantes polimórficas no desenvolvimento tumoral pode futuramente auxiliar no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o câncer de próstata.

Capítulo 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahlenstiel G, Woitas RP, Rockstroh J and Spengler U (2004) CC-chemokine receptor 5 (CCR5) in hepatitis C--at the crossroads of the antiviral immune response? *J Antimicrobial Chemotherapy* 53:895-8.
- Alcaraz A, Hammerer P, Tubaro A, Schröder FH and Castro R (2009) Is there evidence of a relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer? Findings of a literature review. *Eur Urol* 55:864–75.
- American Cancer Society* (ACS), <http://www.cancer.org/Cancer/ProstateCancer/DetailedGuide/prostate-cancer-key-statistics> (Setembro 15, 2010).
- Arnold JM, Huggard PR, Cummings M, Ramm GA and Chenevix-Trench G (2005) Reduced expression of chemokine (C-C motif) ligand-2 (CCL2) in ovarian adenocarcinoma. *Br J Cancer* 92:2024–2031.
- Attar R, Agachan B, Kuran SB, Cacina C, Sozen S, Yurdum LM, Attar E and Isbir T (2010) Association of CCL2 and CCR2 Gene Variants with Endometrial Cancer in Turkish Women. *In Vivo* Vol24 no.2243-248.
- Balistreri CR, Carruba G, Calabrò M, Campisi I, Di Carlo D, Lio D, Colonna-Romano G, Candore G and Caruso C (2009) CCR5 proinflammatory allele in prostate cancer risk: a pilot study in patients and centenarians from Sicily. *Ann N Y Acad Sci* 1155:289–292.
- Balkwill F and Mantovani A (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357:539-545.
- Balkwill F (2004) Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 4:540-550.
- Bartoli C, Civatte M, Pellissier JF and Figarella-Branger D (2001) CCR2A and CCR2B, the two isoforms of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor are up-regulated and expressed by different cell subsets in idiopathic inflammatory myopathies. *Acta Neuropathol* 102:385–392.
- Beider K, Abraham M and Peled A (2008) Chemokines and chemokine receptors in stem cell circulation. *Front Biosci* 13:6820–6833.
- Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM and Sacks DL (2002) CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity. *Nature* 420, 502–507.
- Biswas SK, Gangi L, Paul S, Schioppa T, Sacconi A, Sironi M, Bottazzi B, Doni A, Vincenzo B, Pasqualini F, Vago L, Nebuloni M, Mantovani A and Sica A (2006) A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood* 107:2112–22.
- Carson C 3rd and Rittmaster R (2003) The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. *Urology* Apr;61(4 Suppl 1):2-7.
- Carter HB and Partin AW (2002) Diagnosis and staging of prostate cancer. In: Walsh: *Campbell's Urology*, 8th edition: WB Saunders p. 3055-3064.
- Chang S, Long SR, Kutikova L, Bowman L, Finley D, Crown WH and Bennett CL (2004) Estimating the cost of cancer: results on the basis of claims data analyses for cancer patients diagnosed with seven types of cancer during 1999 to 2000. *J Clin Oncol* 22:3524-3530.
- Charo IF and Ransohoff RM (2006) The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 354, 610–621.
- Chen L, Stacewicz-Sapuntzakis M, Duncan C, Sharifi R, Ghosh L, van Breemen R, Ashton D and Bowen PE (2001) Oxidative DNA damage in

- prostate cancer patients consuming tomato sauce-based entrees as a whole-food intervention. *J Natl Cancer Inst* 93:1872–1879.
- Chies JA and Hutz MH (2003) High frequency of the CCR5-delta32 variant among individuals from an admixed Brazilian population with sickle cell anemia. *Braz J Med Biol Res* 36:71-5.
- Cho ML, Yoon BY, Ju JH, Jung YO, Jhun JY, Park MK, Cho CS and Kim HY (2007) Expression of CCR2A, an isoform of MCP-1 receptor, is increased by MCP-1, CD40 ligand and TGF-beta in fibroblast like synoviocytes of patients with RA. *Exp Mol Med* 39(4):499–507.
- Christopherson K and Hromas R (2001) Chemokine regulation of normal and pathologic immune responses. *Stem Cells* 19:388-96.
- Combadiere C, Ahuja SK, Tiffany HL and Murphy PM (1996) Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC chemokine receptor selective for MIP-1a, MIP-1b and RANTES. *J Leukoc Biol* 60:147–152.
- Cotton M and Claing A (2009) G protein-coupled receptors stimulation and the control of cell migration. *Cell Signal* 21(7):1045-53.
- Coussens LM and Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420:860-867.
- Darash-Yahana M, Pikarsky E, Abramovitch R, Zeira E, Pal B, Karplus R, Beider K, Avniel S, Kasem S, Galun E and Peled A (2004) Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, metastasis. *Faseb J* 18:1240–1242.
- Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R and O'Brien SJ (1996) Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. *Science* 273(5283):1856-62.
- De Marzo AM, Meeker AK, Zha S, Luo J, Nakayama M, Platz EA, Isaacs WB and Nelson WG (2003) Human prostate cancer precursors and pathobiology. *Urology* 62:55-62.
- De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB and Nelson WG (2007) Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* Apr; 7(4):256-69.
- De Nunzio C, Kramer G, Marberger M, Montironi R, Nelson W, Schröder F, Sciarra A and Tubaro A (2011) The controversial relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: the role of inflammation. *Eur Urol* 60:106–117.
- De Paepe B, Creus KK and De Bleecker JL (2008) Chemokines in idiopathic inflammatory myopathies. *Front Biosci* 13:2548–2577.
- DeVries ME, Kelvin AA, Xu L, Ran L, Robinson J and Kelvin DJ (2006) Defining the origins and evolution of the chemokine/chemokine receptor system. *J Immunol* 176:401–415.
- Degerli N, Yilmaz E and Bardakci F (2005) The D32 allele distribution of the CCR5 gene and its relationship with certain cancers in a Turkish population. *Clinical Biochemistry* 38:248–252.
- Deshmane SL, Kremlev S, Amini S and Sawaya BE (2009) Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J Interferon Cytokine Res* Jun;29(6):313-26.

- Devalaraja MN and Richmond A (1999) Multiple chemotactic factors: fine control or redundancy? *Trends Pharmacol Sci* 20(4):151-156.
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ and Schreiber RD (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3:991–998.
- Fibbi B, Penna G, Morelli A, Adorini L and Maggi M (2010) Chronic inflammation in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Int J Androl* 33(3):475-488.
- Fujita K, Ewing CM, Getzenberg RH, Parsons JK, Isaacs WB and Pavlovich CP (2010) Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1/CCL2) is associated with prostatic growth dysregulation and benign prostatic hyperplasia. *Prostate* 1; 70(5):473-81.
- Gerard C and Rollins BJ (2001) Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2, 108–115.
- Gillitzer R and Goebeler M (2001) Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol* 69:513-521.
- Globocan 2008 - <http://globocan.iarc.fr> (Março 06, 2012).
- Gong W, Howard OM, Turpin JA, Grimm MC, Ueda H, Gray PW, Raport CJ, Oppenheim JJ and Wang JM (1998) Monocyte chemotactic protein-2 activates CCR5 and blocks CD4/CCR5-mediated HIV-1 entry/replication. *J Biol Chem* 273:4289–4292.
- Haney KM, Zhang F, Arnatt CK, Yuan Y, Li G, Ware JL, Gewirtz DA and Zhang Y (2011) The natural product CCR5 antagonist anibamine and its analogs as anti-prostate cancer agents. *Bioorg Med Chem Lett* 21(18):5159-63.
- Hasegawa H and Fujita S (2001) Chemokines and lymphocytes: the role of chemokines and their receptors in the immune system. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 47(4):599-607.
- Hembruff SL and Cheng N (2009) Chemokine signaling in cancer: Implications on the tumor microenvironment and therapeutic targeting. *Cancer therapy* 7:254-267.
- Huang CY, Fong YC, Lee CY, Chen MY, Tsai HC, Hsu HC and Tang CH (2008) CCL5 increases lung cancer migration via PI3K, Akt and NF-kappaB pathways. *Biochem Pharmacol* 77:794–803.
- Huehn J and Hamann A (2005) Homing to suppress: address codes for Treg migration. *Trends Immunol* 26(12):632-636.
- Instituto Nacional de Câncer (2008) Ações de enfermagem para o controle do câncer. Uma proposta de integração ensino-serviço. 3ª edição. Rio de Janeiro: INCA. p. 46-49.
- Instituto Nacional de Câncer (INCA), 2 (Setembro 15, 2010).
- Instituto Nacional de Câncer (INCA), <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012> (Fevereiro 28, 2012).
- International Agency for Research on Câncer (IARC)*, http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/wcr_2008.pdf (Setembro 15, 2010).
- International Agency for Research on Câncer (IARC)*, http://www-dep.iarc.fr/CIN_resources.htm (Setembro 15, 2010).
- Josefowicz SZ and Rudensky A (2009) Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity* 30:616–625.
- Kang SG, Piniacki RJ, Hogenesch H, Lim HW, Wiebke E, Braun SE, Matsumoto S and Kim CH (2007) Identification of a chemokine network

- that recruits FoxP3(+) regulatory T cells into chronically inflamed intestine. *Gastroenterology* 132(3):966–981.
- Kesarwani P and Mittal RD (2010) Association of Pro/Anti-inflammatory Cytokine Gene Polymorphisms with Benign Prostate Hyperplasia Risk. *Ind J Clin Biochem* 25(4):342–348.
- Kirby RS (2000) The natural history of benign prostatic hyperplasia: what have we learned in the last decade? *Urology* 1;56(5 Suppl 1):3-6.
- Kleine-Lowinski K, Gillitzer R, Kuhne-Heid R and Rosl F (1999) Monocyte-chemo-attractant-protein-1 (MCP-1)-gene expression in cervical intra-epithelial neoplasias and cervical carcinomas. *Int J Cancer* 82:6–11.
- Kohem CL, Chies JAB and Brenol JCT (2005) Estudo do polimorfismo e expressão do CCR5 em pacientes com artrite reumatóide. Tese de doutorado, UFRGS.
- Koizumi K, Hojo S, Akashi T, Yasumoto K and Saiki I (2007) Chemokine receptors in cancer metastasis and cancer cell-derived chemokines in host immune response. *Cancer Sci* 98(11):1652-8.
- König JE, Senge T, Allhoff EP and König W (2004) Analysis of the inflammatory network in benign prostate hyperplasia and prostate cancer. *The Prostate* 58(2):121-9.
- Kramer G, Steiner GE, Handisurya A, Stix U, Haitel A, Knerer B, Gessl A, Lee C and Marberger M (2002) Increased expression of lymphocyte-derived cytokines in benign hyperplastic prostate tissue, identification of the producing cell types and effect of differentially expressed cytokines on stromal cell proliferation. *Prostate* 52(1):43-58.
- Kramer G and Marberger M (2006) Could Inflammation be a key component in the progression of benign prostatic hyperplasia? *Curr Opin in Urol* 16(1):25-9.
- Kramer G, Mitteregger D and Marberger M (2007) Is Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) an immune inflammatory disease? *Eur Urol* 51(5):1202-16.
- Kuschert GSV, Coulin F, Power CA, Proudfoot AE, Hubbard RE, Hoogewerf AJ and Wells TNC (1999) Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry* 38:12959-12969.
- Laing KJ and Secombes CJ (2004) Chemokines. *Dev Comp Immunol* 28:443-460.
- Lefort A e Almeida JC (2004) Câncer de próstata: a importância das campanhas de prevenção. Monografia de especialização, Belo Horizonte, MG.
- Lewis CE and Pollard JW (2006) Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 66:605–612.
- Li M and Ransohoff RM (2009) The roles of chemokine CXCL12 in embryonic and brain tumor angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 19:111–115.
- Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA and Landau NR (1996) Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 86(3):367-77.
- Loberg RD, Day LL, Harwood J, Ying C, St John LN, Giles R, Neeley CK and Pienta KJ (2006) CCL2 is a potent regulator of prostate cancer cell migration and proliferation. *Neoplasia* 8:578–586.

- Loberg RD, Ying C, Craig M, Day LL, Sargent E, Neeley C, Wojno K, Snyder LA, Yan L and Pienta KJ (2007) Targeting CCL2 with systemic delivery of neutralizing antibodies induces prostate cancer tumor regression in vivo. *Cancer Res* 67(19):9417–9424.
- Loetscher P, Uguccioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini C and Dayer JM (1998) CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 391:344-5.
- Lu Y, Cai Z, Galson DL, Xiao G, Liu Y, George DE, Melhem MF, Yao Z and Zhang J (2006) Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1) Acts as a Paracrine and Autocrine Factor for Prostate Cancer Growth and Invasion. *Prostate* 66(12):1311-1318.
- Lu Y, Cai Z, Xiao G, Liu Y, Keller ET, Yao Z and Zhang J (2007) CCR2 expression correlates with prostate cancer progression. *J Cell Biochem* 101(3):676-85.
- Luboshits G, Shina S, Kaplan O, Engelberg S, Nass D, Lifshitz-Mercer B, Chaitchik S, Keydar I and Ben-Baruch A (1999) Elevated expression of the CC chemokine regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in advanced breast carcinoma. *Cancer Res* 59:4681–4687.
- Luster AD (1998) Chemokines - chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338:436-445.
- Mackay CR (1997) Chemokines: what chemokine is that? *Curr Biol* 7:384-386.
- Macoska JA (2011) Chemokines and BPH/LUTS. *Differentiation* 82(4-5):253-60.
- Magnani M, Castro-Gomez RH, Aoki MN, Gregório EP, Libos F, Morimoto HK, Reiche EM and Watanabe MA (2011) Analysis of peripheral T cells and the CC chemokine receptor (CCR5) delta32 polymorphism in prostate cancer patients treated with carboxymethyl-glucan (CM-G). *Nat Prod Res* Aug 9. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1080/14786419.2010.535159.
- Mañes S, Mira E, Colomer R, Montero S, Real LM, Gómez-Moutón C, Jiménez-Baranda S, Garzón A, Lacalle RA, Harshman K, Ruíz A and Martínez-A C (2003) CCR5 expression influences the progression of human breast cancer in a p53-dependent manner. *J Exp Med* 198:1381–1389.
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P and Sica A (2002) Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 23:549–55.
- McNeal JE (1988) Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol* 12(8):619–33.
- McNeal, J. (1990) Pathology of benign prostatic hyperplasia. Insight into etiology. *Urol Clin North Am* 17:477.
- McNicholl JM, Smith DK, Qari SH and Hodge T (1997) Host genes and HIV: the role of the chemokine receptor gene CCR5 and its allele. *Emerg Infect Dis* 3(3): 261–271.
- Moll NM, Cossoy MB, Fisher E, Staugaitis SM, Tucky BH, Rietsch AM, Chang A, Fox RJ, Trapp BD and Ransohoff RM (2009) Imaging correlates of leukocyte accumulation and CXCR4/CXCL12 in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 66:44–53.
- Monti P, Leone BE, Marchesi F, Balzano G, Zerbi A, Scaltrini F, Pasquali C, Calori G, Pessi F, Sperti C, Di Carlo V, Allavena P and Piemonti L (2003) The CC chemokine MCP-1/CCL2 in pancreatic cancer progression:

- regulation of expression and potential mechanisms of antimalignant activity. *Cancer Res* 63:7451–61.
- Moreira AP, Cavassani KA, Massafera Tristao FS, Campanelli AP, Martinez R, Rossi MA and Silva JS (2008) CCR5-dependent regulatory T cell migration mediates fungal survival and severe immunosuppression. *J Immunol* 180(5):3049–3056.
- Mummidi S, Ahuja SS, Gonzalez E, Anderson SA, Santiago EN, Stephan KT, Craig FE, O'Connell P, Tryon V, Clark RA, Dolan MJ and Ahuja SK (1998) Genealogy of the CCR5 locus and chemokines system gene variants associated with altered rates of HIV-1 disease progression. *Nat Med* 4(7):786–93.
- Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ and Power CA (2000) International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Ver* 52(1):145-76.
- Murphy P (2001) Chemokines and molecular basis of cancer metastasis. *N Engl J Med* 354:833–835.
- Nakayama EE, Tanaka Y, Nagai Y, Iwamoto A and Shioda T (2004) A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform. *AIDS* 18(5):729–738.
- Narter KF, Agachan B, Sozen S, Cincin ZB and Isbir T (2010) CCR2-64I is a risk factor for development of bladder cancer. *Genet Mol Res* 9(2):685-692.
- Navratilova Z (2006) Polymorphisms in CCL2&CCL5 chemokines/chemokine receptors genes and their association with diseases. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 150(2):191–204.
- Nelson WG, De Marzo AM and Isaacs WB (2003) Prostate cancer. *N Engl J Med* 349:366-381.
- Nelson WG, De Marzo AM, DeWeese TL and Isaacs WB (2004) The role of inflammation in the pathogenesis of prostate cancer. *J Urol* 172:S6–S12.
- Nesbit M, Schaid H, Miller TH and Herlyn M (2001) Low-level monocyte chemoattractant protein-1 stimulation of monocytes leads to tumor formation in nontumorigenic melanoma cells. *J Immunol* 166:6483–90.
- Nibbs RJ, Yang J, Landau NR, Mao JH and Graham GJ (1999) LD78beta, a non-allelic variant of human MIP-1alpha (LD78alpha), has enhanced receptor interactions and potent HIV suppressive activity. *J Biol Chem* 274:17478–17483.
- Niwa Y, Akamatsu H, Niwa H, Sumi H, Ozaki Y and Abe A (2001) Correlation of tissue and plasma RANTES levels with disease course in patients with breast or cervical cancer. *Clin Cancer Res* 7:285–289.
- Payne AS and Cornelius LA (2002) The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis. *J Invest Dermatol* 118:915–922.
- Petersen DC, Severi G, Hoang HN, Padilla EJ, Southey MC, English DR, Hopper JL, Giles GG and Hayes VM (2008) No association between common chemokine and chemokine receptor gene variants and prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17(12):3615–3617.
- Prado IS (2010) Sintomas estressantes e qualidade de vida entre homens com câncer. Dissertação de mestrado, Belo Horizonte, UFMG.

- Prahalad S (2006) Negative association between the chemokine receptor CCR5-delta32 polymorphism and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Genes Immun* 7(3):264-8.
- Prest SJ, Rees RC, Murdoch C, Marshall JF, Cooper PA, Bibby M, Li G and Ali SA (1999) Chemokines induce the cellular migration of MCF-7 human breast carcinoma cells: subpopulations of tumour cells display positive and negative chemotaxis and differential *in vivo* growth potentials. *Clin Exp Metastasis* 17:389–396.
- Qin S, Rottman JB, Myers P, Kassam N, Weinblatt M, Loetscher M, Koch AE, Moser B and Mackay CR (1998) The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* 101:746–54.
- Rajagopalan L and Rajarathnam K (2006) Structural basis of chemokine receptor function--a model for binding affinity and ligand selectivity. *Biosci Rep* 26, 325-339.
- Raman D, Baugher PJ, Thu YM and Ann Richmond (2007) Role of chemokines in tumor growth. *Cancer Lett* 256(2):137–165.
- Raport CJ, Gosling J, Schweickart VL, Gray PW and Charo IF (1996) Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1a, and MIP-1b. *J Biol Chem* 271:17161–17166.
- Reiter RE and Kernion JB (2002) Epidemiology, etiology and prevention of prostate cancer. In: Walsh: Campbell's Urology, 8th edition: WB Saunders p. 3002-3003.
- Rollins BJ (1997) Chemokines. *Blood* 90:909-928.
- Rossi D and Zlotnik A (2000) The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18:217-242.
- Rostene W, Kitabgi P and Parsadaniantz SM (2007) Chemokines: a new class of neuromodulator? *Nat Rev Neurosci* 8:895–903.
- Saenz-Lopez P, Carretero R, Cozar JM, Romero JM, Canton J, Vilchez JR, Tallada M, Garrido F and Ruiz-Cabello F (2008) Genetic polymorphisms of RANTES, IL1-A, MCP-1 and TNF-A genes in patients with prostate cancer. *BMC Cancer* 8:382.
- Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T and Ono M (2008) Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133(5):775-87.
- Salamonsen LA, Hannan NJ and Dimitriadis E (2007) Cytokines and chemokines during human embryo implantation: roles in implantation and early placentation. *Semin Reprod Med* 25:437–444.
- Sampson N, Madersbacher S and Berger P (2008) Pathophysiologie und Therapie der benignen Prostata-Hyperplasie. *Wien Klin Wochenschr* 120(13-14):390-401.
- Samson M, Labbe O, Mollereau C, Vassart G and Parmentier M (1996a) Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. *Biochemistry* 35:3362–3367
- Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cognaux J, Forceille C, Muyldermans G, Verhofstede C, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Doms RW, Vassart G and Parmentier M (1996b) Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382(6593):722-5.

- Sanders SK, Crean SM, Boxer PA, Kellner D, LaRosa GJ and Hunt SW 3rd (2000) Functional differences between monocyte chemoattractant protein-1 receptor A and monocyte chemoattractant protein-1 receptor B expressed in a Jurkat T cell. *J Immunol* 165(9):4877–4883.
- Satoh T, Saika T, Ebara S, Kusaka N, Timme TL, Yang G, Wang J, Mouraviev V, Cao G, Fattah el MA and Thompson TC (2003) Macrophages Transduced with an Adenoviral Vector Expressing Interleukin 12 Suppress Tumor Growth and Metastasis in a Preclinical Metastatic Prostate Cancer Model. *Cancer Res* 63(22):7853–60.
- Sciarra A, Di Silverio F, Salciccia S, Autran Gomez AM, Gentilucci A and Gentile V (2007) Inflammation and chronic prostatic diseases: evidence for a link? *Eur Urol* 52 (4):964–72.
- Shabbir M, Mumtaz FH (2004) Benign prostatic hyperplasia. *J R Soc Promot Health* 124(5):222-7.
- Shimizu Y, Dobashi K, Endou K, Ono A, Yanagitani N, Utsugi M, Sano T, Ishizuka T, Shimizu K, Tanaka S and Mori M (2010) Decreased interstitial FOXP3+ lymphocytes in usual interstitial pneumonia with discrepancy of CXCL12/CXCR4 axis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 23(2):449-61.
- Slettenaar VI and Wilson JL (2006) The chemokine network: a target in cancer biology? *Adv Drug Deliv Rev* 58(8):962-974.
- Smith MW, Carrington M, Winkler C, Lomb D, Dean M, Huttley G and O'Brien SJ (1997) CCR2 chemokine receptor and AIDS progression. *Nat Med* 3:1052-1053.
- Srivastava A, Pandey SN, Choudhuri G and Mittal B (2008) CCR5 Delta32 Polymorphism: Associated with Gallbladder Cancer Susceptibility. *Scand J Immunol* 67(5):516–522.
- Struyf S, Proost P and Van Damme J (2003) Regulation of the immune response by the interaction of chemokines and proteases. *Adv Immunol* 81:1-44.
- Tan MC, Goedegebuure PS, Belt BA, Flaherty B, Sankpal N, Gillanders WE, Eberlein TJ, Hsieh CS and Linehan DC (2009) Disruption of CCR5-dependent homing of regulatory T cells inhibits tumor growth in a murine model of pancreatic cancer. *J Immunol* 182(3):1746–1755.
- Tang J and Yang J (2009) Etiopathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Indian J Urol* 25(3):312–317.
- Ueno T, Toi M, Saji H, Muta M, Bando H, Kuroi K, Koike M, Inadera H and Matsushima K (2000) Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, survival in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 6:3282–3289.
- Vaday GG, Peehl DM, Kadam PA and Lawrence DM (2006) Expression of CCL5 (RANTES) and CCR5 in prostate cancer. *The Prostate* 66:124-134.
- Van de Broek I, Leleu X, Schots R, Facon T, Vanderkerken K, Van Camp B and Van Riet I (2006) Clinical significance of chemokine receptor (CCR1, CCR2 and CXCR4) expression in human myeloma cells: the association with disease activity and survival. *Haematologica* 91:200–206.
- Vandercappellen J, Van Damme J and Struyf S (2008) The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett* 267:226-244.
- Vargas AE, Marrero AR, Salzano FM, Bortolini MC and Chies JAB (2006) Frequency of CCR5delta32 in Brazilian populations. *Braz J Med Biol Res* 39:321-325.

- Vicari AP and Caux C (2002) Chemokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 13:143-154.
- Vindrieux D, Escobar P and Lazennec G (2009) Emerging roles of chemokines in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 16(3):663-73.
- Vykhovanets EV, Resnick MI and Marengo SR (2005) The healthy rat prostate contains high levels of natural killer-like cells and unique subsets of CD4+ helper inducer T cells: Implications for prostatitis. *J Urol* 173(3):1004-10.
- Watanabe MAE, Oda JMM, Amarante MK and Voltarelli JC (2010) Regulatory T cells and breast cancer: implications for immunopathogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 29(4):569-79.
- Weinberg, RA (2008) *A biologia do câncer*. 1ª edição. Artmed, Porto Alegre, 844 pp.
- Woodward JK, Elshaw SR, Murray AK, Nichols CE, Cross N, Laws D, Rennie IG and Sisley K (2002) Stimulation and inhibition of uveal melanoma invasion by HGF, GRO, IL1alpha and TGFbeta. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:3144–3152.
- Yang ZZ and Ansell SM (2009) The role of Treg cells in the cancer immunological response. *Am J Immunol* 5:17–28.
- Yeh CB, Tsai HT, Chen YC, Kuo WH, Chen TY, Hsieh YH, Chou MC and Yang SF (2010) Genetic polymorphism of CCR2-64I increased the susceptibility of hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol* 102(3):264-70.
- Yoshie O, Imai T and Nomiyama H (2001) Chemokines in immunity. *Adv Immunol* 78:57-110.
- Zabel BA, Zuniga L, Ohyama T, Allen SJ, Cichy J, Handel TM and Butcher EC (2006) Chemoattractants, extracellular proteases, the integrated host defense response. *Exp Hematol* 34:1021–1032.
- Zafiropoulos A, Crikas N, Passam AM and Spandidos DA (2004) Significant involvement of CCR2-64I and CXCL12-3a in the development of sporadic breast cancer. *J Med Genet* 41(5):e59.
- Zhang J, Lu Y and Pienta KJ (2010a) Multiple roles of chemokine (C-C motif) ligand 2 in promoting prostate cancer growth. *J Natl Cancer Inst* 102(8):522-8.
- Zhang J, Patel L and Pienta KJ (2010b) CC chemokine ligand 2 (CCL2) promotes prostate cancer tumorigenesis and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev* 21(1):41-8.
- Zhang X, Haney KM, Richardson AC, Wilson E, Gewirtz DA, Ware JL, Zehner ZE and Zhang Y (2010c) Anibamine, a natural product CCR5 antagonist, as a novel lead for the development of anti-prostate cancer agents. *Bioorg Med Chem Lett* 20(15):4627-30.
- Zhao Q (2010) Dual targeting of CCR2 and CCR5: therapeutic potential for immunologic and cardiovascular diseases. *J Leukoc Biol* 88(1):41-55.
- Zlotnick A, Yoshie O and Nomiyama H (2006) The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biology* 7:243.