



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

VÂNIA CRISTINA COSTA DE VASCONCELOS LIMA CARVALHO

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS *CCR2-Val64Ile* E *CCR5-Δ32*
COM A SUSCEPTIBILIDADE E A AGRESSIVIDADE DO CÂNCER DE
PRÓSTATA NA POPULAÇÃO DO PIAUÍ – BRASIL**

**PARNAÍBA – PI
MARÇO – 2016**

VÂNIA CRISTINA COSTA DE VASCONCELOS LIMA CARVALHO

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS *CCR2-Val64Ile* E *CCR5-Δ32*
COM A SUSCEPTIBILIDADE E A AGRESSIVIDADE DO CÂNCER DE
PRÓSTATA NA POPULAÇÃO DO PIAUÍ – BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Área de concentração: Medicina Investigativa e Marcadores Epidemiológicos.

Linha de Pesquisa: Genética Humana e Médica.

Orientador: Prof. Dr. Giovanny Rebouças Pinto

PARNAÍBA – PI

MARÇO – 2016

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba
Serviço de Processamento Técnico

C331e Carvalho, Vânia Cristina Costa de Vasconcelos Lima.

Estudo de associação dos polimorfismos *CCR2-Val64Ile* E *CCR5-Δ32* com a susceptibilidade e a agressividade do câncer de próstata na população do Piauí - Brasil [manuscrito] / Vânia Cristina Costa de Vasconcelos Lima Carvalho. – 2016.

44 f. : il. color.

Impresso por computador (printout).

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Federal do Piauí, 2016.

Orientação: Prof. Dr. Giovanny Rebouças Pinto.

1. Câncer de Próstata. 2. Quimiocinas. 3. Neoplasia de Próstata. 4. Estadiamento de Neoplasias. 5. Gene CCR2. 6. Gene CCR5. I. Título.

CDD: 616.65

VÂNIA CRISTINA COSTA DE VASCONCELOS LIMA CARVALHO

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS *CCR2-Val64Ile* E *CCR5-Δ32*
COM A SUSCEPTIBILIDADE E A AGRESSIVIDADE DO CÂNCER DE
PRÓSTATA NA POPULAÇÃO DO PIAUÍ – BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

APROVADA EM ___/___/___

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a Renata Canalle - UFPI

Prof^a. Dr^a France Keiko Nascimento Yoshioka - UFPI

Prof. Dr. Giovanni Rebouças Pinto

UFPI

(Orientador)

PARNAÍBA – PI
MARÇO – 2016

DEDICATÓRIA

“O serralheiro não sabia, o ato da criação, como é potente, na coisa criada se prolonga, ressoante...”

Carlos Drummond de Andrade

Dedico este trabalho a Deus, que me deu vida, aos meus mestres, que me mostraram os caminhos, aos meus pais que me deram curiosidade, à minha família, que me incentivou, aos meus amigos, que me acolheram, ao meu marido, que me deu paciência e à minha filha, que soube sonhar comigo outros sonhos e viveu, comigo, todas as alegrias e ausências necessárias para que eu pudesse realizar este passo.

AGRADECIMENTOS

Michel Ende, em seu livro História Sem Fim, diz que, “... não é necessário apenas querer sair de onde se está para chegar a algum lugar. É preciso saber aonde se quer chegar”. Creio que não foi desta forma que cheguei até aqui, senão pela vontade de Deus e é por Ele que começo meus agradecimentos. Vamos aos fatos:

No ano de 1932, retirantes da seca e da falta de oportunidades em Crateús-Ceará, vieram parar em Theresina, o Sr. Mariano, meu bisavô, já viúvo, com seus 5 filhos, deixando para trás a filha mais nova, Carminha. De lá para cá, após muitas peripécias, quis o destino que meus pais, Maria de Lourdes da Costa e Ary de Vasconcelos Lima primos legítimos, de filhos do Sr. Mariano, se apaixonassem.

Ela se dizia apaixonada desde que o primo começou a passar para tomar água em sua casa, vindo do Liceu Piauiense. Segundo ela, esperou até completar 14 anos para se casar, mas não sem antes provocar grande confusão entre irmãos. À época tinha 7 anos. Casamento de primos... não isso não podia dar boa coisa. Mas meu avô, Waldemar Vieira Lima, ponderou que era melhor que se casassem antes que acontecesse coisa muito pior. Não convinha explicar o que era o temido pior. A esta altura, minha mãe já tinha perdido o pai para uma doença do coração e a mãe, jovem viúva, lutava para sobreviver com uma pensão, uma casa e quatro filhas moças. Note-se que minha mãe já demonstrava persistência e amor infinitos. Grata, profundamente aos esperançosos refugiados da seca que reiniciaram sua história aqui no Piauí.

Agradeço ao meu pai, que acreditou que deveria estudar para alcançar algo que ele nem sabia bem o que era, mas que só viria por meio dos estudos. Veio a ser, via concurso público, funcionário da Caixa Econômica Federal até se aposentar e formou-se em Economia. Hoje, mestre, está dando aulas.

Dinha, como minha mãe é conhecida, formou-se em Filosofia. Nada mais justo, após formar os filhos, foi realizar seu sonho. Como é persistente, minha mãezinha. Continua ajudando os filhos, agora com mais sabedoria que nunca. Rege a todos e não aceita deslizes. Confesso que se não fosse por ela, não teria insistido em entrar para o mestrado da UFPI. Obrigada mais uma vez.

Meus cinco irmãos, meus companheiros de infância, queridos concorrentes pelos carinhos dos nossos pais. Precisei me esforçar muito para chamar atenção. Minha irmã Virgínia, linda, inteligentíssima, orgulho da família. Meu irmão Júnior, sempre com uma ideia original e uma certeza inabalável. Marcelo, esperançoso, apaixonado, em busca de dias melhores como funcionário público. Régis, ainda à procura e um lugar ao sol, companhia inquestionável dos meus pais. Quanto ao Sérgio, o mais jovem, o mais mimado, apaixonado por aviões e eterno insatisfeito com o emprego em que se encontra. Vive passando em concursos. Ainda bem que aprendi muito cedo a buscar meu caminho. Todos eles me ajudaram.

Chegando ao mestrado, me deparei com outra família. Já acostumada com exigência, vi extrapolar o quesito alta performance. Meus colegas de turma, todos mais jovens, recentemente egressos dos bancos de Universidade, me mostraram que aqui se pode especular, desde que se tenha um referencial teórico robusto como apoio. A Vanessa, crente que o futuro é bem aí. Levando todos a pensar maior. Só precisamos de coragem, bolas! O Antônio Carlos, poeta das Biomédicas, defensor de todos, o mais esperado. Moara, sorriso perfeito, sincero, acolhedor, fraterno. Mas não se enganem, ela é fera. Que sorte, a do Heitor! Sarah, quantas idas e vindas, quanta força, em uma menina tão delicada, um olhar para fora e outro para dentro. Edmar, o chefe dos encontros científicos. Pessoa disposta, de bem com a vida, tranquilo. Como não ficar fã dele? Rayelle, professora desde menina. É ficar por perto e sentir a segurança de que vai dar tudo certo. É fácil... parece. Ela já sabe tudo. Veio só pra dar uma força. Amigos de sala de aula e de sufocos. Obrigada, sempre.

E vamos ao laboratório. Máquinas frias, silenciosas (algumas nem tanto), congeladores, pipetas, vidrarias, lâminas, eletroforese, alta precisão. Em meio a tudo isso, o Hygor, a Hyanne, o Augusto, o Anderson, a Valéria. Começo pelo Hygor, meu professor desde a primeira tentativa de entrar no programa de mestrado. Humilde, sério, sereno, disposto a investigar cada detalhe que não estivesse no padrão. Meu primeiro contato com o mundo da pesquisa foi apresentado por ele e pareceu simples. Até o dia seguinte. Já com a Hyanne, foi mais tranquilo. Talvez por ela não estar na mesma equipe que eu. Pensei que o trabalho dela era mais fácil, até entender que fez todos os procedimentos que eu precisava fazer, mas fez sozinha. Mas, é irmã do Hygor, então tem a genética da paz de espírito. Augusto, residente do laboratório, atento a todos os experimentos, participando de

todas as discussões, mesmo as mais insólitas. Só poderia dar no que deu, foi parar no Rio Grande do Sul. Parar é jeito de dizer, que ele não vai parar nunca. Valéria, minha amiga oculta, por natureza, uma gladiadora. Competente, espirituosa, experiente, estudiosa. Todos os caminhos a levam ao sucesso. Por último, o Anderson. Meu amigo e colaborador. Jamais me esquecerei das histórias e da paciência com que Deus o abençoou. Ele me mostrou o quanto é fácil lidar com situações difíceis. É só decidir e pronto. Sem dúvida. Entendeu? Buscar é o caminho. Ele já é mestre nisso. Sei que não vou conseguir agradecer à altura, então fica meu abraço fraterno e sincero. Esta foi a maior experiência de todas.

Chegamos aos professores. Caríssimos professores. Se eu já tinha admiração por esta classe, agora tenho verdadeira devoção. Meu pai já tinha me dito que o melhor de ser professor é ver o momento em que o aluno entendeu. Mas sei que por baixo dessa desculpa, são ultra-humanos mesmo. Fazer alguém entender é uma missão árdua, e eles nem parecem perceber isto. É natural. O que os incomoda, é alguém que não quer entender, mas, enquanto houver um interessado, ali haverá um professor ávido por agir. Eu, mesma não me atrevi, ainda, a provar desta poção. Mesmo sabendo que ela oferece superpoderes.

Vou citar apenas um, meu orientador. Professor Doutor, Coordenador, casado com a professora Doutora Keiko (que é um título à parte). Pacientemente, esperou que eu compreendesse cada etapa do processo de execução do trabalho. Depois leu crítica e meticulosamente cada frase que escrevi, reexplicou todos os fundamentos que eu precisava conhecer, sugeriu várias alterações (prontamente acatadas, claro). Depois disso avaliou e acreditou no que estava dito ali. Realmente, ali mora um Professor. Conhecendo todas as dificuldades da aprendiz, ele acreditou. Por isto, serei, para sempre, grata.

Permeando tudo isto (minha vida que se tornou paralela), vou aqui citar pessoas cuja participação também foi fundamental. Meus chefes na Central de Regulação e Auditoria do SUS, Wendel Fabriny Ribeiro Sales e Adriane Saraiva Nunes. Movidos por forte interesse científico, me apoiaram nos momentos mais críticos. Aos laboratórios que, sem retorno financeiro, permitiram nossa presença e contribuíram com nossa pesquisa. Cito os doutores Álvaro Regino e Mário Abel Lima Barros.

Agradeço às instituições CAPES, FAPEPI e UFPI, que fomentaram a pesquisa, disponibilizando estrutura física, recursos financeiros e humanos. Instituições como a

Sociedade de Proteção ao Câncer e Prefeitura Municipal de Parnaíba foram fundamentais para a obtenção de amostras que resultaram no nosso trabalho.

Preciso, ainda, agradecer a duas pessoas que me acompanharam neste percurso. Uma delas, José Carlos de Araújo Carvalho, eu escolhi. Escolhi, porém, sem saber as consequências. E me enganei. Onde eu achei que haveria, rigidez, encontrei pouso suave e noites tranquilas. Onde imaginei que veria insensatez, encontrei a calma e a ponderação equilibrada. Onde pensei que poderia encontrar oposição, encontrei cumplicidade. E neste casamento do qual fui, por dois anos, coadjuvante, percebi que o amor vai superando as desigualdades e se reconstruindo a cada novo dia, com respeito e admiração.

A outra pessoa, sempre amei, mesmo antes de conhecer. Ela é um pouco de mim e eu sou um pouco dela. Segundo o que me disseram, 50%, mas tenho minhas dúvidas. Pois é para ela todo o meu desvelo. Só posso ir aonde ela puder me acompanhar. Se ela ficar, eu também fico. Então, tenho que ir longe. Assim, ela vai acreditar que também pode. Mariana, minha princesa, minha paixão, meu sonho.

J. K. Rolling escreveu um diálogo em que o mago professor Dumbledore e Harry Potter conversam. No livro, Potter pergunta:“-Será que isto está acontecendo só na minha cabeça ou é realidade?”, ao que o amigo responde:”-Está acontecendo na sua cabeça. Mas por que não seria realidade?”.

A verdade é que, hoje eu nem sei mais quem eu seria se não tivesse passado pela experiência da pesquisa. Sinto-me renovada na minha atividade-fim. Acredito que posso contribuir de forma mais efetiva para o progresso dos que ficam sob meus cuidados. Sinto uma vontade ainda maior de servir. Olhando para trás é que percebo que este trabalho teve contribuição de pessoas que, sem saber, mudaram o rumo de muitas vidas. E eu apenas posso agradecer a todas estas pessoas. Mesmo as que não estão mais entre nós. E, se tudo começou com o Sr. Mariano, aqui, a meu ver, vai continuando com a Mariana.

Ao final de tudo, o reinício. Obrigada ao Senhor

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2.REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1. Envelhecimento e câncer.....	3
2.2. O Câncer de Próstata.....	4
2.3. Aspectos Moleculares do Câncer de Próstata.....	9
2.4. Os genes <i>CCR2</i> e <i>CCR5</i> e seus produtos proteicos	13
3.JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	17
3.1. Objetivo Geral	17
3.1.1. Objetivos Específicos.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1.Extração, quantificação e armazenamento do DNA	19
4.2.Amplificação e análise das regiões polimórficas.....	20
4.2.1.Análise do polimorfismo <i>CCR2-Val64Ile</i>	20
4.2.2.Análise do Polimorfismo <i>CCR5-Δ32</i>	22
4.3.Análise Estatística.....	23
5. RESULTADOS	25
6. DISCUSSÃO	31
7. CONCLUSÕES.....	38
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

RESUMO

O câncer de próstata (CaP), tem sido alvo de estudos com o objetivo de melhor entendimento das vias moleculares e fatores genéticos que influenciam a susceptibilidade, evolução e desfecho. O aumento da expectativa de vida da população, bem como as patologias que acometem a faixa etária de idosos tornaram-se tema de interesse mundial. Os homens representam uma parcela da população vulnerável do ponto de vista de intervenção em saúde, uma vez que apresentam mortalidade seis anos mais precoce que as mulheres. Entre as causas de morbidade e mortalidade neste grupo, o CaP figura como importante problema de saúde pública. Neste contexto, sobressaem-se as quimiocinas, que foram descritas como participantes no tráfico de células inflamatórias, sendo implicadas também no desenvolvimento do câncer e outras doenças de fundo inflamatório. Nas últimas décadas, as quimiocinas, e seu papel na evolução do câncer tem sido intensamente investigados. Entre estes, encontram-se os receptores CCR2 e CCR5, implicados, inicialmente no tráfico de células inflamatórias e atualmente no desenvolvimento do câncer de várias origens. Nosso estudo busca verificar associação entre o câncer de próstata e a presença dos polimorfismos genéticos *CCR2-Val64Ile* e *CCR5-Δ32* em uma população no Estado do Piauí-Brasil, avaliando a associação com a susceptibilidade ao mesmo, PSA ao diagnóstico, estadiamento tumoral, escore de Gleason e agressividade. Também foi testada a presença de desequilíbrio de ligação entre os genes. O desenho do estudo constituiu-se de caso-controle, dispondo-se de uma amostra de 185 casos de câncer de próstata e 185 controles. Os 185 indivíduos do grupo caso tiveram suas amostras de tumor (após prostatectomia ou biópsia) ou sangue periférico genotipados para verificar a ocorrência ou não dos polimorfismos de interesse. Os 185 indivíduos do grupo controle tiveram amostras de sangue periférico genotipadas quanto aos polimorfismos em estudo. Os casos e os controles foram comparados em relação à presença do polimorfismo. Os dados foram submetidos a avaliação estatística, utilizando-se qui-quadrado. Observamos desequilíbrio de ligação moderado entre os genes avaliados ($D' = 0,559$; $r^2 = 0,001$). Não se observou associação entre a ocorrência de câncer de próstata e a presença dos polimorfismos *CCR2-Val64Ile* (OR=0,89; 95% IC=0,56-1,41; $p=0,70$ para o genótipo Val/Ile; OR=1,39; 95% IC=0,28-5,83; $p=0,95$ para o genótipo Ile/Ile) e *CCR5-Δ32* (OR=0,48; 95% IC=0,19-1,22; $p=0,18$). Não foram observadas associações da presença dos polimorfismos com susceptibilidade ao CaP nem com agressividade para *CCR2-Val64Ile* (OR=1,45; 95% IC=0,69-3,02; $p=0,40$ para PSA ≥ 20 , OR=0,59; 95% IC=0,26-1,36; $p=0,29$ para TNM com tumor $\geq 2Tc$ e OR=1,21; 95% IC=0,61-2,43; $p=0,71$ para escore de Gleason), nem para *CCR5-Δ32* (OR=1,01; 95% IC=0,22-4,68; $p=0,7$ para PSA e OR=3,21; 95% IC=0,39-27,32; $p=0,47$ para escore de Gleason). Nossos resultados não revelaram associação entre os polimorfismos *CCR2-Val64Ile* e *CCR5-Δ32* e CaP em uma população no Nordeste do Brasil. Efeito preditor de melhor prognóstico de *CCR5-Δ32* poderá ser avaliado em amostra com maior número de indivíduos.

Palavras-Chave: quimiocinas. neoplasia de próstata. estadiamento de neoplasias.

1. INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida ocorreu em todo o mundo ao longo do último século. Doenças crônicas e degenerativas mostraram, paralelamente, grande aumento de incidência relacionadas à faixa etária mais elevada, influenciando decisivamente a qualidade de vida, bem como as causas de mortalidade. A parcela masculina da população mostrou ser mais vulnerável, uma vez que apresenta expectativa de vida reduzida em 6 anos em comparação com as mulheres. Entre as causas de mortalidade que acometem os homens encontra-se o câncer de próstata (CaP), que em geral atinge homens de mais de 60 anos, tem evolução insidiosa e varia em relação ao padrão histológico e gravidade.

Entre os fatores usados para estratificar o risco ligado à evolução do CaP destacaram-se a concentração plasmática do antígeno prostático específico (PSA do Inglês *prostatic specific antigen*), avaliação histopatológica, pelo escore de Gleason e estadiamento tumoral baseado na caracterização do tumor, nódulo e metástase (escore TNM). Estes parâmetros são mensurados para identificação do risco de recidiva após prostatectomia e gravidade, permitindo aos assistentes direcionar a terapêutica e acessar prognóstico individualmente.

O campo da imunologia do câncer se desenvolveu muito, a partir de tecnologias mais precisas de observação da biologia celular. Isto permitiu importantes avanços na compreensão do processo oncogênico. A percepção de que o desenvolvimento do câncer ocorre em um contexto imunológico que influencia na progressão e desfecho levou ao desenvolvimento de várias terapias específicas.

Em meio a este cenário, foram descobertas as citocinas, pequenas moléculas relacionadas, inicialmente, com o tráfico de leucócitos. Nas últimas décadas, muito se tem compreendido sobre a participação de citocinas e seus receptores no câncer. Dentre os receptores, destacam-se as proteínas *chemokine (C-C motif) receptor 2 (CCR2)* e 5 (*CCR5*), cujos genes homônimos localizam-se na mesma região cromossômica, 3p21. Os polimorfismos *CCR2-Val64Ile* e *CCR5-Δ32* foram descritos como importantes influências sobre doenças de base inflamatória e estão em desequilíbrio de ligação. As ligações entre receptor e citocina são inespecíficas, portanto um único receptor pode se ligar a mais de um ligante, com diferença de afinidades entre eles. Diante da redundância de ligações,

observa-se que a resposta inflamatória que prevalece pode variar mediante ocorrência de polimorfismos genéticos nesses receptores.

A evolução do conhecimento sobre as características determinadas geneticamente permitiu estudar os efeitos populacionais de diferenças ligadas a pequenas alterações no código genético. O DNA, junto com influências ambientais, é responsável pelo padrão de produção proteica de um organismo, determinando a expressão de mecanismos/vias que estão intrinsecamente associadas à evolução do câncer. Esta relação de causa e efeito constitui-se no pilar da medicina personalizada. A modificação da expressão gênica pode alterar a susceptibilidade a patologias, a evolução individual, identificar a terapêutica mais adequada assim como os efeitos colaterais apresentados. Portanto, conhecer o perfil genético populacional e individual tem se mostrado uma ferramenta essencial na tomada de decisões em Medicina.

Por este motivo, neste estudo foi investigada a associação dos polimorfismos *CCR2-Val64Ile* e *CCR5-Δ32* em uma população do Estado do Piauí, em busca de alterações na frequência e no padrão de evolução do CaP.

Análises integradas de dados em rede permitiram acessar mecanismos moleculares que sustentam a progressão e recorrência do câncer colorretal. Acreditamos que o mesmo modelo poderia ser utilizado em relação ao CaP, desde que conhecidos vários dados que interferem no seu desencadeamento, progressão, resposta às terapêuticas disponíveis e desfecho. Nossa contribuição seria, portanto, um dos elementos a constituir esta ferramenta.

2.REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Envelhecimento e câncer

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que, entre 2010 e 2050, a proporção da população mundial acima de 60 anos aumentará de 11% para 22%. Esta mudança de perfil etário populacional tem ocorrido cada vez mais rapidamente. Enquanto países como a França e Suécia levaram mais de 100 anos para elevar de 7 para 14% a percentagem de idosos na população, países como o Brasil, China e Tailândia, levaram apenas 20 anos. Tal fenômeno ocorre uma vez que, à medida que um país se desenvolve, caem as taxas de fertilidade, de mortalidade, bem como se observa mais acesso aos cuidados de saúde (WHO, 2012).

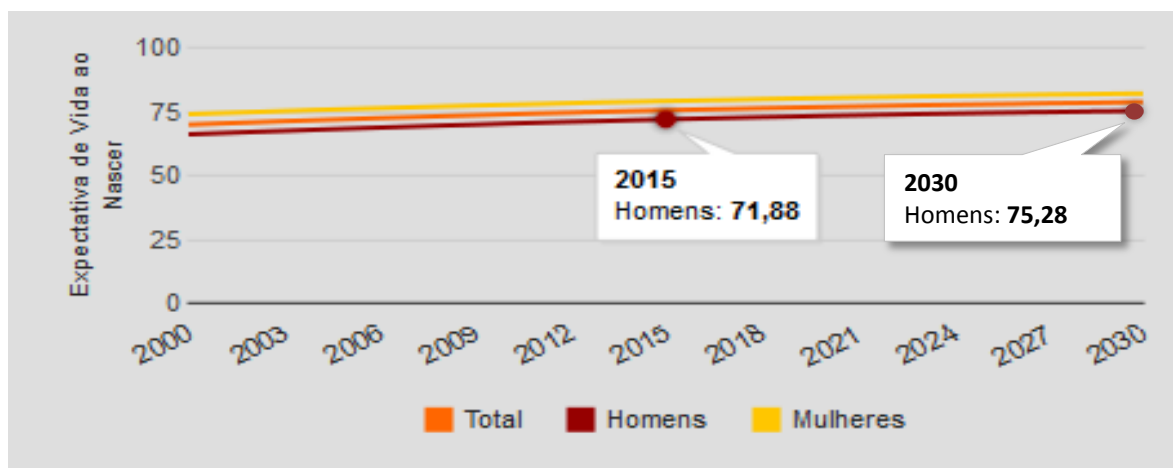
Estatísticas mundiais mostram que as pessoas mais velhas morrem de doenças não contagiosas, como doenças cardíacas, câncer e diabetes. Observa-se, ainda que homens vivem, em média, 6 anos menos que mulheres (OMS, 2012). A sobrevivência total de pacientes com CaP em cinco anos em todo o mundo varia, conforme o país, de 40 até 95%. Homens diagnosticados de 2005-2009 a sobreviveram foi 90% ou maior em países como Áustria, Bélgica, Brasil, Canadá, Chipre, Equador, Finlândia, França, Alemanha, Israel, Itália, Lituânia, Porto Rico e EUA. Na Líbia e Mongólia, a sobrevivência em cinco anos foi de 40 e 41%, respectivamente. O aumento observado na sobrevivência variou de 10 a 20% em 22 países na América do Sul, Ásia e Europa (ALLEMANI, 2014).

A migração de populações de zonas rurais para urbanas, mudança do estilo de vida, incremento das medidas de saúde preventiva, bem como a facilitação de acesso aos cuidados médicos têm sido responsáveis pela detecção de maior número de casos de CaP na Índia. Acredita-se que tais facilidades tenham levado países em desenvolvimento a apresentar taxas de incidência desta patologia próximas às de países ocidentais (JAIN; SAXENA; KUMAR, 2014).

Embora a previsão de queda da taxa de mortalidade por câncer tenha sido observada ao longo dos anos (1975-2010), o número total de óbitos por esta causa ainda vem crescendo, mesmo com os avanços obtidos em diagnóstico e tratamento. Tal comportamento se justifica, também, pela modificação dos padrões populacionais subjacentes, principalmente o envelhecimento (WEIR et al., 2015).

O Brasil apresenta aumento progressivo na expectativa de vida ao nascer, acompanhando a estimativa mundial, bem como mantém a diferença já mencionada entre as populações masculina e feminina (Gráfico 1) (IBGE, 2014).

Gráfico 1. Expectativa de vida ao nascer no Brasil (IBGE, 2014).



Em estudo realizado entre 1980 e 2006 mostrou-se que houve aumento de incidência e da mortalidade por CaP no Brasil. No mesmo estudo, detectou-se que nos municípios do interior das regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste tiveram aumento de incidência superior, duas vezes ou mais, quando comparados às capitais. É possível que este aumento reflita o acesso às opções diagnósticas e terapêuticas precoces mais facilitadas para os residentes em capitais (SILVA, et al., 2011). Em valores absolutos, o CaP é o sexto tipo de câncer mais comum e o mais prevalente em homens, representando cerca de 10% do total. Em países desenvolvidos, a taxa de incidência é cerca de 6 vezes maior em comparação aos países em desenvolvimento. Dentre as doenças malignas, o CaP é reconhecidamente, o segundo mais comum entre os homens no Brasil, sendo superado apenas pelo câncer de pele não-melanoma. A estimativa do número de CaP no Piauí, para 2014 foi de 790 novos casos, correspondendo a 49/100.000 homens (INCA, 2014).

2.2. O Câncer de Próstata

O câncer é uma patologia decorrente de alterações nos mecanismos de controle do ciclo celular, bem como alterações no microambiente em que se encontra. Tecidos cancerosos desregulam os sinais que preservam a manutenção da sua arquitetura e função.

Para isto, ocorre produção de fatores de crescimento e seus receptores, sinalização para o apoio das células do estroma, e expressão de receptores de interesse que se sobrepõem aos que regulariam as respostas de controle da homeostasia. Observa-se o favorecimento da transição epitélio-mesenquimal permitindo às células cancerosas invadirem tecidos diferentes do original bem como resistência à morte celular. Autofagia e apoptose podem ser modeladas no câncer, havendo pontos de intersecção entre os circuitos regulatórios da autofagia, apoptose e homeostasia. Estes pontos podem ser direcionados, conforme o estado fisiológico da célula. A necrose, caracterizada por intenso influxo de células imunológicas, promove angiogênese, proliferação celular e invasão (ALBERTS et al., 2010; HAHANAH e WEINBERG, 2011).

O microambiente tumoral tem grande influência no desenvolvimento e evolução cancerosa. As características marcantes do câncer são moduladas pela matriz extra-celular, devendo-se ter especial atenção a esta influência ao se desenvolverem terapêuticas, uma vez que o contexto genético a ser avaliado deve se estender aos elementos da matriz extra-celular e às linhagens de células que afluem para lá. Entre as interações a serem avaliadas encontram-se as que dizem respeito aos componentes do sistema imunológico infiltrados nas lesões. A associação da inflamação ao câncer já foi bem descrita e conta com a participação de quimiocinas, entre outros mediadores (HANAHAN e COUSSENS, 2011). Características genéticas podem ser determinantes na evolução do CaP. Sendo assim, evidenciar presença de polimorfismos associados à alteração de susceptibilidade ao CaP ou ao prognóstico dos indivíduos portadores, constitui-se em uma ferramenta promissora na assistência, com possível impacto em saúde pública.

Estudo realizado no Reino Unido, com 146.606 participantes, demonstrou que negros (africanos e caribenhos) são mais suscetíveis ao CaP que os brancos, chineses e sul-asiáticos o que reforça o papel da característica genética no desenvolvimento da doença. A diferença permaneceu mesmo após o ajuste para idade, características ambientais e estilo de vida e país de origem (MARUTHAPPU et al., 2015).

Os princípios de vigilância ativa foram descritos no *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN). Preocupados com o sobrediagnóstico e sobretratamento, os estudiosos deste grupo de pesquisa orientam que o perfil de risco do paciente, a idade e condições de saúde sejam considerados pelo paciente e seu médico assistente na indicação desta modalidade de acompanhamento. A abordagem preconiza que o paciente seja

acompanhado regularmente pela dosagem de PSA a cada 6 meses, toque retal a cada 12 meses, biópsia por agulha, conforme o resultado da primeira biópsia realizada (MOHLER et al., 2010).

Entre os objetivos do acompanhamento de pacientes com CaP encontra-se a identificação e o tratamento de homens com doença clinicamente significativa (COBELLI et al., 2013). A vigilância ativa, por sua vez, busca acompanhar os casos de CaP para diferenciar indivíduos que necessitam de tratamento agressivo dos que não necessitam. Estudo de associação realizado com pacientes em curso de vigilância ativa não encontrou relação entre a presença de história familiar e CaP. O achado, pode indicar que os escores de risco são pouco preditivos para indivíduos de baixo risco. Ressaltou, porém, que novas variantes genéticas podem ser descobertas, modificando tais resultados e implicando em novos estudos com este objetivo (CHEE et al., 2013).

A evolução do CaP é variável. Alguns tumores podem crescer de forma rápida, invadindo outros órgãos culminando com a morte do paciente. A grande maioria, porém, cresce de forma insidiosa (leva cerca de 15 anos para atingir 1 cm³), não chegando a dar sinais durante a vida e nem a ameaçar a saúde do homem (INCA, 2013).

O diagnóstico do CaP baseia-se em exame físico, por meio do toque retal, e biópsia, sendo auxiliado pela dosagem de PSA. Este último pode estar alterado em virtude de inflamações, trauma e hiperplasia prostática benigna (HEIDENREICH et al., 2013).

O PSA foi reconhecido em 1986 pelo FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*), passando a ser usado como auxiliar no acompanhamento de tratamentos de CaP. Em 1994, foi aceito como método diagnóstico (DUSKOVA e VESELY, 2014). Trata-se de uma proteína kaliceína com baixa atividade de quimiotripsina cuja função é fluidificar o ejaculado, tornando o ambiente mais propício para a motilidade dos espermatozoides. O aumento dos níveis de PSA sérico foi associado ao CaP e à sua gravidade. Um estudo conduzido na Suécia coletou e armazenou amostras de soro de 21.277 homens com idade entre 30 a 50 anos de 1974 a 1986. Em dezembro de 2006, os casos de câncer nesta população foram identificados. Os indivíduos diagnosticados com CaP tiveram suas dosagens de PSA verificadas a partir de amostras armazenadas em sorotecas de até 20 anos antes. A associação entre o PSA aos 50 anos ou antes e o diagnóstico subsequente de CaP, mostrou-se forte e altamente significativa (área sob a curva 0,719; 95% IC 0,704 – 0,73; $p < 0,0005$). A associação também se mostrou forte para cânceres diagnosticados mais de 25 anos após a coleta da amostra (LILJA, 2011).

O limite de PSA de 2,5 ng/mL foi adotado em 2005 pela OMS, tendo sido usado para discriminar grupos de vigilância acompanhados em protocolos de pesquisa. A efetividade da triagem de PSA foi avaliada na previsão da mortalidade por CaP. O *screening* de PSA mostrou mais benefícios quando se avaliaram resultados em prazo superior a 10 anos. Como o CaP é uma doença de história natural prolongada, o risco de sobrediagnóstico e sobretratamento devem ser considerados ao se realizar a dosagem do PSA como estratégia de rastreamento em idosos (HUGOSSON et al., 2010).

As atuais diretrizes relacionadas ao diagnóstico do CaP recomendam que a expectativa de vida seja levada em consideração na decisão quanto ao intervalo de realização de PSA (CARTER et al., 2013; HEIDENREICH et al., 2013). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) não recomenda o rastreamento de CaP em homens e orienta que os mesmos sejam esclarecidos antes de realizarem, no caso de demanda espontânea (INCA, 2002).

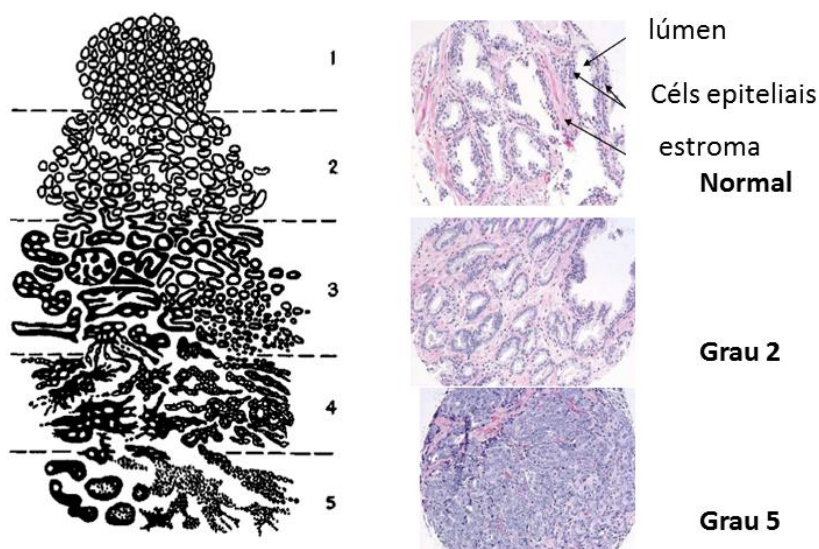
Dado o início insidioso e evolução indolente, a identificação de um grupo de homens de alto risco consiste em importante ferramenta auxiliar no que se refere ao alcance de redução da mortalidade desta parcela da população. Um exame de PSA obtido dos 44-50 anos de idade pode estratificar esses homens, incluindo-os em grupos de vigilância ativa para CaP (LILJA et al, 2011). Mais recentemente, estudo considera que, para indivíduos > 60 anos com PSA < 1 ou 2 ng/mL não se justificaria *screening* dado a expectativa de vida e nítido aumento da incidência de doença benigna (VICKERS e LILJA, 2012).

O tipo histológico mais frequentemente encontrado no CaP é o tumor epitelial, entre os quais se destaca o adenocarcinoma acinar, podendo ser encontrados também, tumores neuroendócrinos, tumores de estroma prostático, mesenquimais, hematolinfóides e miscelâneos, além de metastáticos (WHO, 2004).

A avaliação histopatológica do CaP é realizada por patologista, tomando por base a arquitetura da amostra. O escore de Gleason é o método utilizado para tal exame. Nesta avaliação, o tecido normal consiste em glândulas rodeadas por tecido fibromuscular mantendo as glândulas unidas. Na sequência, com o aumento da malignidade e agressividade, ocorre uma ruptura do arranjo glandular que, em última instância, chega a preencher o lúmen com células epiteliais e o estroma virtualmente desaparece (Figura 1). A soma do primeiro e segundo padrões predominantes observados constituem o valor de 2

a 9, que identificam a presença de CaP, o grau de desenvolvimento, prognóstico e, por último, direciona a terapêutica do câncer (TABESH et al., 2007).

Figura 1. Esquema de gradação do escore de Gleason.



De cima para baixo mostrando modificação evolutiva da arquitetura glandular com aumento da agressividade. Modificado de Tabesh et al., (2007).

Após o diagnóstico, realiza-se o estadiamento, que consiste em identificar o grau de crescimento do tumor e sua disseminação pela utilização do escore TNM. Neste escore, a letra T indica a extensão do tumor primário, que varia de clinicamente inaparente até disseminado para o assoalho e paredes pélvicas. Neste item, T1 corresponde a tumor não palpável ou não visível, T2, tumor confinado à próstata e T3 tumor que se expande através da cápsula prostática, podendo acometer as vesículas seminais. A letra N indica nódulo, podendo variar de ausência de achados em linfonodos até presença de nódulos de tamanho superior a 5 cm em linfonodos regionais. A letra M indica a presença ou ausência de metástase, variando, para efeito de classificação, entre M1a, M2b e M3c para linfonodos não regionais, ósseas e outras localizações, respectivamente. Em caso de dúvida quanto à correta categoria T, N ou M em que se encontra determinado caso, a opção deve ser pela categoria inferior. O mesmo deve ocorrer para o agrupamento por estágio. Por último avalia-se a ausência ou presença de metástase, variando de acometimento de linfonodos não regionais, ossos e outras localizações, conforme Quadro 1 (EISENBERG, 2004).

Quadro 1. Esquema da classificação TNM (EISENBERG, 2004).

T1	Próstata não palpável ou visível
T1a	≤ 5%
T1b	> 5%
T1c	Biópsia por agulha
T2	Tumor confinado à próstata
T2a	≤ metade de um lobo
T2b	> metade de um lobo
T2c	Ambos os lobos
T3	Através da cápsula prostática
T3a	Extracapsular
T3b	Vesícula(s) seminal(ais)
T4	Fixo ou invade estruturas adjacentes: Colo vesical, esfícter externo, reto, músculos elevadores do ânus, parede pélvica
N1	Linfonodo(s) regional(is)
M1a	Linfonodo(s) não regional(is)
M2b	Osso(s)
M3c	Outra(s) localização(ões)

T, tumor; N, nódulo; M, metástase.

Em nosso estudo, utilizamos a estratificação de Harvard (D'Amico). Este escore foi proposto como sistema de estratificação de risco de CaP baseado na dosagem de PSA, escore de Gleason e estadiamento tumoral. As informações foram agrupadas para acessar a resposta de pacientes a terapêutica tanto para classificação de risco pré-cirúrgico quanto para previsão de recidiva pós-cirúrgica. O sistema classifica os tumores em baixo risco (T1-T2 e escore de Gleason ≤ 6 e PSA ≤ 10), risco intermediário (T2b e/ou escore de Gleason = 7 e/ou PSA 10-20 e não baixo risco) e alto risco ($\geq T2c$ ou PSA > 20 ou escore de Gleason 8-10) (RODRIGUES, 2012).

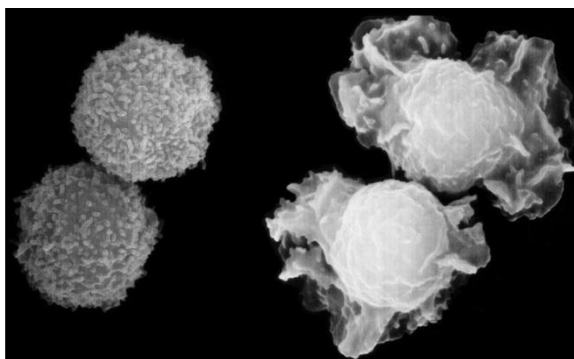
2.3. Aspectos Moleculares do Câncer de Próstata

Vários fatores têm sido implicados no desenvolvimento de CaP. Os mais conhecidos são agentes infecciosos, fatores hormonais, hábitos alimentares, refluxo urinário e trauma. Todos estes elementos têm em comum um cenário de inflamação

crônica. Esta, por sua vez, depende de uma rede de substâncias endógenas cuja interação determina o risco individual para o CaP. Incluem-se aí os polimorfismos genéticos de algumas citocinas, como TNF- β 1, IL-1 α/β , IL-8, IL-10, CCR2 e CCR5 (ELKAHWAJI, 2012; TSAUR, 2015).

A descoberta das quimiocinas como grupo de substâncias participantes da inflamação e defesa de hospedeiros ocorreu por meio da análise de ativação celular em tempo real como mostra a Figura 2. A reação se deu em resposta a uma substância atualmente denominada quimiocina, que ao interagir com um receptor com sete domínios transmembrana acoplado a proteína G, desencadeou a modificação do formato celular, aspecto relacionado à migração leucocitária (BAGGIOLINI, 2015).

Figura 2. Mudança de forma dos neutrófilos em resposta à presença de substâncias quimioatrativas caracterizada pela protrusão e retração de extensões ectoplasmáticas



Fonte: BAGGIOLINI, 2015.

Participação da inflamação na evolução do câncer como um todo, assim como o papel fundamental das quimiocinas, é mostrado na Figura 3 (ALLAVENA et al., 2011). O sistema imune adaptativo, em condições não patológicas, conta com a participação de células que reconhecem e eliminam peptídeos invasores por meio da ativação de linfócitos T e B. Os linfócitos B produzem anticorpos que reconhecem e apresentam as proteínas estranhas com o propósito de eliminá-las. Por sua vez, os linfócitos T, combatem as infecções intracelulares. Para que isto ocorra, moléculas classe II do complexo de histocompatibilidade principal, MHC (do inglês, *main histocompatibility complex*) apresentam, na superfície celular, peptídeos exógenos de micróbios invasores intracelulares. Ao identificarem patógenos, estas células expressam também, em sua superfície, moléculas coestimuladoras, que sinalizam a ocorrência de patógenos estranhos.

A secreção de citocinas pelos linfócitos T helper é estimulada partir da ligação das moléculas de classe II do MHC ao peptídeo. As citocinas, por sua vez, medeiam a sinalização intercelular (JORDE et al., 2010).

Figura 3. Participação da inflamação na evolução do câncer.

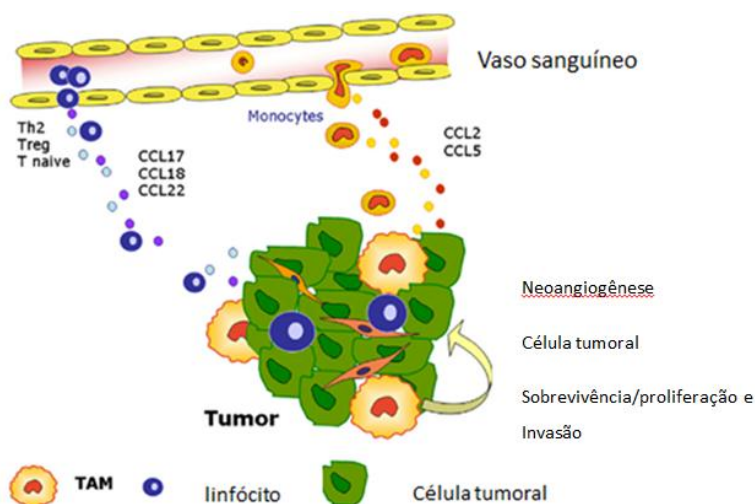


Figura 3. Participação da inflamação na evolução do câncer. CCL, quimiocinas; Th, linfócito T *helper*, Treg, linfócito T regulador; T naíve, linfócito T que ainda não encontrou um antígeno. Adaptado de Allavena et al. (2011).

A participação das citocinas e seus receptores na inflamação do câncer está relacionada ao tráfico de células inflamatórias até regiões de interesse, bem como à angiogênese, crescimento tumoral, invasão e metástase. As quimiocinas são produzidas de forma constitutiva ou induzida, participando da homeostase ou inflamação, respectivamente. Quando participam da homeostase, seu papel se dá por meio da manutenção da hematopoiese e do sistema imunológico. Já as quimiocinas inflamatórias, são expressas em resposta a estímulos pró-inflamatórios, por células específicas tumorais que, aumentando sua expressão, atuam reconhecendo seus receptores. Modificações em receptores, determinadas por alterações genéticas podem interferir na evolução das respostas específicas (VANDERCAPPELLEN et al., 2008; MUKAIADA E BABA, 2011).

Os receptores de quimiocinas constituem-se, estruturalmente, de um amplo grupo com sete domínios transmembrana acoplados a proteína G, que é expressa em vários tipos celulares. O espaçamento entre as cisteínas divide as quimiocinas nas classes CXC, CC e CX3C, com 4 cisteínas conservadas e C com apenas duas cisteínas. CXC e CX3C se

diferenciam por ter um e três aminoácidos entre a primeira e a segunda cisteínas, enquanto em CC as duas são adjacentes. Quanto à ligação, observa-se que ligantes e receptores apresentam sobreposição dentro da mesma classe. Modificações coordenadas no padrão de expressão dos receptores de quimiocinas ocorrem após exposição a células dendríticas ao apresentarem antígenos para células T. Isto explica o direcionamento destas células na inflamação determinando a localização na periferia ou em órgãos linfoides (MURPHY, 2000).

Tumores sólidos apresentam estroma rico em células produtoras de quimiocinas, como fibroblastos e células endoteliais. Este cenário facilita a formação de um gradiente de concentração atrativo para células inflamatórias. Demonstrou-se a existência de receptor que não induz o sinal de influxo de cálcio pelo CCR chamado receptor de antígeno Duffy. Este pode atuar como regulador na presença de excesso de quimiocina e sua ausência já foi associada ao aumento de mortalidade por CaP em afro-americanos (VANCAPELLEN et al., 2006).

A ligação da quimiocina ao receptor leva à ativação por meio de mudança de GDP para GTP dissociando as subunidades α e $\beta\gamma$. A subunidade $\beta\gamma$ ativa dois sinais principais de transdução de enzimas, as fosfolipases ($PLC\beta_2$ e β_3) que são específicos para fosfatidilinositol e a fosfatidilinositol 3-OH kinase ($PI3K\gamma$). A $PLC\beta$ cliva fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato, originando dois segundos mensageiros: inositol (1,4,5) trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). IP3 induz a liberação de Ca^{+2} dos reservatórios intracelulares levando ao aumento transitório da concentração de cálcio livre e DAG ativa várias isoformas da proteínquinase C (PKC). A $PI3K\gamma$ rapidamente gera fosfatidilinositol trifosfato e inicia a ativação de outra kinase, a PKB. A subunidade $\beta\gamma$ ativa outras kinases, por exemplo MAP kinase. Após a hidrólise da GTP, a subunidade α se reassocia à subunidade β e pode sinalizar por ela própria ativando tirosina kinases (BAGGIOLINI, 2001).

Estudo com quimiocinas e seus ligantes produzidos por vírus podem ajudar a esclarecer os mecanismos de ajustes de sinalização. O entendimento da funcionalidade estrutural destas moléculas sugere que estratégias de engenharia molecular podem criar novos fármacos com propriedades agonistas ou inibitórias (BURG, 2015).

Novas estratégias terapêuticas têm sido sugeridas, no sentido de melhorar o prognóstico, tempo e qualidade de sobrevivência mesmo em pacientes com CaP metastático

(BAYNE et al., 2015), assim como mecanismos de apoio à tomada de decisão por parte da equipe assistente (PLOUSSARD, 2015; PRESTON, 2015). Paralelamente, tem aumentado o conhecimento sobre mecanismos epigenéticos que atuam no DNA modificando a acessibilidade da cromatina à maquinaria transcricional. Terapia epigenética pode se constituir em uma abordagem promissora, mas ainda se encontra em estágio inicial de pesquisa (YASMIN et al., 2015).

2.4. Os genes *CCR2* e *CCR5* e seus produtos proteicos

Os receptores CCR2 e CCR5 são proteínas de superfície produzidos em células específicas e atuam por meio do reconhecimento de seus ligantes. Os genes homônimos se localizam na mesma região cromossômica, 3p21. Modificações nestes receptores, determinadas por alterações gênicas, podem interferir no desencadeamento das respostas próprias, implicando em alteração da evolução do câncer como um todo. É importante ressaltar que as moléculas de quimiocinas se ligam a vários receptores com diferenças de afinidades entre si. Esta redundância torna um desafio a atribuição de um risco a uma quimiocina já que a resposta do organismo dependerá, tanto da resposta elicitada pelo par ligante/receptor isoladamente, quanto do contexto celular e molecular em que se encontra (RODRIGUES et al., 2014).

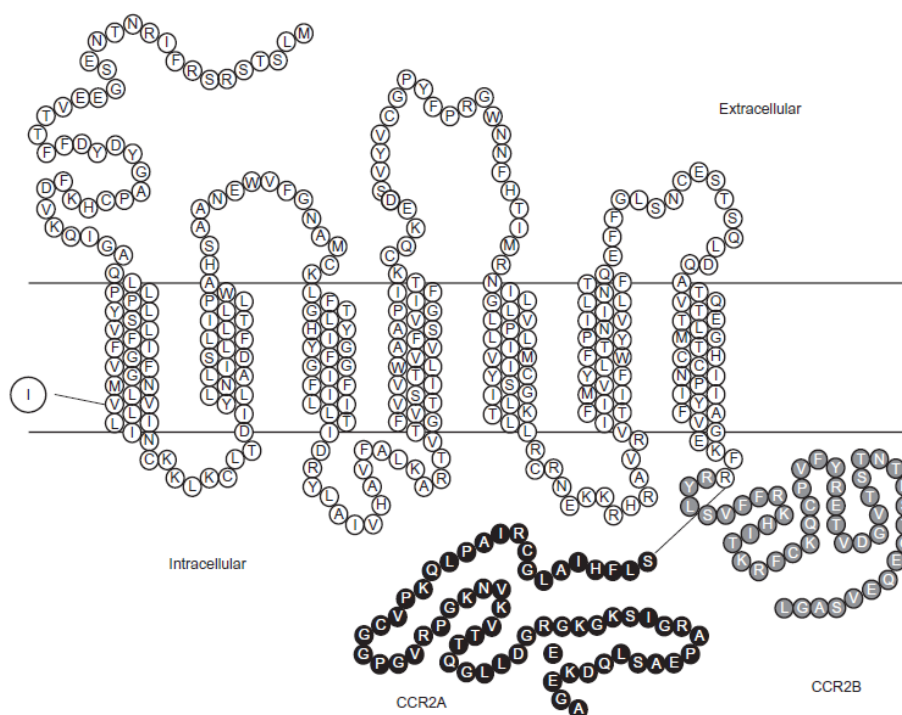
Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês, *Single Nucleotide Polymorphisms*) são alterações em um único nucleotídeo na sequência de leitura do DNA cuja repercussão pode variar de nenhuma, com expressão do mesmo aminoácido na constituição da proteína, até a modificação completa da estrutura da molécula proteica final ou até mesmo à parada da produção da proteína. Já as deleções são mutações em que ocorre a ausência de uma parte do material genético que compõe determinada região do DNA (GRIFFITHS et al., 2013).

O receptor CCR2 foi implicado na regulação da resposta imune via recrutamento de monócitos/macrófagos aos sítios de inflamação. Em estudo conduzido em ratos, a deleção de *CCR2*, levou a perda de atratividade para linfócitos T após desafios antigênico e não antigênico. O estudo demonstrou, ainda, um forte defeito na produção de interferon- γ (BORING et al., 1997). Recentemente, observou-se, em modelos murinos, que a inibição de CCR2 pode impedir respostas imunes anticâncer que contribuem para o sucesso

terapêutico (MA, 2014). A variação *CCR2-Val64Ile* (rs1799864) é um exemplo de SNP que modifica a proteína receptora de quimiocina, na qual ocorre substituição da base nitrogenada guanina (G) por adenina (A) na posição 190. A alteração resulta em modificação do aminoácido valina por isoleucina no códon 64, implicando na produção do receptor alterado.

O receptor CCR2 apresenta duas isoformas determinadas por *splicing* alternativo: CCR2A e CCR2B. O alelo *CCR2-64Ile* é implicado em aumento de expressão da isoforma CCR2A, enquanto *CCR2-64Val* produz preferencialmente CCR2B. A diferença entre as duas proteínas reside na extremidade carboxiterminal, que se localiza na porção citoplasmática da molécula, conforme mostra a Figura 4 (NAKAYAMA et al., 2004).

Figura 4. Estrutura da molécula de CCR2A e CCR2B.



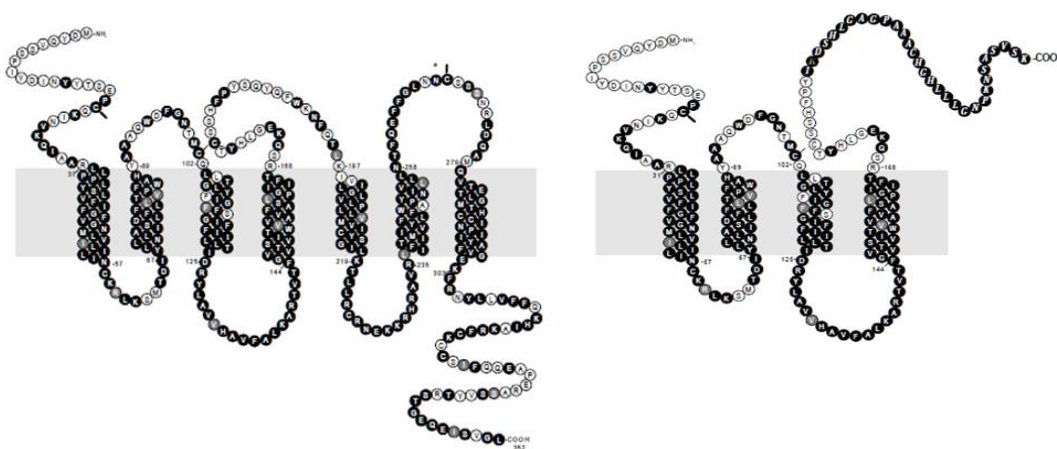
Letras em cinza denotam a estrutura de CCR2B e as que estão em preto, correspondem à estrutura de CCR2A. A letra I, no círculo, mostra a posição 64, onde ocorre a substituição de valina por isoleucina na proteína. Adaptado de Nakayama et al., (2004).

Estudo recente demonstrou que uma proteína com características estruturais semelhantes a quimiocinas, a PSMP, (do inglês *PC3-secreted microprotein*), foi implicada em ligação e ativação específica da isoforma CCR2B. A via ativada por PSMP foi pERK,

cuja sinalização leva a proliferação e migração (PEI et al., 2014). Desta forma, maior expressão de CCR2A poderia diminuir a ligação de PSMP, diminuindo o disparo da via pERK, além de reduzir a ativação de CCR5.

O receptor CCR5 foi descrito como proteína ligação ao HIV. Esta se dá, inicialmente pela afinidade da glicoproteína do envelope viral (Env) ao DC4 na superfície celular. Em seguida, ocorre a fusão do vírus à membrana celular, mediada pelo co-receptor CCR5, expresso na membrana celular. A partir daí, é desencadeada mobilização de cálcio do meio intracelular, resultando em sinalização para a produção de mais receptores (RONG LIU, 1996). O polimorfismo *CCR5-Δ32* (rs333) é definido pela deleção de 32 pares de bases dentro da região que codifica CCR5. A extensão corresponde aos nucleotídeos 794 a 825 em uma região correspondente da segunda alça externa do receptor, como mostra a figura 5. A falta da região descrita introduz um códon de parada prematura levando à produção de receptor inativo (ZAMBRA, 2013). Estudado inicialmente como co-receptor do vírus HIV, tem sido observada associação com doenças inflamatórias e neoplasias. Seu uso terapêutico potencial como cura de AIDS foi postulado após realização de transplante de paciente com AIDS no qual o doador apresentava o gene *CCR5Δ32* em homozigose. Diante da restrição do acesso do vírus a células não infectadas, a contagem de cópias virais tornou-se indetectável, caso que ficou conhecido como “o paciente de Berlin” (MITSUYASU, 2014). Na cura do câncer tem sido discutida a participação de CCR5. A expressão de CCR5 em linfócitos TCD4⁺ induz a expressão de moléculas CD40, CD80 e CD86, influenciando na maturação das células apresentadoras de antígenos. A ocorrência estimula a expressão de CCR5 em linfócitos TCD8⁺. As células TCD8⁺ podem então, exercer sua atividade citotóxica em células cancerosas, ao sair dos linfonodos (GONZÁLEZ-MARTIN, 2011).

Figura 5. Esquema comparativo da proteína CCR5 completa (à esquerda) e alterada pela deleção de 32 pares de bases constituindo o receptor CCR5- Δ 32 (à direita).



Adaptado de McNichol et al. (1997).

No indivíduo com o gene polimórfico *CCR5-Δ32*, o alelo mutante truncado não é expresso na superfície celular, ficando retido no retículo endoplasmático (RE). A formação de complexos multiméricos entre CCR5+CCR5- Δ 32, que também permanecem retidos, implica na redução de expressão de CCR5 *wt* (do inglês *wild type*, selvagem) na superfície celular em heterozigotos (*wt/Δ32*). Como exemplo da resposta ao receptor não funcionante, observou-se a proteção conferida à infecção pelo HIV dada pela impossibilidade de acesso do vírus ao interior da célula (BENKIRANE et al., 1997).

Conforme relatado em literatura, ocorre moderado desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos *CCR2-Val64Ile* e *CCR5-Δ32* (MACHUCA et al., 2014). Sabendo-se que estão situados no mesmo cromossomo, o desequilíbrio em questão pode estar associado à característica da composição de ancestralidade da população estudada.

Considerando a estimativa de aumento da expectativa de vida em todo o mundo e o recente enfoque dado à medicina personalizada, os avanços no conhecimento dos aspectos moleculares do CaP são essenciais. A inclusão de novas ferramentas que permitam otimizar a avaliação do risco potencial aos quais os indivíduos estão expostos demonstra ser determinante na busca, não apenas de quantidade, mas também de qualidade de vida. Para tanto, diante das evidências descritas acima, julgamos pertinente avaliar a associação dos polimorfismos *CCR2-Val64Ile* e *CCR5-Δ32* com o câncer de próstata.

3.JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O aumento do conhecimento sobre os mecanismos moleculares relacionados ao desenvolvimento do câncer trouxe junto um significativo avanço na avaliação de riscos individuais. Neste contexto, a medicina personalizada é um modelo de prática em que a avaliação genética, associada a fatores ambientais são usados para estimar o risco individual (JORDE et al., 2010). A utilização desta ferramenta está ligada tanto ao risco, quanto à decisão da terapêutica mais adequada a ser indicada, tornando a terapêutica mais segura e mais eficaz (RODRIGUES, 2014; COLLINS, 2010).

Em todo o mundo, o CaP chega a ser o segundo em causa de doenças malignas, apresentando aumento de sua incidência em países desenvolvidos, respondendo por 70% dos casos novos. No Brasil, o CaP, assim como no restante do mundo, é a principal causa de doença maligna na população masculina, com incidência, em 2014, de 2.480 casos novos, o que corresponde a 24,6% de todas as neoplasias diagnosticadas em homens. No Piauí, a taxa estimada foi de 49,49 casos novos por 100.000 homens (INCA, 2014).

O reconhecimento do CaP como uma patologia ligada ao envelhecimento, juntamente com as estimativas de crescimento demográfico desta faixa etária, torna esta patologia problema de saúde pública prioritário (IBGE, 2014; WHO, 2012).

3.1. Objetivo Geral

Analisar a associação entre os polimorfismos *CCR2-Val64Ile* e *CCR5-Δ32* e a susceptibilidade e agressividade de pacientes com CaP no Estado do Piauí.

3.1.1. Objetivos Específicos

- Realizar genotipagem 370 amostras, sendo 185 casos de CaP e 185 controles, dos polimorfismos *CCR2-Val64Ile* e *CCR5-Δ32*, para a caracterização da composição genotípica e haplotípica da população em estudo.
- Observar ocorrência de desequilíbrio de ligação quanto aos polimorfismos avaliados.

- Comparar os genótipos entre os grupos caso e controle buscando associação de *CCR2-Val64Ile* e *CCR5-Δ32* com susceptibilidade ao câncer de próstata.
- Observar as características do grupo caso quanto a idade dos pacientes, PSA, estadiamento tumoral, escore de Gleason de acordo com os critérios de classificação de risco de D'Amico e a presença de metástases.
- Testar a associação entre os polimorfismos *CCR2-Val64Ile* e *CCR5-Δ32* e os critérios de alto risco, segundo D'Amico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada pela análise de 185 amostras de material de sangue periférico ou biópsias de tumor de pacientes com diagnóstico de câncer de próstata (grupo caso), encaminhadas pelo Departamento de Urologia do Hospital São Marcos, referência em tratamento oncológico no Estado do Piauí, no período de 2011 a 2014.

O grupo de controle constituiu-se de 185 amostras de sangue periférico de homens piauienses sem diagnóstico prévio de câncer e histórico de câncer na família. O pareamento indivíduos de idade ≥ 60 anos objetivou minimizar a possibilidade de os indivíduos do grupo controle terem CaP, já que este se associa a idade mais avançada. O período de coleta se estendeu de julho de 2014 a julho 2015. As amostras de sangue periférico foram colhidas em tubos de ensaio contendo EDTA obtidas em laboratórios da rede privada de Parnaíba e Teresina, sendo levadas em caixas térmicas, para dosagem do PSA, em laboratórios na cidade de Parnaíba conveniados com o Sistema Único de Saúde. Como critério de inclusão, um valor de PSA $\leq 2,5$ ng/mL foi adotado, para assegurar que o indivíduo do grupo controle tivesse menor risco de desenvolver câncer de próstata.

O projeto teve seu protocolo aprovado, conforme a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, que trata das normas para pesquisa envolvendo seres humanos, pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi obtido dos participantes do estudo.

As amostras dos grupos caso e controle foram encaminhadas ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Piauí – Campus Ministro Reis Velloso, para obtenção do material genético.

4.1.Extração, quantificação e armazenamento do DNA

As amostras de sangue periférico foram submetidas à extração do DNA com o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega Inc., USA), conforme as especificações do fabricante. Os seguintes passos foram seguidos: 300 μ L de sangue total foram adicionados a 900 μ L de solução de lise celular e a mistura incubada por 10 minutos com movimentos de inversão constantes; em seguida, o sobrenadante foi descartado, e as amostras foram levadas ao vórtex evitando a formação de grumos nas etapas subsequentes.

Adicionou-se, então, mistura contendo 300 µL de solução de lise nuclear e 100 µL de solução de precipitação de proteínas; o material foi novamente centrifugado, transferindo-se o sobrenadante para outro tubo contendo 300 µL de isopropanol, que passou por nova centrifugação, seguida pelo descarte do sobrenadante e pela adição de etanol 70%; procedeu-se mais uma centrifugação, descartando-se o sobrenadante. Obteve-se, então, amostra de DNA, observada na forma de uma massa branca (pellet) no fundo do tubo. Esta foi incubada com 100 µL de uma solução de reidratação em banho-maria por 1 hora a 65°C com o objetivo de que o DNA fosse eluído.

No procedimento de extração do DNA das amostras de tecido prostático, foram retirados, aproximadamente 20 mg da amostra. Os fragmentos foram mecanicamente homogeneizados (homogeneizador manual, modelo D-130, Wiggense SDN BHD) em solução de lise nuclear (Wizard® Genomic Kit, Promega Inc., USA) e em seguida, incubados com 20 mg/mL de proteinase K a 65°C por 12 horas ou até que estivesse completamente digerido. Em seguida, a proteinase K foi inativada a 95°C por 15 minutos e o produto total foi usado para a extração do DNA de forma semelhante ao procedimento de extração de DNA a partir de sangue periférico.

A pureza e concentração do DNA foram determinadas por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, corado com GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, USA), e em espectrofotômetro (Biospec-nano, Shimadzu, Japan), por meio do comprimento de onda de 260 e 280 nm. Uma vez confirmada a qualidade das amostras, as mesmas são armazenadas em freezer (-20°C) no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Piauí – Campus Ministro Reis Veloso.

4.2. Amplificação e análise das regiões polimórficas

4.2.1. Análise do polimorfismo *CCR2-Val64Ile*

A região do polimorfismo *CCR2-Val64Ile* foi amplificada com os *primers forward* 5'-TTG GTT TTG TGG GCA ACA TGA TGG-3' e *reverse* 5'-CAT TGC ATT CCC AAA GAC CCA CTC-3', resultando em um produto de 173 pb. As amostras de DNA foram amplificadas em uma reação com volume final de 15 µL contendo 8,2 µL de H₂O, 3,0 µL de *DNTP* (0,2mM), 1,5 µL de Tampão (KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM/ pH 8,5),

0,4 μL de MgCl_2 (1,3 mM), 0,5 μL (0,4 μM) de cada primer, 0,3 μL de *Taq* Polimerase (1,5U) e 0,6 μL de DNA, de acordo com protocolo. A reação em cadeia de polimerase, PCR foi realizada em termociclador (Biometra, Professional Thermocycler) de acordo com as etapas listadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Programa de amplificação do polimorfismo *CCR2-Val64Ile*

Etapas	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95° C	5 min.	1x
Desnaturação	95° C	45 seg.	
Anelamento	58° C	45 seg.	35x
Extensão	72° C	45 seg.	
Extensão final	72° C	7 min.	1x

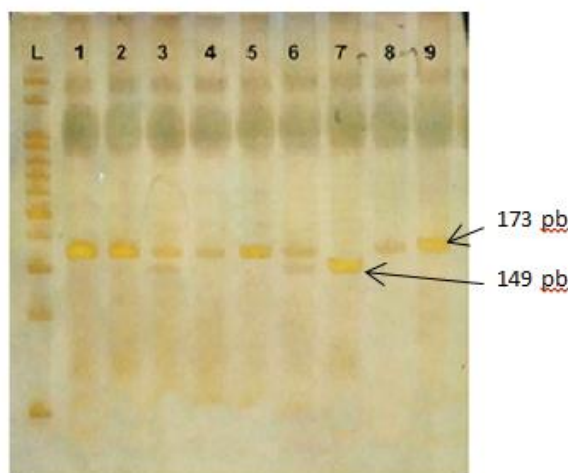
Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (GE Healthcare) para confirmar a presença dos fragmentos de DNA em estudo. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal com corrente de 110 V por 30 minutos e os fragmentos amplificados foram visualizados em transiluminador (*Loccus* Biotecnologia) com fonte de luz ultravioleta. Após a visualização, os produtos amplificados foram submetidos ao procedimento de RFLP, incubados na presença da enzima *BsaBI* (New England BioLabs), de acordo com as condições listadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Condições para a digestão enzimática dos produtos de PCR da região do polimorfismo *CCR2-Val64Ile*

Reagente	Quantidade
Água	3,3 μL
Tampão (O)	1,5 μL
Enzima (<i>BsaBI</i>)	0,2 μL (2U)
PCR	10,0 μL
Total	15 μL
Temperatura e tempo de incubação	65° C por 16 horas

Após a digestão, os produtos da foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, para a distinção dos três genótipos possíveis, Val/Val (173 pb), Val/Ile (173, 149 e 24 pb) e Ile/Ile (149 e 24 pb). A eletroforese foi feita com uma corrente de 110V e a visualização dos fragmentos foi realizada por meio de coloração com nitrato de prata (Figura 6).

Figura 6 – Fotografia dos produtos da análise dos padrões de banda dos três genótipos obtidos para o polimorfismo *CCR2*-Val64Ile em gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata.



L: Ladder (marcador de peso molecular de 50 pb); linhas 1, 2, 4, 5, 8 e 9: Val/Val (homozigotos selvagens); linhas 3 e 6: Val/Ile (heterozigotos); linha 7: Ile/Ile (homozigoto mutante).

4.2.2. Análise do Polimorfismo *CCR5*- Δ 32

A região do gene *CCR5*, onde está presente o polimorfismo *CCR5*- Δ 32, foi amplificada exponencialmente por PCR com os *primers forward* 5' – GTC TGA TCA CTT GGG TGG TG – 3' e *reverse* 5' – AGC AGA TGA CCA TGA CAA GC – 3' que se anelam às regiões flanqueadoras do polimorfismo gerando um produto de 195 ou 163 pb (deleção de 32 pb).

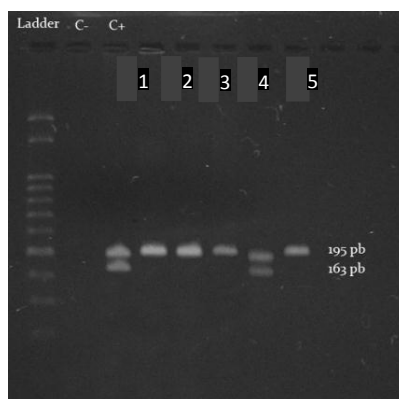
As amostras de *DNA* foram amplificadas em uma reação com volume final de 15 μ L contendo 8,6 μ L de H₂O, 3,0 μ L de *DNTP* (0,2mM), 1,5 μ L de Tampão (KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM/ pH 8,5), 0,3 μ L de MgCl₂ (1,0 mM), 0,5 μ L (0,4 μ M) de cada primer, 0,3 μ L de *Taq* Polimerase (1,5U) e 0,3 μ L de DNA, de acordo com protocolo.

Tabela 3. Programa de amplificação do polimorfismo *CCR5-Δ32*

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95° C	5 min.	1x
Desnaturação	95° C	45 seg.	
Anelamento	57° C	45 seg.	35x
Extensão	72° C	45 seg.	
Extensão final	72° C	7 min.	1x

O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose, conforme descrito para *CCR2-Val64Ile*. Os padrões de banda esperados dos fragmentos para cada genótipo são 195 pb/195 pb nos indivíduos homocigotos selvagens (*wt/wt*), 195 pb/163 pb nos heterocigotos para o polimorfismo (*wt/Δ32*) e 163 pb/163 pb nos homocigotos para o polimorfismo ($\Delta32/\Delta32$) (Figura 7).

Figura 7. Fotografia dos produtos da análise dos padrões de banda dos dois genótipos obtidos para o polimorfismo *CCR5-Δ32* em gel de agarose visto por transiluminador.



Ladder, (marcador de peso molecular de 50 pb); C⁻, controle negativo; C⁺, controle positivo. Linhas 1, 2, 3 e 5 *wt/wt* (homocigoto selvagem com apenas uma banda visível-195pb); linha 4 *wt/Δ32* (heterocigoto com a visualização de duas bandas -195 pb e 163 pb).

4.3. Análise Estatística

As amostras dos grupos caso e controle foram testadas quando ao seu equilíbrio pela lei de Hardy-Weinberg utilizando o teste do qui-quadrado.

O cálculo do desequilíbrio de ligação foi realizado utilizando-se o programa *Haploview*®.

A associação entre CaP e presença dos alelos polimórficos, foi verificada dispondo-se os dados em tabela de contingência 2x2, calculando-se Odds Ratio. Para isto utilizou-se o programa BioEstat 5.0.

Para todos os testes foi considerado um nível de significância de 0,05.

5. RESULTADOS

As características clínicas mostraram que a idade média do grupo caso foi 66,78 anos $\pm 8,48$ e o grupo controle apresentou média de 68,48 $\pm 6,69$. Entre os indivíduos do grupo caso 85 (55,55%) tiveram PSA < 20 e 68 (44,44%) tiveram PSA ≥ 20 , considerado alto risco para metástase segundo D'Amico. Todos os indivíduos do grupo controle tiveram PSA $< 2,5$ ng/mL, conforme o critério de seleção adotado.

O grupo caso apresentou informação disponível quanto ao estadiamento TNM em 178 pacientes, sendo que 48 indivíduos apresentaram TNM $< 2Tc$ (26,9%) e 130 $\geq 2Tc$ (73,03%). A avaliação histopatológica de Gleason foi disponível para 180 pacientes, sendo que destes, 119 (66,1%) se encontravam em nível ≤ 7 e 61 (33,99%) tiveram escore de Gleason ≥ 8 , considerado alto risco para metástase segundo D'Amico. Considerando os grupos de risco intermediário e alto risco juntos (Gleason ≥ 7), obtivemos que 154 (85,55%) encontravam-se nesta situação, denotando maior agressividade. A estratificação de risco de D'Amico foi realizada conforme os dados disponíveis (PSA, TNM e Gleason), sendo possível a classificação de 156 dos 185 casos (84,3%). Os pacientes em alto risco compunham a maioria, com 138 casos (88,46%), seguido dos de risco intermediário com 11 (7,05%), e dos de baixo risco 7 (4,5%). Dos 185 indivíduos do grupo caso, 178 (96,2%) tiveram registro de estadiamento TNM. Dos 178 pacientes com registro de estadiamento, 17 (9,55%) apresentavam metástases e 161 (90,44%) não apresentavam metástase (Tabela 4).

Tabela 4. Características clínicas, laboratoriais e histopatológicas dos participantes do estudo.

Variável	Casos, n = 185	Controles, n = 185
Idade (anos)	66,78 ± 8,48	68,48 ± 6,69
PSA (ng/mL) (casos, n = 153)		
<20	9,90 ± 4,69 (55,6%)	1,09 ± 0,61 (100%)
≥20	100,48 ± 162,96 (44,4%)	0,0%
TNM (n = 178)		
<T2c	48 (26,9%)	NA
≥T2c	130 (73,03%)	NA
Gleason (n = 180)		
≤7	119 (66,1%)	NA
≥8	61 (33,99%)	NA
Metástase (n = 178)		
M0 + Mx	161 (90,44%)	NA
M1	17 (9,55%)	NA
Escore D'Amico (n = 156)		
Baixo risco	7 (4,5%)	NA
Risco intermediário	11 (7,05%)	NA
Alto risco	138 (88,46%)	NA

PSA: Antígeno prostático específico; TNM: estadiamento tumoral segundo a avaliação de tumor, nódulo e metástase. NA= não se aplica.

A eletroforese em gel de poliacrilamida, dos produtos de PCR para *CCR2* resultou na distinção dos três genótipos possíveis, Val/Val (173 pb), Val/Ile (173, 149 e 24 pb) e Ile/Ile (149 e 24 pb) (Figura 6).

Os resultados de corrida eletroforética foram observados em gel de agarose apresentando, para *CCR5-Δ32*, dois padrões distintos de separação em bandas: homozigoto selvagem (*wt/wt*) e heterozigoto (*wt/Δ32*) (Figura 7).

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado, tendo sido verificado que os genes estudados encontram-se em equilíbrio $p > 0,05$. O cálculo do desequilíbrio de ligação foi realizado utilizando-se o programa *Haploview*®, tendo sido observado desequilíbrio moderado para a segregação de *CCR2-64Ile* e *CCR5-Δ32* ($D' = 0,559$; $r^2 = 0,001$). O achado corrobora com os dados de literatura segundo os quais há desequilíbrio de ligação entre os

dois genes em estudo (MACHUCA et al., 2013). A baixa frequência de *CCR5-Δ32* justificou a não utilização de análises haplotípicas subsequentes.

Os grupos de casos e controles foram distribuídos conforme a frequência genotípica e alélica dos polimorfismos *CCR2-Val64Ile* e *CCR5-Δ32*. As frequências genotípicas e alélicas não diferiram entre os grupos caso e controle. No grupo caso, a frequência genotípica de Val/Val foi 71,5%, Val/Ile foi 26,3% e Ile/Ile foi 1,6%. No grupo controle, as frequências genotípicas Val/Val foi 68,8%, Val/Ile foi 28,45 e Ile/Ile foi 2,1%. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos caso e controle quanto às frequências genotípicas ($p=0,802$). A frequência do alelo Ile no grupo caso foi 14,85% e no grupo controle 16,41%, sem diferença estatisticamente significativa ($p=0,544$). No grupo caso, as frequências genotípicas de *wt/Δ32* e *wt/wt* foram de 3,24 e 96,76% respectivamente. No grupo controle a frequência genotípicas de *wt/wt* e *wt/Δ32* foram 92,97 e 7,56% respectivamente. A frequência do alelo *CCR5-Δ32* no grupo de casos e controles foi 1,9% e 3,8% respectivamente. Não houve diferença significativa estatisticamente entre os grupos caso e controle ($p=0,121$) (Tabela 5).

Para efeito de cálculos estatísticos, em virtude das baixas frequências alélicas encontradas, os dados foram separados em duas categorias: ausência de alelo polimórfico *versus* presença de alelo polimórfico em modelo dominante (Val/Val vs. Val/Ile + Ile/Ile para *CCR2-Val64Ile* e *wt/wt* vs. *wt/Δ32* para *CCR5-Δ32*).

O polimorfismo *CCR2-Val64Ile*, não apresentou associação estatisticamente significativa sobre a ocorrência do CaP quando comparado ao genótipo de referência Val/Val (OR=0,89; 95% IC=0,56-1,41; $p=0,70$ para o genótipo Val/Ile; OR=1,39; 95% IC=0,28-5,83; $p=0,95$ para o genótipo Ile/Ile). Os genótipos Val/Ile + Ile/Ile foram combinados, não apresentando associação estatisticamente significativa em relação à ocorrência de CaP (OR=1,14; 95% IC 0,73-1,78; $p=0,63$). Não houve diferença estatisticamente significativa quanto à ocorrência de CaP em função da presença do polimorfismo *CCR5-Δ32* (OR=0,48; 95% IC=0,19-1,22; $p=0,18$) (Tabela 5).

Tabela 5. Distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos nos grupos de casos e controles

Variável	Casos, n (%)	Controles, n (%)	<i>p</i>	OR (95% IC)	<i>p</i>
CCR2-Val64Ile					
Val/Val	133 (71,5)	128 (68,8)		Ref.	
Val/Ile	49 (26,3)	53 (28,45)		0,89 (0,56-1,41)	0,70
Ile/Ile	3 (1,6)	4 (2,1)	0,802	1,30 (0,28-5,83)	0,95
Val/Ile + Ile/Ile	52 (28,1)	57 (30,8)		1,14 (0,73-1,78)	0,63
				0,98 (0,97-1,07)	0,37
				Ajuste para idade	
Alelos					
Val	315 (85,13)	309 (83,5)		Ref.	
Ile	55 (14,86)	61 (16,41)	0,544	1,13 (0,76-1,68)	0,61
CCR5-Δ32					
<i>wt/wt</i>	179 (96,76)	172 (92,97)			
<i>wt/Δ32</i>	7 (3,24)	14(7,56)	0,18	0,48 (0,19-1,22)	0,18
				1,08 (0,89-1,00)	0,03
				Ajuste para idade	
Alelos					
<i>wt</i>	365 (98,1%)	358 (96,2%)			
Δ32	7 (1,9%)	14 (3,8%)	0,121	2,04 (0,81-5,11)	0,18

OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; modelo dominante (homozigoto selvagem vs. homozigoto polimórfico + heterozigoto); Val/Val: homozigoto selvagem, Val/Ile: heterozigoto, Ile/Ile: homozigoto polimórfico; *wt/wt*: homozigoto selvagem; *wt/Δ32* heterozigoto.

Não houve associação de risco do alelo *CCR2-64Ile* com os critérios de alto risco segundo D'Amico (OR=1,45; 95% IC=0,69-3,02; *p*=0,40 para PSA \geq 20, OR=0,59; 95% IC=0,26-1,36; *p*=0,29 para TNM com tumor \geq 2Tc e OR=1,21; 95% IC=0,61-2,43; *p*=0,71 para escore de Gleason). Não se verificou diferença estatisticamente significativa entre os grupos com alelos selvagens e o grupo portador do polimorfismo ao se comparar indivíduos portadores de metástases com indivíduos sem metástases (OR=3,09; 95% IC=0,68-14,05; *p*=0,21) (Tabela 6).

Tabela 6. Caracterização dos casos de CaP conforme os critérios de estratificação de risco de D'Amico e presença de metástase nos grupos com e sem a presença do polimorfismo *CCR2-Val64Ile*

Variáveis	<i>CCR2-Val64Ile</i>		<i>p</i>	OR (95% IC)	<i>p</i>
	Val/Val n (%)	Val/Ile + Ile/Ile n (%)			
PSA (ng/mL) (n = 153)					
<20	61 (69,1)	26 (30,9)			
≥20	51 (77,27)	15 (22,73)	0,322	1,45 (0,69-3,02)	0,40
TNM (n = 178)					
<T2c	129	49			
≥T2c	39 (81,25)	9 (18,75)	0,111	0,59 (0,26-1,36)	0,29
Gleason (n = 180)					
≤7	83 (70,33)	35 (29,66)			
≥8	46 (74,19)	16 (25,8)	0,580	1,21 (0,61-2,43)	0,71
Metástase (n = 178)					
M0 + Mx	114 (70,8)	47 (29,2)			
M1	15 (88,3)	2 (11,7)	0,115	3,09 (0,68-14,05)	0,21

OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; Val/Val: homocigoto selvagem, Val/Ile: heterocigoto, Ile/Ile: homocigoto polimórfico. As diferenças entre os grupos foram testadas por meio do qui-quadrado ou teste Exato de Fisher, conforme adequação dos dados e expresso na coluna *p*.

A presença do polimorfismo *CCR5-Δ32* não implicou em diferença estatisticamente significativa quanto aos critérios de estratificação de risco segundo D'Amico (OR=1,01; 95% IC=0,22-4,68; *p*=0,7 para PSA e OR=3,21; 95% IC=0,39-27,32; *p*=0,47 para escore de Gleason). Para os critérios TNM e metástase não foi possível realizar a verificação de OR, uma vez que não houve registros do polimorfismo no grupo <T2c e presença de metástase (Tabela 7). Os grupos homocigotos selvagens e heterocigotos não apresentaram diferença significativa estatisticamente (*p*=0,104). Não foi possível realizar o teste para as características TNM e metástases em virtude da ausência de indivíduos heterocigotos nas duas situações.

Tabela 7. Caracterização dos casos de CaP conforme os critérios de estratificação de risco de D'Amico e presença de metástase nos grupos homocigotos selvagens e heterocigotos para *CCR5-Δ32*.

Variáveis	<i>CCR5-Δ32</i>		<i>p</i>	OR (95% IC)	<i>p</i>
	<i>wt/wt</i> n (%)	<i>wt/Δ32</i> n (%)			
PSA (ng/mL) (n = 153)					
<20	83 (95,4)	4 (4,6)			
≥20	63 (95,7)	3 (4,3)	0,650	1,01 (0,22-4,68)	0,70
TNM (n = 178)					
<T2c	48 (100)	0			
≥T2c	122 (94,6)	7 (5,4)	0,104	-	-
Gleason (n = 180)					
≤7	112 (94,9)	6 (5,1)			
≥8	60 (98,3)	1 (1,7)	0,244	3,21 (0,39-27,32)	0,47
Metástase (n = 178)					
M0 + Mx	154 (95,7)	7 (4,3)			
M1	17 (100)	0	0,489	-	-

wt/wt: homocigoto selvagem; *wt/Δ32*: heterocigoto; OR: odds ratio. IC: intervalo de confiança. As diferenças entre os grupos foram testadas por meio do qui-quadrado ou teste Exato de Fisher, conforme adequação dos dados e expresso na coluna *p*.

6. DISCUSSÃO

O entendimento do câncer, bem como os aspectos que influenciam seu desfecho, são de interesse mundial. O câncer de maior incidência entre os homens no Brasil, excluindo-se o câncer de pele não melanoma, é o CaP, cuja mortalidade em números totais vem aumentando principalmente em países desenvolvidos (INCA, 2014). A resposta inflamatória mostrou ser parte crucial na evolução do câncer e seu estudo tem ajudado no esclarecimento dos mecanismos que medeiam a resposta aos tratamentos disponíveis e no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Aumento de expressão de quimiocinas e seus receptores estão implicados no tráfico de células de resposta imune para a lesão cancerosa. O papel dos receptores de quimiocinas tem sido evidenciado em fases como proliferação tumoral, fuga aos mecanismos de morte celular, angiogênese e invasividade. Entre os receptores de quimiocinas implicados nesses fenômenos encontram-se o CCR2 e o CCR5 (ALLAVENA, 2011).

No presente estudo caso-controle, investigamos a associação dos polimorfismos *CCR2-Val64Ile* e *CCR5-Δ32* com a susceptibilidade e a agressividade do CaP em uma população do Nordeste do Brasil. Nossos resultados demonstraram, para o grupo caso, (n=185), uma frequência de 14,85% do alelo *CCR2-64Ile* e de 1,9% do alelo *CCR5-Δ32*; enquanto que no grupo controle, (n=185), a frequência de *CCR2-64Ile* foi 16,41% e a de *CCR5-Δ32* foi 3,8%.

A distribuição de *CCR2-64Ile* foi observada na população geral brasileira, apresentando-se conforme descrito a seguir: região Norte, 12,4% (n=112), Nordeste 13,9%, (n=223), Sudeste 11% (n=82) e Sul 14%, (n=118). As frequências de *CCR5-Δ32* na população geral também foram relatadas, encontrando-se distribuídas da seguinte forma: Norte 2,2%, (n=139), Nordeste 1,8%, (n=223), Sudeste 5,5%, (n=82), no Sul 5,1% (n=118) (CAVALHAES et al., 2005; RIGATO et al., 2008; ZAMBRA et al., 2013; FERREIRA-FERNANDES et al., 2015).

O Brasil apresenta composição étnica própria em cada região, dado a extensão territorial e a história de colonização. Este aspecto é exemplificado pela heterogeneidade das prevalências dos polimorfismos *CCR2-Val64Ile* e *CCR5-Δ32*. Estudo realizado na população do Piauí evidenciou, com base em informação de frequência genotípica de marcadores informativos de ancestralidade, que as contribuições de populações parentais

foram 60% provenientes de europeus, 21,5% de africanos e 18,5% de nativos americanos (LOPES et al., 2014). A sobreposição de etnias no Brasil é intensa, fato resultado de séculos de intensa miscigenação (PARRA et al., 2002). Tal aspecto pode explicar a distribuição das prevalências observadas nos estudos acima. Assim, populações que tiveram contribuição de ancestralidade mais influenciada por grupos com mais alta prevalência de determinados polimorfismos, tendem a apresentar frequências aproximadas às da população originária. Este fato foi observado no Sul do Brasil com *CCR5-Δ32*, em uma população com 83,5% de eurodescendentes (ZAMBRA et al., 2013).

Estudos de frequências alélicas de *CCR2-64Ile* em torno do mundo encontraram, na população geral, variações indo desde 9,8% na Europa (Espanha, n=500), passando a 17,5% no Oriente Médio (Jordânia, n=540), África, com 18,7% (Camarões, n=179), alcançando 23% na Ásia (China, n=388) e América do Sul, com 23,1% (Colômbia, n=112). Nos mesmos trabalhos, a frequência do alelo menor *CCR5-Δ32* apresentou distribuição mais restrita, estando virtualmente ausente na África (0%), Ásia (0,001%) e Oriente Médio (0,534%), atingindo frequências maiores na América do Sul (2,23%) e na Europa (9,4%) (SOTO-SÁNCHEZ, et al., 2010; KHABOUR et al., 2013; NKENFOU, et al., 2013; ZAPATA et al., 2013; LI, et al., 2014).

Nossa amostra não evidenciou associação entre a susceptibilidade ao CaP e a presença do alelo *CCR2-64Ile*, quando o genótipo de referência Val/Val foi comparado com os genótipos Val/Ile + Ile/Ile combinados (OR=1,14; 95% IC=0,73-1,7; $p=0,63$). Da mesma forma, a presença de alelo *CCR5-Δ32* não foi associado ao CaP (OR=0,48; 95% IC=0,19-1,22; $p=0,18$).

Ao nosso conhecimento, apenas quatro estudos consideraram especificamente a associação dos polimorfismos *CCR2-Val64Ile* e *CCR5-Δ32* com a susceptibilidade ao CaP e, mesmo assim, com resultados contraditórios. Kucukgergin et al. (2012), em uma amostra de indivíduos na Turquia (n=308; casos=156, controles=152), observaram aumento da incidência de CaP em indivíduos portadores do alelo *CCR2-64Ile* (OR=1,34; 95% IC=1,03-1,75; $p=0,028$). Petersen et al. (2008), em estudo realizado em pacientes australianos eurodescendentes (n=1.553; casos=815, controles=738) não demonstraram associação do polimorfismo *CCR2-Val64Ile* (OR=1,02; 95% CI=0,79-1,32; $p=0,86$) com a ocorrência do CaP. A exclusão de casos de diagnóstico tardio (≥ 70 anos) e pouco diferenciados (Gleason < 5), deixa claro o direcionamento do estudo para CaP avançado.

Em uma amostra de homens no Sul do Brasil (n=255; casos=136, controles=119), Zambra et al. (2013) falharam em demonstrar a associação da presença de pelo menos um alelo *CCR2-64Ile* com a ocorrência de CaP (OR = 0,786; 95% IC=0,422–1,464; $p=0,448$). No entanto, os mesmos autores relataram uma associação estatisticamente significativa da presença do alelo *CCR2-64Ile* com a proteção ao CaP, quando o grupo caso foi comparado a indivíduos com hipertrofia prostática benigna (OR=0,550; 95% IC=0,311–0,975; $p=0,041$). Mais recentemente, Mandal et al. (2015), em estudo realizado na Índia (n=445; casos=195, controles=250), não encontraram associação do polimorfismo *CCR2-Val64Ile* com a ocorrência de CaP (OR=0,89; 95% IC=0,60–1,30; $p=0,554$). Pelo exposto, nossos resultados corroboram com os de Petersen et al. (2008), Zambra et al. (2013) e Mandal et al. (2015).

Os estudos de Petersen et al. (2008) não encontraram associação entre *CCR5-Δ32* e susceptibilidade ao CaP (OR=1,00; 95% IC=0,80-1,25; $p=0,98$). O mesmo estudo detectou aumento da susceptibilidade com o aumento do número de parentes de primeiro grau acometidos por CaP, para dois ou mais parentes de primeiro grau afetados (OR=2,3; 95% IC=1,13-4,68; $p=0,04$). Esta observação induz à suspeita de que outros fatores existentes dentro de um grupo familiar podem incrementar a associação entre *CCR5-Δ32* e CaP. O mesmo trabalho relatou que, a despeito da amostra numericamente superior, não poderia excluir associação moderada entre *CCR5-Δ32* e CaP. Zambra et al. (2013) não observaram associação entre *CCR5-Δ32* e CaP (OR=1,142; 95% IC=0,476–2,739; $p=0,767$). Por outro lado, Kucukgergin et al. (2012) apresentaram resultados que associaram o alelo *CCR5-Δ32* à susceptibilidade ao CaP (OR=3,26; 95% IC=1,05–10,1; $p=0,030$), porém não à agressividade ($p>0,05$). Um aspecto que chama atenção nos estudos citados é o fato de que foram realizados em amostras com característica de agressividade diferenciada da nossa amostra. Para as amostras de Kucukgergin et al. (2012) e Zambra et al. (2013), houve predomínio de escore de Gleason < 7 ($p<0,05$), enquanto Petersen et al. (2008), a amostra apresentava, como já mencionado, indivíduos com CaP mais avançado. Recente meta-análise conduzida com 16 estudos em amostras de população de europeus, turcos, indianos e sul-americanos falhou em revelar associação entre o polimorfismo *CCR5-Δ32* e susceptibilidade ao CaP (OR=1,8; 95% IC=0,91–3,46; $p=0,091$) (LEE e SONG, 2014).

Duas isoformas de *CCR2* podem ser produzidas por *splicing* alternativo: as isoformas *CCR2A* e *CCR2B*. Nakayama et al. (2004), observaram que o alelo *CCR2-64Ile*

promove aumento da expressão da isoforma CCR2A, que fica retida no complexo de Golgi, expressando-se pouco em superfície celular, em comparação com CCR2B. Observaram, ainda, que CCR2A produzido por *CCR2-64Ile* apresenta meia-vida prolongada em comparação à mesma proteína produzida por *CCR2-64Val*. O fato ocorre devido a maior velocidade de degradação da CCR2A produzida por *CCR2-64Val*. Estes autores também verificaram que CCR2A, acumulada no citoplasma forma heterodímeros com CCR5, inibindo o eixo CCL5/CCR5. CCR2A proveniente de *CCR2-64Ile* interferiu mais severamente com a expressão de CCR5 que a isoforma CCR2 produzida pelo alelo selvagem. Ressalte-se que a ação de CCR2A, quando expresso em superfície, é equivalente à de CCR2B. Banin-Hirata et al. (2014) relataram associação do polimorfismo *CCR2-Val64Ile* e câncer de mama HER2⁺ e propuseram que o pior prognóstico desse grupo seria devido aos achados descritos por aqueles autores. O mecanismo de ação de *CCR2-64Ile*, portanto, pode estar fundamentado na prevenção da ação de CCR5.

Com relação à agressividade, Kucukgergin et al. (2012) relataram que a presença de pelo menos um alelo polimórfico *CCR2-64Ile* está associado a estadiamento T elevado (OR=1,56; 95% IC=1,02–2,38; $p=0,039$) e à chance de desenvolver metástase (OR=1,74; 95% IC=1,08–2,80; $p=0,022$), quando comparados a indivíduos homocigotos selvagens. Por outro lado, Mandal et al. (2015), não observaram associação entre características histopatológicas por escore de Gleason (OR=0,84; 95% IC=0,39–1,78; $p=0,655$), nem presença de metástases (OR=1,27; 95% IC=0,69–2,36; $p=0,432$), com o polimorfismo *CCR2-Val64Ile*. Da mesma forma, no Sul do Brasil, Zambra et al. (2013) falharam ao demonstrar associação do polimorfismo *CCR2-Val64Ile* com o escore de Gleason (OR=0,877; 95% IC=0,355–2,165; $p=0,822$) e com estadiamento T (OR=1,450; 95% IC=0,592–3,552; $p=0,492$). Nossos resultados corroboram com os estudos de Mandal et al. (2014) e Zambra et al. (2013), uma vez que não encontramos associação entre o alelo *CCR2-64Ile* e a agressividade do CaP [PSA \geq 20 (OR=1,45; 95% IC=0,69–3,02; $p=0,4$), T (OR=0,59; 95% IC=0,26–1,36; $p=0,29$), Gleason (OR=1,21; 95% IC=0,61–2,43; $p=0,4$)].

Lança et al. (2015) estudaram a participação do eixo CCL2/CCR2 na atração de linfócitos T $\gamma\delta$. Este subgrupo de linfócitos é implicado em morte de células tumorais, funcionando como forma de controle do câncer. Tumores mais avançados apresentam redução da expressão de CCL2, prevenindo a morte das células cancerosas. Anteriormente, Lu et al. (2007) já haviam demonstrado o aumento de expressão de CCR2 correlacionando-

se com a progressão do CaP tanto em escore de Gleason quanto no estadiamento T. A menor expressão de CCR2A, proveniente de *CCR2-64Ile*, pode reduzir atração de linfócitos T $\gamma\delta$ em tumores primários, aumentando, desta forma, a predisposição ao CaP (KUCUKGERGIN et al., 2012). Paralelamente, a redução da resposta a CCL2 tumor primário, implicaria em diminuição do efeito quimioatrativo para macrófagos. Estes últimos apresentam importante papel pró-tumoral via indução de tráfico de células T sem efeito citotóxico (ALLAVENA et al., 2011). O efeito final dependeria do balanço entre o afluxo de linfócitos T $\gamma\delta$ (menor pela menor expressão de CCR2A) e a atração de macrófagos T sem efeito citotóxico. Uma vez instalado o CaP, com aumento da expressão de CCR2 as vias moleculares que estabelecem a agressividade podem ocorrer independentemente do eixo CCL2/CCR2. Sendo assim, o polimorfismo *CCR2-Val64Ile* não teria influência sobre CaP avançado, a despeito de sua expressão aumentada em fase tardia. Este mecanismo pode explicar por que indivíduos em fase adiantada do CaP, como ocorreu na nossa amostra, não apresentam associação com os polimorfismos em estudo.

A caracterização das células imunes atraídas para o CaP mediante a ocorrência de *CCR5 Δ 32* foi estudada por Magnani et al. (2012). Considerando que linfócitos TCD8⁺ apresentam efeito citotóxico, os pesquisadores observaram a relação entre linfócitos TCD4⁺/TCD8⁺ após a administração de carboximetil-glucan. Foi observada uma diferença estatisticamente significativa na relação entre estes linfócitos. Neste estudo, a relação aumentou após o tratamento em pacientes portadores de *CCR5- Δ 32*. Desta forma, concluiu-se que a presença do receptor na superfície celular, é importante para que a resposta citotóxica seja melhorada com o uso da substância. O estudo foi conduzido com pacientes com CaP avançado. Como o polimorfismo leva a supressão da resposta imune, os indivíduos carreadores de *CCR5- Δ 32* seriam menos afetados pelo efeito do fármaco testado. O desejável, no caso, é aumento de linfócitos TCD8⁺, portanto, a relação TCD4⁺/TCD8⁺ deve ser diminuída e o que se observou foi um aumento de 1,98 para 2,21 nos pacientes portadores de *CCR5- Δ 32*. Já nos indivíduos homozigotos portadores do genótipo selvagem, a relação baixou de 1,7 para 1,55.

Nossa amostra foi composta por indivíduos com estadiamento T e escore Gleason avançados (73,03% T \geq 2Tc e 85,55% Gleason \geq 7). CaP de maior agressividade pode ter influenciado na diferença observada entre os nossos resultados e os do estudo realizado por Kucukgergin et al. (2012) (escore de Gleason \geq 7; $p < 0,05$). Ao contrário, nossos resultados foram semelhantes aos encontrados no estudo realizado no Sul do Brasil, porém, a amostra

analisada por Zambra et al. (2013) foi composta de indivíduos de ascendência europeia em sua maioria (83,5%), além de menor agressividade (escore de Gleason ≥ 7 ; $p < 0,05$). Apesar de os resultados obtidos terem sido semelhantes aos nossos, chamamos atenção para a possibilidade de outros aspectos serem responsáveis pelo achado. Entre estes estão a presença de outros polimorfismos nos genes estudados e, mesmo, elementos ambientais que diferenciem as duas populações.

Considerando o polimorfismo *CCR5-Δ32*, nosso estudo não encontrou associação com agressividade no CaP quanto ao PSA (OR=1,01; 95% IC=0,22-4,68; $p=0,7$) nem quanto ao escore de Gleason (OR=3,21; 95% IC=0,39-27,32; $p=0,47$). Avaliação com relação à presença de metástases foi impossibilitada pela ausência de indivíduos com o polimorfismo neste subgrupo. Estudo realizado em população no Sul do Brasil, da mesma forma, não verificou associação de *CCR5-Δ32* e a agressividade do CaP, para o estadiamento T (OR=1,372; 95% IC 0,448–4,201; $p=0,581$) nem para escore de Gleason (OR=0,433; 95% IC=0,127–1,470; $p=0,253$) (ZAMBRA et al., 2012). Nossos resultados foram compatíveis com os de Kucukgergin et al. (2012) e Zambra et al. (2013). Note-se, ainda, que nenhum paciente portador *CCR5-Δ32* apresentou metástase, o que pode significar um efeito preditor de melhor prognóstico em pacientes com CaP avançado. Esta observação carece de confirmação em estudos com amostras maiores; no entanto, recentemente, Banin-Hirata et al. (2015), em estudo com pacientes portadores de câncer de mama, observaram que todas as pacientes com sobrevida livre de doença eram carreadoras de *CCR5-Δ32*, também sugerindo seu papel como preditor de bom prognóstico.

Nossa amostra foi composta de pacientes com estadiamento avançado ao momento do diagnóstico e de composição étnica miscigenada. Tais características podem ser os motivos das diferenças observadas ao ser comparado com estudos que avaliaram associação com susceptibilidade e agressividade. Também não podemos descartar a ocorrência de outros polimorfismos de *CCR2* e *CCR5* que, estando em desequilíbrio de ligação com os aqui estudados, venham a influenciar os resultados obtidos. Mandal et al. (2015) evidenciaram a interação de *CCR2-Val64Ile* e *CCL2 rs3917887* com susceptibilidade aumentada ao CaP (OR=2,44; 95% IC=1,41-4,23; $p=0,008$). Outros polimorfismos de *CCR5* foram estudados em afrodescendentes, nos quais a frequência do alelo *CCR5-Δ32* é baixa. Kidd et al. (2012), por exemplo, observaram que o polimorfismo *CCR5 rs1799988* foi associado a maior susceptibilidade ao CaP (OR=1,52; 95% IC=1,02–2,26; $p < 0,001$) (n=814; casos=279, controles=535).

Nossos resultados não identificaram associação entre os polimorfismos *CCR2-Val64Ile* e *CCR5-Δ32* e CaP em uma população no Nordeste do Brasil. Efeito preditor de melhor prognóstico de *CCR5-Δ32* poderá ser avaliado em amostra com maior número de indivíduos. Além disto, nossa amostra foi composta de indivíduos com CaP avançado em sua maioria, aspecto apenas antes verificado em dois estudos. Mesmo assim, um deles apresentou número reduzido de casos e o segundo foi composto de indivíduos de ascendência predominantemente eurodescendente.

7. CONCLUSÕES

A genotipagem das amostras obtidas nos permitiu observar que, para *CCR2*, entre os casos, houve prevalência de indivíduos com genótipo Val/Val (71,5%), seguido de Val/Ile(26,3%) e de Ile/Ile (3%). O alelo Val apresentou-se em frequência de 85,13%, enquanto o alelo Ile apresentou-se em 14,86% dos indivíduos. Para o gene *CCR5*, o genótipo *wt/wt* apresentou frequência de 96,76%, enquanto *wt/Δ32* representou 3,24% dos indivíduos e o alelo *wt* representou 98,1%, enquanto $\Delta 32$ foi observada em 1,9% dos mesmos.

Os indivíduos do grupo controle também foram distribuídos conforme frequências genóticas e alélicas. Quanto a *CCR2* para Val/Val, Val/Ile e Ile/Ile, foram de 68,8%, 28,45% e 2,1% respectivamente. O alelo Val ocorreu em 83,5% dos indivíduos, enquanto Ile ocorreu em 16,41%. Quanto a *CCR5* apresentou distribuição genotípica *wt/wt* em 92,97% e *wt/ Δ32* em 7,56%. Já as frequências alélicas foram de 96,2% para *wt* e 3,8% para $\Delta 32$.

Observou-se que houve moderado desequilíbrio de ligação entre *CCR2-64Ile* e *CCR5 Δ32* ($D'=0,559$; $r^2=0,001$).

Não houve associação estatisticamente significativa entre a ocorrência dos alelos *CCR2-64Ile* e *CCR5 Δ32* com a ocorrência do CaP na população estudada.

Não observamos associação estatisticamente significativa entre a presença dos polimorfismos *CCR2-64Ile* e *CCR5 Δ32* e os critérios de estratificação de risco segundo D'Amico (PSA, TNM, Gleason) e presença de metástase.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. Cap 20.

ALLAVENA, P.; GERMANO G.; MARCHESI F.; MANTOVANI A. **Chemokines in cancer related inflammation**. Experimental Cell Research. 2011. 318: 95-102.

ALLEMANI, C et al. **Global surveillance of cancer survival 1995–2009: analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2)**. Lancet. 2015. 977-1010.

ANDRADE, E S. **Desequilíbrio de ligação em blocos de haplótipos determinados pela análise de 250K SNPs em três remanescentes de quilombos**. 2013. Tese (Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Genética). Faculdade de Medicina de Ribeirão, Ribeirão Preto. São Paulo.

BAGGIOLINI, M. **CXCL8 – The first chemokine**. Frontiers in Immunology 6. 2015. 285.

BAGGIOLINI, M. Chemokines in pathology and medicine. Journal of Internal Medicine. 2011.

BAYNE, C E et al. **Treatment of the Primary Tumor in Metastatic Prostate Cancer: Current Concepts and Future Perspectives**. European Urology. 2015.

BENKIRANE, M et al. **Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by CCR5delta32**. The Journal of Biological Chemistry. 1997.

BINDEA, G et al. **The Immune landscape of human tumors: Implications for cancer immunotherapy**. Oncoimmunology. 2013.

BORING L. et al. **Impaired Monocyte Migration and Reduced Type 1 (Th1) Cytokine Responses in C-C Chemokine Receptor 2 Knockout Mice**. The Journal of Clinical Investigation. 1997.

BRASIL. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil** Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: INCA; 2013.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **TMN: classificação de tumores malignos**. 6 ed Rio de Janeiro: INCA, 2004.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Programa nacional de controle do câncer da próstata: documento de consenso.** - Rio de Janeiro: INCA, 2002.

_____. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Projeção da população do Brasil e das Unidades da Federação.** Disponível em <http://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/> acesso em novembro 2014.

BURG, J. S., et al. **Structural basis for chemokine recognition and activation of a viral G protein-coupled receptor.** American Association for the Advancement of Science. 2015.

CARTER, H B, et al. **Early Detection of Prostate Cancer: AUA Guideline.** The Journal of Urology. 2013; 419-426.

CARVALHAES et al. **Frequencies of CCR5-Δ32, CCR2-64I and SDF1-3'A mutations in Human Immunodeficiency Virus (HIV) seropositive Subjects and seronegative Individuals from the State of Pará in Brazilian Amazonia.** Genetics and Molecular Biology. 2005.

CHEE, L., et al. **Clinical implications of family history of prostate cancer and genetic risk single nucleotide polymorphism (SNP) profiles in an active surveillance cohort.** National Institute of Health. 2013.

COBELLI, O., et al. **Predicting pathological features at radical prostatectomy in patients with prostate cancer eligible for active surveillance by multiparametric magnetic resonance imaging.** Plos One. 2015.

D'AMICO, A. V. et al. **Biochemical Outcome After Radical Prostatectomy, External Beam Radiation Therapy, or Interstitial Radiation Therapy for Clinically Localized Prostate Cancer.** JAMA. 1998.

DUSKOVA, K.; VESELY S. **Prostate Specific Antigen. Current clinical application and future prospects.** Biomedic Papers. 2015.

ELKAHWAJI, J. E. **The role of inflammatory mediators in the development of prostatic hyperplasia and prostate cancer.** Research and Report in Urology. 2012.

EISENBERG, A. L. A. **TNM: classificação de tumores malignos.** INCA. Rio de Janeiro. 2004.

FERREIRA-FERNANDES, H. et al. **Prevalence of CCR5-Δ32 and CCR2-V64I polymorphisms in a mixed population from northeastern Brazil.** Genetics and Molecular Research. 2015.

FRANCO, L. J. e PASSOS, A. D. C. **Fundamentos de Epidemiologia**. São Paulo: Manole, 2005.

Good Health Adds life to Years. Global Brief for World Health Day. Organização Mundial de Saúde. Genebra.2012. Disponível em <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70853/1/WHO_DCO_WHD_2012.2_eng.pdf

GONZÁLEZ-MARTIN, A. MIRA, E. e MAÑES S. **CCR5 in câncer immunotherapy. More than an attractive receptor for T cells**. Oncoimmunology. 2012.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Introdução à Genética**. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, página 552.

HANAHAN, D. e COUSSENS L. M. **Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment**. Cell. 2011.

HANAHAN, D. e WEINBERG, R. A. **Hallmarks of Cancer: The Next Generation**. Cell. 2011.

HEIDENREICH, A. et al. **Early detection of prostate cancer: European Association of Urology recommendation**. European Urology. 2013; 347-354.

HUGOSSON, J. et al. **Mortality results from Goteborg randomized population-based prostate-cancer screening trial**. Lancet Oncology. 2010; 11:725-32.

JAIN, S.; SAXENA, S.; KUMAR, A. **Epidemiology of prostate cancer in India**. Meta Gene. 2014; 596 – 605.

JORDE, L. B.; CAREY, J. C.; BAMSHAD, M. J. **Genética Médica**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier. cap 9.

KHABOUR, O. F. et al. **Distribution of CCR-5Δ32, CCR2-64I, and SDF-1-3'A Alleles among Jordanians**. AIDS Research and Human Retroviruses. 2013.

KIDD, L. R. et al. **Chemokine Ligand 5 (CCL5) and chemokine receptor (CCR5) genetic variants and prostate cancer risk among men of African Descent: a case-control study**. Hereditary Cancer in Clinical Practice. 2012.

KUCUKGERGIN, C. et al. **Association of Polimorfisms in MCP-1, CCR2 and CCR5 Genes with the Risk and Clinicopathological Characteristics of Prostate Cancer**. DNA and Cell Biology. 2012; 1-7.

KUMAR, V. Y.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. ASTER, J. C. **Robins & Cotran. Patologia Bases Patológicas das Doenças**. 8ª ed. 2010. Rio de Janeiro-RJ: Elsevier.

LEE, Y. H. e SONG, G. G. **Association between chemokine receptor 5 delta32 polymorphism and susceptibility to cancer: a meta-analysis**. Journal of Receptors and Signal Transduction. 2014.

- LI, H. et al. **Gene polymorphisms in CCR5, CCR2, SDF1 and RANTES among Chinese Han population with HIV-1 infection.** Infection, Genetics and Evolution. 2014
- LILJA, H. et al. **Prediction of Significant Prostate Cancer Diagnosed 20 to 30 Years Later With a Single Measure of Prostate-Specific Antigen at or Before Age 50.** Cancer 2011;117:1210–9.
- LIU, R. et al. **Homozygous Defect in HIV-1 Coreceptor Accounts for Resistance of Some Multiply-Exposed Individuals to HIV-1 Infection.** Cell. Vol. 86,1996; 367–377.
- LOPES, T. R. et al. **Population data of the 46 insertion–deletion (INDEL) loci in population in Piauí State,Northeastern. Brazil.** Forensic Science International: Genetics. 2014.
- MA, Y. et al. **Chemokines and chemokine receptors required for optimal responses to anticancer chemotherapy.** Oncoimmunology. 2014.
- MACHUCA, M. A.; et al. **SNP/ haplotypes associations of CCR2 and CCR5 genes with severity of chagasic cardiomyopathy.** Human Immunology 75. 2014; 1210-1215.
- MAGNANI, M. et al. **Analysis of peripheral T cells and the CC chemokine receptor (CCR5) delta32 polymorphism in prostate cancer patients treated with carboxymethylglucan (CM-G).** Natural Product Research.2012.
- MANTOVANI, A.; et al. **The chemokine sistem in cancer biology and therapy.** Cytokine & Growth Factor Reviews 21. 2010; 27–39.
- MARUTHAPPU, M., et al. **Incidence of prostate and urological cancers in England by ethnic group, 2001-2007: a descriptive study.** BMC Cancer. 2015.
- MEDEIROS, V. Z., et al. **Métodos Quantitativos com Excel.** São Paulo- SP. Cengage Learning. 2008.
- MITSUYASU, R. **Curing HIV: lessons from cancer therapy.** Current Opinion HIV AIDS. 2013.
- MOHLER, J. et al. **Prostate Cancer Clinical Practice Guidelines in Oncology TM.** Journal of National Comprehensive Cancer Network. 2010: 162-200.
- MUKAIADA, N. e BABA, T. **Chemokines in tumor development and progression.** Experimental and Cell Research. 2012 ; 95 – 102.
- NAKAYAMA, E. E. et al. **A CCR2-V641 polymorphism affects stability of CCR2A isoform.** Aids. 2004.

NKENFOU, C. N. et al. **Distribution of CCR5-Delta32, CCR5 promoter 59029 A/G, CCR2-64I and SDF1-3'A genetic polymorphisms in HIV-1 infected and uninfected patients in the West Region of Cameroon.** BMC Research Notes. 2013.

PARRA, F. C. et al. **Color and genomic ancestry in Brazilians.** PNAS. 2002.

Pathology and genetics of tumors of urinary system and male genital organs. **WHO:** Lyon, 2004. Disponível em: <<http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/bb7/BB7.pdf>>.

PEI, X. et al. **PC3-Secreted Microprotein Is a Novel Chemoattractant Protein and Functions as a High-Affinity Ligand for CC Chemokine Receptor 2.** The Journal of Immunology. 2014.

PETERSEN, D. C. et al. **No Association between Common Chemokine and Chemokine Receptor Gene Variants and Prostate Cancer Risk.** Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. 2008.

PLOUSSARD, G., et al. **Can We Expand active surveillance criteria to include biopsy Gleason 3 + 4 prostate cancer? A multi-institutional study of 2,323 patients.** Urologic Oncology. 2015; 71.e1–71.e9.

PRESTON, M. A., et al. **Active surveillance for low-risk prostate cancer: Need for intervention and survival at 10 years.** Urologic Oncology. 2015.

RIGATO, P. O. et al. **Better CD4+ T Cell Recovery in Brazilian HIV-Infected Individuals Under HAART Due to Cumulative Carriage of SDF-1-3'A, CCR2-64I, CCR5-D32 and CCR5-Promoter 59029A/G Polymorphisms.** Current HIV Research. 2008.

RODRIGUES, D. N., et al. **Molecular pathology and prostate cancer therapeutics: from biology to bedside:** J Pathol 2014; 232: 178–184.

RODRIGUES, G., et al. **Pre-treatment risk stratification of prostate cancer patients: A critical review.** Cancer Urology Association. 2012; 121-127.

SANTOS, G. E. O. **Cálculo amostral: calculadora on-line.** Disponível em: <<http://www.calculoamostral.vai.la>>. Acesso em: [10/11/2015].

SCHUITEMAKER, H.; WOUT, A. B.; LUSSO, P. **Clinical significance of HIV-1 coreceptor usage.** Journal of Translational Medicine 2010, 9(Suppl 1):S5.

SILVA, G. A., et al. **Tendência da Mortalidade por câncer nas capitais e interior do Brasil entre 1980 e 2006.** Revista de Saúde Pública. 2011; 45(6): 1009-18.

SOTO-SÁNCHEZ, J. et al. **Genetic variation at the CCR5/CCR2 gene cluster and risk of psoriasis and psoriatic arthritis.** Cytokine. 2010.

SOUTO, F. O. et al. **Essential Role of CCR2 in Neutrophil Tissue Infiltration and Multiple Organ Dysfunction in Sepsis.** American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2011. 234-242.

SUN, T. et al. **Inherited Variants in the Chemokine CCL2 Gene and Prostate Cancer Aggressiveness in a Caucasian Cohort.** Clinic Cancer Research. 2011.

TABESH, A. et al. **Multifeature Prostate Cancer Diagnosis and Gleason Grading of Histological Images.** Ieee Transactions On Medical Imaging. 2007.

TSAUR, I., et al. **CCL2 Chemokine as a Potential Biomarker for Prostate Cancer: A Pilot Study.** Cancer Research. 2015. 306-312.

VANCAPELLEN, H., et al. **The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) regulates prostate tumor growth.** FASEB J. 20. 2006; 59-64.

VANDERCAPPELLEN, J.; VAN DAMME, J.; STRUYF, S. **The role of CXC chemokines and their receptors in cancer.** Cancer Letters. 2008; 226 – 244.

WEIR, H K, et al. **Meeting the Healthy People 2020 Objectives to Reduce Cancer Mortality. Preventing Chronic Disease.** Public Health Research, Practice and Policy. 2015.

VICKERS, A. J.; LILJA, H. **Predicting prostate cancer many years before diagnosis: How and Why?** World Journal Urology. 2012.

YASMIN, R., et al. **Epigenetic Regulation of Inflammatory Cytokines and Associated Genes in Human Malignancies.** Mediators of Inflammation. 2015.

ZAMBRA, F. M. B., et al. **CCR2 and CCR5 genes polymorphisms in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer.** Human Immunology 74. 2013; 1003 - 1008.

ZAPATA, W. et al. **Influence of CCR5 and CCR2 Genetic Variants in the Resistance/Susceptibility to HIV in Serodiscordant Couples from Colombia.** Aids Research And Human Retroviruses. 2013.