

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E

HEPATOLOGIA

ESTUDO DO POLIMORFISMO CCR2-64I EM PACIENTES INFECTADOS PELO

HCV

RIANA AUGUSTA BEVILAQUA DE BEM

PORTO ALEGRE

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E

HEPATOLOGIA

ESTUDO DO POLIMORFISMO CCR2-64I EM PACIENTES INFECTADOS PELO

HCV

RIANA AUGUSTA BEVILAQUA DE BEM

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia.

Orientador: Dr. José Artur Bogo Chies

PORTO ALEGRE

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Dauber Bevilaqua de Bem, Riana Augusta
ESTUDO DO POLIMORFISMO CCR2-64I EM PACIENTES
INFECTADOS PELO HCV / Riana Augusta Dauber Bevilaqua
de Bem. -- 2019.
73 f.
Orientador: José Artur Bogo Chies.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e
Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Hepatite C. 2. Hepatocarcinoma. 3. CCR2. 4.
CCR2-64I. 5. Polimorfismos. I. Bogo Chies, José Artur,
orient. II. Título.

“Dedico esse trabalho, com muito amor e gratidão, à minha mãe Rosana, pai Ricardo, avó Hilda e tia Susana. Eles nunca não mediram esforços para lutar por minha educação. Essa conquista é nossa!”.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao Zeca. Muito obrigada por aceitar me orientar, pela oportunidade, experiência e por me incluir no Laboratório de Imunobiologia e Imunogenética ao lado de pessoas incríveis e dispostas a ajudar e ensinar neste curto espaço de tempo. Agradeço enormemente por acreditar no meu potencial, por ter me guiado e incentivado a dar o meu melhor. Sou muito grata por toda a dedicação, paciência e principalmente pela amizade.

À minha família por todo amor, suporte e insistência para que a realização deste fosse possível. Principalmente à minha mãe, que sempre insistiu para eu seguir essa carreira.

Ao meu marido Bruno, pelo incentivo no término deste trabalho, pelo suporte para que a realização fosse possível, pela compreensão e ausência em alguns períodos, paciência, amor e carinho todos os dias. Estares ao meu lado foi fundamental para a concretização desta etapa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro através da bolsa de mestrado.

A todos do Laboratório de Imunobiologia e Imunogenética, por ter me recebido tão bem. Principalmente ao Joel, Rafael e Valéria, sem vocês com certeza o desenrolar desse trabalho seria bem mais difícil. Agradeço o apoio, auxílio e a amizade.

Ao Programa de Pós Graduação de Gastroenterologia e Hepatologia da UFRGS, em especial Dr. Mário Reis, que me encaminhou a um excelente orientador. Obrigada pela compreensão em todas as etapas de dificuldade.

À banca que prontamente aceitou o convite, especialmente ao professor Dr. Eduardo Cremonese Filippi Chiela, pelos conselhos e estímulos durante o período no qual o meu projeto de pesquisa não estava alinhado. Obrigada pelo compreensível suporte nas atividades da disciplina de Seminários Integrados de Pesquisa.

Enfim, agradeço de coração a todos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal, e que direta ou indiretamente colaboraram para que este trabalho fosse possível.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
LISTA DE TABELAS.....	7
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1. Epidemiologia.....	11
2.2. Agente Etiológico.....	12
2.3. Estrutura do vírus da Hepatite C.....	13
2.4. Transmissão.....	13
2.5. Hepatite C.....	14
2.6. Doenças Hepáticas.....	16
2.7. Quimiocinas.....	17
2.8. CCL2 na imunidade hepática.....	20
2.9. Receptor de quimiocina CCR2.....	21
2.10. Polimorfismo CCR2-64I.....	23
3. JUSTIFICATIVA.....	25
4. QUESTÃO DE PESQUISA.....	26
5. HIPÓTESE.....	27
6. OBJETIVOS.....	28
6.1. Objetivo geral.....	28
6.2. Objetivos específicos.....	28
7. ARTIGO EM INGLÊS.....	29
8. CONCLUSÃO.....	51
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

RESUMO

A infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) é caracterizada por um amplo espectro de doenças hepáticas que podem ser sintomáticas ou assintomáticas, apresentando uma fase crônica persistente. O processo inflamatório contínuo estabelecido no fígado pode levar ao desenvolvimento de fibrose, que pode evoluir para cirrose e hepatocarcinoma (HCC). Quimiocinas e citocinas desempenham papéis importantes na depuração viral, controle de infecção, inflamação, regeneração e fibrose, e também estão implicadas nos processos patológicos que ocorrem no fígado durante a infecção viral. CCR2 é um receptor de quimiocinas envolvido na migração celular, em processos inflamatórios e na regulação do sistema imunológico. Nesse sentido, o gene CCR2 pode estar associado à atividade tumoral no hospedeiro. É importante ressaltar que ainda há muitas questões sobre o significado funcional da molécula CCR2 no desenvolvimento e progressão do tumor. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar a associação potencial da variante genética do CCR2-64I em pacientes HCV positivos (HCV +) com diferentes perfis clínicos. Foram avaliadas 293 amostras de indivíduos de Porto Alegre HCV + coletadas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). As amostras foram genotipadas através da técnica Polimorfismo do Tamanho dos Fragmentos de Restrição (RFLP) utilizando primers específicos. As frequências genotípicas foram testadas para Equilíbrio de Hardy-Weinberg através do teste do chi-quadrado. As frequências alélicas e genotípicas foram comparadas com dados de um grupo controle (n=118) obtido de um trabalho já publicado pelo grupo do Laboratório de Imunobiologia e Imunogenética da UFRGS (Zambra et al., comunicação pessoal). Para as comparações entre grupos, foi utilizado o teste do chi-quadrado com correção de Yates ou o teste exato de Fisher. O valor de $p < 0,05$ foi estabelecido

como estatisticamente significativo. Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética das instituições envolvidas na coleta da amostra e todos os participantes assinaram o termo de consentimento. As frequências genotípicas estavam de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Considerando as frequências genotípicas, as comparações entre o grupo HCV+ e grupo controle ($p=0.123$), grupo HCV+/grupo fibrose e grupo controle ($p=0.733$), grupo HCV+/grupo cirrose e grupo controle ($p=0.309$), grupo HCV+/grupo HCC e grupo controle ($p=0.132$) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Da mesma forma, não houve diferença estatisticamente significativa quando os grupos foram comparados em relação às frequências alélicas ($p>0.05$). A variante CCR2-64I não influenciou diretamente a suscetibilidade à infecção pelo HCV, ou os desfechos avaliados (isto é, desenvolvimento de fibrose, cirrose e CHC). No entanto, ainda existem inconsistências e dúvidas na literatura científica sobre o papel dessa variante genética em diferentes aspectos da infecção pelo HCV. Além disso, a função do CCR2 nas respostas imunológicas sugere que o polimorfismo CCR2-64I pode ter papéis importantes nos desfechos clínicos associados à infecção pelo HCV.

Palavras-chave: hepatite C, HCV, polimorfismo, CCR2-64I, fibrose, cirrose, HCC, receptor de quimiocina

ABSTRACT

Hepatitis C virus (HCV) infection can be associated to a wide spectrum of liver diseases which can be symptomatic or asymptomatic, presenting a persistent chronic phase. The continuous inflammatory process established in the liver can lead to the development of fibrosis, which can progress to cirrhosis and hepatocarcinoma (HCC). Chemokines and cytokines play important roles in viral clearance, infection control, inflammation, regeneration, and fibrosis, and are also implicated in the pathological processes that occur in the liver during viral infection. CCR2 is a chemokine receptor involved in cell migration and in inflammatory processes and in immune system regulation. In this sense, the CCR2 molecule can be associated to the tumor activity in the host. Importantly, there are still many questions about the functional significance of the CCR2 molecule in tumor development and progression. Thus, the aim of the present study was to investigate the potential association of the CCR2-64I genetic variant in HCV positive patients with different clinical profiles. We evaluated 293 samples of HCV + individuals from Porto Alegre collected at the Hospital de Clínicas, Porto Alegre. The samples were genotyped by Restriction Fragment Size Polymorphism (RFLP) technique using specific primers. For analysis, genotypic frequencies were tested for Hardy-Weinberg Equilibrium using chi-square test. The allele and genotype frequencies were compared with a control group ($n=118$) previously evaluated in the Laboratory of Immunobiology and Immunogenetics of UFRGS (Zambra et al., personal communication). For the comparisons between groups, the chi-square test with Yates correction or Fisher's exact test was used. The value of $p < 0.05$ was established as statistically significant. This study was approved by the Ethics Committees of the institutions involved in the sample collection and all participants signed a consent form. The genotypic

frequencies were in agreement with the Hardy- Weinberg equilibrium. Considering the genotypic frequencies, the comparisons between the HCV + group and the control group ($p=0.123$), HCV + group/ fibrosis group and control group ($p=0.733$), HCV + group / cirrhosis group and control group ($p=0.309$) and HCV + group / HCC group and control group ($p=0.132$) did not present statistically significant differences. Similarly, there was no statistically significant difference when groups were compared in relation to allele frequencies ($p<0.05$). The CCR2-64I variant did not directly influence the susceptibility to HCV infection, or the evaluated outcomes (i.e. development of fibrosis, cirrhosis and HCC). However, there are still inconsistencies and doubts in the scientific literature about the role of this genetic variant on different aspects of the HCV infection. In addition, the function of CCR2 in immunological responses suggests that the CCR2-64I polymorphism may have important roles in clinical outcomes associated to HCV infection.

Keywords: hepatitis C, HCV, polymorphism, CCR2-64I, fibrosis, cirrhosis, HCC, chemokine receptor

LISTA DE ABREVIATURAS

CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
CCL3	Chemokine (C-C motif) ligand 3
CCL10	Chemokine (C-C motif) ligand 10
CCL11	Chemokine (C-C motif) ligand 11
CCR2	Chemokine (C-C motif) receptor 2
CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
CXCL11	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11
DCs	Células Dendríticas
HCC	Hepatocarcinoma
HCV	Vírus da Hepatite C
HCV +	Indivíduos infectados pelo vírus da Hepatite C
I	Isoleucina
IL-2	Interleucina-2
IL28B	Interleucina-28B
KCs	Células de Kupffer
kD	Quilo Dalton
LPS	Lipopolissacarídeo

MCP-1	Proteína Quimioatrativa de Monócitos
MEC	Matriz Extracelular
ORF	Fase de leitura aberta
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ácido Ribonucléico
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SNPs	Polimorfismos de Nucleotídeo Único
TLR4	Receptor tipo Toll 4

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Table 1 - Demographic and clinical data of the HCV+ individuals stratified according to clinical outcome.....	35
Table 2 - <i>CCR2-64I</i> genotypic and allelic frequencies.....	38
Table 3 – Comparisons between the groups considering the genotypic frequencies.....	39
Table 4 – Comparisons between the groups considering the allelic frequencies.....	40

1. INTRODUÇÃO

As doenças hepáticas que ocorrem em decorrência de infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) são consideradas um dos principais problemas de saúde pública mundial. A hepatite C é encontrada globalmente sendo de 71 milhões a prevalência de pessoas com a infecção crônica ⁽¹⁾. Na África e na Ásia situam-se os países com maior prevalência; enquanto que na América do Norte, Austrália, Norte da Europa e Europa Ocidental, se localiza a menor proporção ⁽²⁾.

A inflamação devido à infecção pelo vírus em um período de seis meses caracteriza a fase aguda e pode se apresentar de forma assintomática ⁽³⁾. Na hepatite C crônica, a inflamação contínua causa lesões no fígado aumentando o risco da formação de fibrose, transformação da fibrose em cirrose e evolução da cirrose para hepatocarcinoma (HCC) ⁽⁴⁾. Normalmente, a evolução da doença é lenta e depende de vários fatores sendo que 10% a 20% dos portadores poderão desenvolver cirrose hepática e, anualmente, entre 1% e 5% dos pacientes portadores de cirrose poderão progredir para HCC ⁽⁵⁻⁶⁾.

O envolvimento da resposta imune inata na patogênese das doenças hepáticas tem sido amplamente descrito. A reação inflamatória é um processo coordenado pelo qual o fígado responde a lesões locais, tentando restaurar a estrutura original e a função hepática. No entanto, na infecção pelo vírus, o dano local é persistente, sendo a resposta inflamatória associada com a substituição gradual do tecido hepático normal ⁽⁷⁾. Esse dano hepático é atribuído aos mecanismos imunomediados do hospedeiro, uma vez que o próprio HCV não exerce efeito citopático ⁽⁸⁾.

Vários componentes do vírus interagem com diferentes elementos do sistema imune inato e adaptativo do hospedeiro. As células mononucleares mielóides são

integradas por monócitos circulantes no sangue, macrófagos residentes em tecido, referidos como células de Kupffer (KCs) e dendríticas (DCs). Esses elementos ligam a imunidade inata e adaptativa e são cruciais no desenvolvimento e manutenção de muitas doenças inflamatórias ⁽⁹⁾.

A capacidade que as células imunitárias têm de montar uma resposta antitumoral pode ser parcialmente dependente de fatores solúveis, como as quimiocinas, expressas no microambiente tumoral e liberadas de forma sistêmica no organismo ⁽¹⁰⁾. As quimiocinas são fatores solúveis que desempenham papéis importantes na regulação do recrutamento de células imunes durante respostas inflamatórias e de defesa. Elas atuam através da ligação a diferentes receptores específicos presentes na superfície de distintas populações celulares. Por estar envolvido no tráfego de monócitos, o gene do receptor de quimiocinas CCR2 é alvo de estudos que envolvem inflamação crônica, sendo associado à modulação da inflamação em alguns modelos animais de doenças e estudos caso-controle ⁽¹¹⁾.

Fatores genéticos do hospedeiro podem influenciar tanto a suscetibilidade à infecção quanto evolução de doenças ⁽¹²⁾. Da mesma forma, a atuação das variantes de genes envolvidos em processos imunológicos também é analisada em relação à associação com doenças infecciosas, inflamatórias ou tumorais. Neste contexto, o alelo da variante polimórfica CCR2-64I do gene CCR2 tem sido relatado como protetor no desenvolvimento de doenças inflamatórias assim como também tem sido relacionado como fator de risco em alguns cânceres e doenças virais ^(13 14,15). Portanto, devido a inconsistências na literatura científica, faz-se necessário a realização de mais estudos para determinar a atuação do alelo variante em diversas patologias.

Nosso trabalho objetivou avaliar possíveis associações da variante CCR2-64I em indivíduos infectados pelo vírus da hepatite C (HCV+), verificando a suscetibilidade à infecção pelo HCV entre o grupo com fibrose, cirrose e HCC e o grupo controle para indivíduos heterozigotos ou homozigotos para o alelo CCR2-64I assim como analisar a relação da progressão dos perfis clínicos no grupo HCV+ para o alelo variante.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Epidemiologia

Em escala global, dados atuais demonstram que cerca de 71 milhões de pessoas são portadoras do HCV. No Brasil, estima-se que aproximadamente 1,6% da população esteja infectada ⁽¹⁾. A maior incidência ocorre em populações do continente Asiático, regiões do Oriente Médio e Norte da África, contudo é no Egito que ocorre a maior prevalência das infecções atingindo 15% da população ⁽¹⁶⁾. Já na Europa Ocidental, nos Estados Unidos, nas Américas e África do Sul a prevalência é baixa correspondendo a 1,9% da população. Em alguns países da Europa as taxas são maiores sendo de 2,9% e na Argentina, México, Peru e Venezuela as taxas oscilam entre 1,5 a 2,9% da população ⁽¹⁷⁾.

Conforme os registros do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), no Brasil entre 1999 a 2016, foram detectados 155.032 casos de hepatite C. Esses casos foram identificados e notificados apresentando como diagnóstico os marcadores anti-HCV reagente e HCV-RNA detectáveis sendo 64,1% na região Sudeste, 24,5% na região Sul, 5,5% no Nordeste, 2,5 % no Norte e 3,3% no Centro-Oeste ⁽¹⁸⁾.

No ano de 2017, no estado do Rio Grande do Sul, 621 casos foram descritos sendo a forma de infecção mais incidente, entre os casos confirmados de Hepatite C, a via sexual. Neste mesmo ano, a faixa etária que apresentou o maior número de casos foi a faixa entre 40 a 69 anos. Os dados registrados permitem inferir que a Hepatite C, em todos os anos da coorte analisada, constitui o maior número de incidência entre as Hepatites Virais. ⁽¹⁹⁾.

2.2. Agente Etiológico

O HCV pertence ao gênero *Hepacivirus*, família *Flaviviridae*. Possui 7 genótipos e 67 subtipos descritos. O genótipo 1 é classificado em subtipos 1a e 1b, sendo globalmente o subtipo 1b o mais prevalente. Em regiões da América do Norte, América Latina e Europa, este subtipo atua em 26%, 39% e 50% das infecções, respectivamente ⁽²⁰⁾. Dos indivíduos infectados na região leste da Ásia o genótipo 2 consta em 13% ⁽²¹⁾. O genótipo 3 representa aproximadamente 25% das infecções, sendo mais prevalente no sul da Ásia, ao passo que o genótipo 4 é responsável por cerca de 15% das infecções no norte da África e Oriente Médio ⁽²²⁾.

No Brasil, o genótipo mais prevalente é o 1, com predomínio do subtipo 1a, seguido pelo subtipo 1b, genótipo 3 e genótipo 2. Os genótipos 4 e 5 possuem baixa prevalência no país ⁽²³⁾. Em diferentes estados brasileiros, como Rio de Janeiro (RJ), São Paulo (SP), Goiás (GO), Mato Grosso do Sul (MS), Amapá (AP) e Rondônia (RO), a maior prevalência das infecções é causada pelos genótipos 1a e 1b, seguidos do genótipo 3 e do genótipo 2 ⁽²⁴⁾. Particularmente no estado do Rio Grande do Sul, foi encontrado o genótipo 3 como o mais freqüente (62,5%) entre os indivíduos estudados ⁽²⁵⁾.

No Brasil, a prevalência da hepatite C é maior nos indivíduos da faixa etária com mais de 40 anos, fato que se deve ao diagnóstico tardio, já que no ano de 1993 a tecnologia necessária para identificação o vírus C chegou aos bancos de sangue ⁽²⁶⁾. Os profissionais da saúde estão entre os mais susceptíveis à transmissão ocupacional, que pode ocorrer por acidente com material perfurocortante durante a realização de procedimentos terapêuticos ⁽²⁷⁾.

2.3 Estrutura do vírus da Hepatite C

O vírus foi descrito pela primeira vez em 1989 como pertencente à família Flaviviridae e ao gênero Hepacivirus ⁽²⁸⁾. É retratado como um vírus envelopado, de simetria icosaédrica, cuja partícula viral tem 40nm a 70nm de diâmetro, com espículas na superfície medindo 6nm a 8nm ⁽²⁹⁾. Seu genoma é constituído por uma única fita de RNA de polaridade positiva com 9.600 nucleotídeos. O genoma viral possui duas regiões não codificantes (NTRs) nas extremidades 5' e 3' e uma região aberta de leitura Open Reading Frame (ORF), que codifica uma poliproteína com cerca de 3.000 aminoácidos ⁽³⁰⁾.

2.4. Transmissão

O vírus permanece ativo no ambiente por 16 a 23 horas ⁽¹⁾. A principal via de transmissão é a parenteral, através do contato com sangue contaminado. Outros mecanismos de transmissão conhecidos são o compartilhamento de agulhas e seringas entre usuários de drogas injetáveis, reutilização de equipamentos médicos, especialmente seringas e agulhas não adequadamente esterilizadas em ambientes de assistência à saúde, e uso de sangue e seus derivados contaminados. Procedimentos de manicure, realização de tatuagens, colocação de piercings, tratamentos odontológicos, também configuram fatores de risco para transmissão do vírus ⁽⁵⁾.

A transmissão sexual do HCV também é relatada, porém, de forma geral, essa via de transmissão é pouco freqüente e ocorre, sobretudo, em indivíduos com múltiplos parceiros e práticas sexuais de risco, sem uso de preservativo. Há possibilidade de transmissão vertical, em menor proporção dos casos ⁽³¹⁾ durante o parto assim como também na ruptura da placenta e parto prematuro. De 3,5% a 5%

de crianças são infectadas quando a mãe possui viremia positiva, e este tipo de transmissão pode se agravar quando existe coinfeção pelo vírus HIV ^(32 33).

2.5. Hepatite C

As principais complicações desta doença são cirrose e HCC, desfechos que levam em torno de 400 mil indivíduos a óbito todo ano ⁽⁵⁾. Geralmente, a hepatite C apresenta evolução, passando de aguda para crônica com difícil diagnóstico, pois a maioria dos casos tem apresentação assintomática e anictérica. Quando existem sintomas, geralmente são inespecíficos, tais como anorexia, astenia, mal-estar e dor abdominal. Poucos pacientes apresentam icterícia ou escurecimento da urina e a insuficiência hepática ⁽³⁴⁾. Casos de insuficiência hepática, ou casos fulminantes, também são extremamente raros ⁽³⁵⁾.

A eliminação viral espontânea do vírus C ocorre em 15% a 40% dos indivíduos infectados, sendo alguns fatores do hospedeiro associados, tais como idade inferior a 40 anos, sexo feminino, aparecimento de icterícia e fatores genéticos. Dentre os fatores genéticos, o polimorfismo do gene da interleucina-28B (IL28B) (rs 12979860 C/T) e (rs 8099917 T/G) está fortemente associado à eliminação do vírus ⁽³⁶⁾. É importante salientar que a cura da hepatite C após o uso de medicamentos ou mesmo após a soroconversão espontânea, não conferem imunidade. Desta forma, através de outras exposições ao vírus da hepatite C a reinfeção do vírus é possível ⁽²⁾.

O diagnóstico diferencial atualmente é possível com a realização de testes rápidos. Outros métodos para diagnosticar a infecção são os testes sorológicos (para detecção de anticorpos) ou teste para a detecção do RNA do HCV. O RNA do HCV pode ser identificado no soro antes da presença do ANTI-HCV. A presença do

RNA do HCV pode ocorrer cerca de duas semanas após a exposição ao agente infeccioso ⁽³⁷⁾. A presença dos anticorpos ANTI-HCV é mais tardia e ocorre cerca de 30 a 60 dias após a exposição ao vírus enquanto os níveis séricos do HCV-RNA aumentam rapidamente durante as primeiras semanas, atingindo os valores máximos de 10⁵ a 10⁷ UI/ml imediatamente antes do pico dos níveis séricos de aminotransferases. Nos pacientes sintomáticos, os sintomas de infecção aguda costumam ocorrer entre quatro a doze semanas após a exposição ao HCV. A fase aguda da hepatite C pode durar até seis meses, mas sua resolução costuma acontecer até a 12^a semana ⁽³⁸⁾.

A hepatite C crônica se caracteriza pela infecção persistente após seis meses do contágio, o que ocorre em 55 a 85% dos casos de infecção aguda ⁽¹⁾. Na ausência de tratamento, esta fase ocorre em 60% a 85% dos casos; em média, 20% podem evoluir para cirrose ao longo do tempo. Uma vez estabelecido o diagnóstico de cirrose hepática, o risco anual para o surgimento de CHC é de 1 a 5%. Após um primeiro episódio de descompensação hepática, com um risco anual de 3 a 6%. O risco de óbito, nos próximos 12 meses, é 15% a 20%. No entanto, a taxa de progressão para cirrose é variável e pode ser mais acelerada em determinados grupos de pacientes, como alcoolistas ou co-infectados pelo HIV ⁽³⁹⁾. A evolução para óbito, geralmente, decorre de complicações da hepatopatia crônica, como a insuficiência hepatocelular, hipertensão portal (varizes gastresofágicas, hemorragia digestiva alta, ascite), encefalopatia hepática, além de trombocitopenia e desenvolvimento de HCC ⁽⁴⁰⁾.

2.6. Doenças hepáticas

A fibrose hepática é estabelecida pelo acúmulo de matriz extracelular (MEC) com conseqüente perda da função hepática. A membrana basal normal, de baixa densidade, é substituída por tecido conjuntivo do tipo intersticial, de alta densidade, contendo colágeno fibrilar. O processo de evolução da fibrose constitui um processo com vários componentes, sobretudo as células estreladas hepáticas, citocinas, proteinases e seus inibidores ⁽⁴¹⁾. Diversos fatores influenciam na formação da fibrose hepática na hepatite C, como a presença de necroinflamação, idade, consumo de álcool, duração do quadro inflamatório, presença de infecções virais e alterações como esteatose e resistência insulínica ⁽⁴²⁾.

No curso da Hepatite C crônica pode ocorrer fibrose e evolução à cirrose, caracterizada por uma fase assintomática, seguida de uma rápida fase progressiva marcada pelo desenvolvimento de complicações de hipertensão portal e/ou disfunção hepática ⁽⁴³⁾. Na fase assintomática, a pressão portal definida como a elevação do gradiente de pressão venosa hepática acima de 5 mmHg, pode ser normal ou abaixo do nível limiar identificado para o desenvolvimento de varizes ou ascite. Esse quadro clínico ocorre por um aumento da resistência intra-hepática à passagem do sangue venoso devido à cirrose e por causa da vasodilatação esplâncnica. O desenvolvimento de ascite, sangramento gastrointestinal, encefalopatia e icterícia decorrente do aumento da pressão portal e a perda de função do fígado, marcam a transição de uma fase descompensada ⁽³⁹⁾.

A hepatite C crônica é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de HCC ⁽³⁹⁾. Aproximadamente 700.000 pessoas morrem de HCC a cada ano no mundo, fazendo dele a terceira causa de morte por câncer. Globalmente, a porcentagem de doentes com cirrose ou HCC que é atribuível a

infecção pelo HCV foi estimada em 27% e 25% respectivamente, resultando em um total de 211.000 mortes por cirrose e 155.000 mortes por HCC em 2002 ⁽³⁾.

2.7. Quimiocinas

O desenvolvimento de células malignas e a progressão do câncer são eventos imunologicamente relevantes. As quimiocinas são citocinas que podem estimular a migração direcional específica de células-alvo e o recrutamento de leucócitos para locais de inflamação por meio da interação com uma família de receptores de quimiocinas ⁽⁴⁴⁾. Estão implicadas em muitos processos biológicos, como estimulação da migração dirigida de leucócitos, embriogênese, angiogênese, manutenção da homeostase hematopoética, regulação da proliferação celular, morfogênese tecidual e angiogênese, aterosclerose, crescimento tumoral e metástase e infecção pelo HIV ⁽⁴⁵⁾ sendo expressas no microambiente tumoral. As quimiocinas, que desempenham um papel importante na inflamação, atuando como importantes mediadores do tráfico de leucócitos ⁽⁴⁶⁾.

A sinalização ocorre através de quimiotaxia, pela a qual ativam e recrutam células que expressam receptores específicos, atuando nos processos de progressão tumoral, na infecção microbiana, angiogênese e metástase ⁽⁴⁷⁾. Apesar das quimiocinas estarem relacionadas aos seus efeitos quimiotáticos sobre os leucócitos, elas exercem mais funções do que apenas regular a migração das células imunes e a homeostase. As quimiocinas estão envolvidas no desenvolvimento embrionário do sistema nervoso central ⁽⁴⁸⁾ e desempenham um papel no desenvolvimento e ativação de células T. São mediadas quase exclusivamente por linfócitos T e B, que possuem grande diversidade no reconhecimento de antígenos, alta especificidade e memória imunológica duradoura

(53,54). Devido seus efeitos angiogênicos ou angiostáticos, vem sendo amplamente estudadas no desenvolvimento de terapias contra o câncer (49).

As quimiocinas são pequenas moléculas (8–12 kD) agrupadas em quatro subfamílias com base na posição dos resíduos de cisteínas: CXC, CC, CX3C e C. Como regra geral, os membros da família de quimiocinas CXC são quimiotáticos de neutrófilos, enquanto que as quimiocinas CC são quimiotáticas para monócitos e linfócitos. A CX3CL1, também conhecida como fractalcina, é o único membro da subfamília CX3C com 3 aminoácidos separando os dois primeiros resíduos de cisteína. A subfamília C das quimiocinas é atípica, pois possui apenas um resíduo de cisteína (50).

As quimiocinas são divididas de acordo com sua funcionalidade, podendo ser classificadas como inflamatórias ou homeostáticas (51). As inflamatórias controlam o recrutamento de leucócitos durante a infecção, inflamação e lesão tecidual. Elas são fortemente reguladas positivamente sob condições inflamatórias e têm ampla seletividade de células-alvo. Já as quimiocinas homeostáticas regulam a migração homeostática como o próprio nome já diz, e o “homing” de várias células. Várias quimiocinas exercem ambas as tarefas, as denominadas quimiocinas de dupla função. Ao contrário das quimiocinas inflamatórias, as quimiocinas homeostáticas e as que exercem ambas funções são altamente seletivas (52).

Dentre as características que diferenciam as quimiocinas de outras citocinas, uma delas é os seus receptores, que pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G. Esses receptores são agrupados em quatro subfamílias, dependendo da subfamília do seu principal ligante (53). Quando ativado, o receptor da quimiocina é fosforilado e a proteína G heterotrimérica se dissocia do receptor em suas subunidades $G\alpha$ e $G\beta\gamma$. As seguintes cascatas de sinalização induzem mudanças

conformacionais dentro das integrinas do leucócitos, que são proteínas de adesão presentes na membrana celular, que permitem a interação da célula com moléculas de adesão nas células endoteliais, como a molécula de adesão intercelular-1 e a molécula de adesão celular vascular-1. Após serem secretadas, as quimiocinas podem ser imobilizadas ligando-se a glicosaminoglicanos na superfície das células endoteliais e da matriz extracelular, criando assim um gradiente que coordena o tráfego de leucócitos para a área alvo ⁽⁵⁴⁾.

O recrutamento de leucócitos dependem das quimiocinas secretadas, assim como dos receptores de quimiocinas expressos na superfície da célula-alvo. As quimiocinas inflamatórias freqüentemente se ligam a mais de um receptor e vice-versa, mas não necessariamente têm a mesma função biológica. Essa rede complexa é determinada pelo fato de que um receptor pode ser expresso em vários subconjuntos de leucócitos que podem ter funções divergentes ⁽⁵⁵⁾.

No fígado, as quimiocinas não estão apenas envolvidas no tráfico de leucócitos, mas também atuam e são secretadas pelos hepatócitos e células estreladas hepáticas, onde exercem efeitos anti-fibróticos ⁽⁵⁶⁾. Entre mais de 50 quimiocinas, o ligante de quimiocina 2 (*CCL2*) é de particular importância. Também chamada proteína quimiotática de monócitos-1 (*MCP-1*), essa quimiocina é membro da subfamília CC caracterizada pela ausência de qualquer aminoácido entre as cisteínas conservadas na extremidade amino-terminal da molécula. Possui potencial função quimioatrativa para monócitos, linfócitos T de memória e células *natural killer*. Está envolvida em várias condições inflamatórias associadas ao recrutamento de monócitos, incluindo reações de hipersensibilidade tardia, infecção bacteriana, artrite e doença renal ⁽⁵⁷⁾.

2.8. CCL2 na imunidade hepática

As células imunológicas antivirais são recrutadas para o local da infecção quando é necessário combater o vírus. As quimiocinas desempenham um papel importante na quimiotaxia das células imunológicas, sendo que a interferência na expressão de quimiocinas ou receptores permitiria o HCV controlar a imunidade do hospedeiro, ocorrendo persistência viral ⁽⁵⁸⁾. Uma vez estabelecida a infecção crônica, as células imunes recrutadas são responsáveis pela inflamação e pelo dano hepático, aumentando o risco do desenvolvimento de doenças hepáticas, como fibrose hepática, cirrose e HCC ⁽⁵⁹⁾.

Segundo Asselah et al. ⁽⁶⁰⁾, há aumento da expressão de CCL2 e CCR2 em pacientes infectados pelo HCV, enquanto que a expressão intra-hepática de CCL2 apresenta um aumento ainda maior em indivíduos obesos HCV + em comparação com indivíduos magros infectados, contribuindo para a progressão mais rápida da doença hepática em indivíduos obesos com hepatite C crônica. O recrutamento de células imunes inatas para o local da infecção no fígado é iniciado pela liberação de Interferon-alfa / Interferon-beta (IFN- α / β) em resposta ao reconhecimento de patógenos induzido pelos hepatócitos, ativando as células de Kupffer que secretam CCL2 e IL-12. A quimicina CCL2 é responsável pelo recrutamento de monócitos e macrófagos dependente de CCR2. Esses macrófagos infiltrantes são a principal fonte de CCL3 que está envolvida no recrutamento de células *natural killer* ⁽⁶¹⁾. O gene do receptor CCR2 é expresso em células dendríticas que se infiltram no fígado em resposta a CCL2 e que também secretam várias quimiocinas que estão envolvidas no recrutamento de células T efectoras (CXCL9, CXCL10, CXCL11), bem como monócitos e células dendríticas imaturas (CCL3, CCL4, CCL5) ⁽⁶²⁾. Além disso, a sinalização de lipopolissacarídeo (LPS) via receptor tipo Toll 4 (TLR4) sensibiliza

células hepáticas estreladas para a ativação do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) induzida por células de Kupffer ⁽⁶³⁾. Os principais ligantes do receptor CCR2 envolvidos na imunidade hepática, expressados em monócitos, células T de memória e células dendríticas são CCL2, CCL7, CCL8, CCL13 ⁽⁶⁴⁾.

O único receptor conhecido para a quimiocina CCL2 é o receptor de quimiocina CCR2 que é predominantemente expresso por monócitos, mas também por células Th1 e Th2 e células dendríticas plasmocitóides ⁽⁶⁵⁾. Esta quimiocina está envolvida no recrutamento de monócitos, células T de memória e células *natural killer in vitro* e recruta predominantemente monócitos *in vivo* ⁽⁶⁶⁾. Além disso, atua na diferenciação de células T CD4 + em células Th2 ⁽⁷⁴⁾. Por estar envolvida em várias vias de sinalização, a expressão desregulada dessa quimiocina tem sido relacionada com a progressão do câncer ⁽⁶⁷⁾.

2.9. Receptor de quimiocina CCR2

O receptor de quimiocina 2 ou CCR2 é o receptor para CCL2, também conhecida como MPC-1 como descrito anteriormente. É expresso em basófilos, monócitos, células dendríticas, células T ativadas e células *natural killer* ⁽⁶⁸⁾. Existem duas isoformas, CCR2A e CCR2B, que são produtos do gene CCR2 como resultado do processo de splicing alternativo, pelo qual os éxons de um transcrito primário são ligados de diferentes maneiras durante o processamento do RNA, levando a formação de proteínas não idênticas. A isoforma CCR2A é constituída por 360 aminoácidos e enquanto a CCR2B é formada 374 aminoácidos. A diferenciação entre as duas isoformas está na seqüência da região da cauda citoplasmática C-terminal podendo essa distinção ser um mecanismo relacionado com o aumento na diversidade de respostas celulares aos ligantes. Essa seqüência determina o

transporte de CCR2B para a superfície da célula, ao passo que a maior parte de CCR2A se mantém no citoplasma ⁽⁶⁹⁾.

O gene do receptor CCR2 está localizado no braço curto do cromossomo 3, na região 2, banda 1 (3p21) ⁽⁷⁰⁾. É bem caracterizado que o CCR2 apresenta tanto ações pró-inflamatórias como antiinflamatórias. Enquanto na inflamação é dependente de células apresentadoras de antígenos e de células T, na ação antiinflamatória a expressão ocorre sobre as células T regulatórias ⁽⁷¹⁾. Seu ligante MCP-1 desempenha papel central na vigilância imunológica no microambiente tumoral assim como também controla o recrutamento de leucócitos para os tecidos durante a inflamação e realiza várias atividades promotoras de tumores. Além disso, promove a polarização de macrófagos em células imunossupressoras e que secretam fatores angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular ⁽⁷²⁾. Tanto a MCP-1 como o receptor CCR2 tem sido associado principalmente a doenças inflamatórias crônicas ⁽⁸¹⁾, mas também à imunidade antitumoral ⁽⁷³⁾ e muitos tipos de câncer, como câncer de pulmão ⁽⁷⁴⁾, câncer de próstata, câncer endometrial ^(75,76) e câncer de mama ^(77,78,79). Estas moléculas também podem estar envolvidas na infiltração de macrófagos tumorais ⁽⁸⁰⁾.

A segmentação da sinalização CCL2-CCR2 pode provocar efeitos adversos. A interrupção da inibição de CCL2 mostrou aumentar as metástases e acelerar a morte em quatro modelos de camundongos de câncer de mama metastático. Este efeito foi atribuído à mobilização aumentada de células cancerígenas do tumor, aumento da formação de vasos sanguíneos e aumento da proliferação de células metastáticas ⁽⁸¹⁾. Esses achados estão de acordo com o observado em um modelo de metástase de câncer de próstata em que a inibição da CCL2 deve ser mantida para manter a regressão do tumor ⁽⁸²⁾.

2.10. Polimorfismo CCR2-64I

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em certos genes que codificam quimiocinas podem estar associados a algum tipo de câncer. A variante CCR2-64I, derivada da substituição de uma guanina por adenina na posição 190 do gene do receptor de quimiocina CCR2 resulta na substituição do aminoácido valina para isoleucina na posição 64 da primeira região transmembrana da proteína ⁽⁸³⁾. Essa alteração torna o CCR2A mais estável e aumenta sua meia-vida, mas não afeta de forma alguma a estabilidade da isoforma CCR2B ⁽⁸⁴⁾. Esse polimorfismo também é descrito como comum em todos os grupos étnicos sendo a sua frequência alélica de 0.098 em caucasianos; 0.151 em afro-americanos; 0.172 em hispânicos; e 0.250 em Asiáticos ⁽⁸³⁾.

A variante tem sido destaque nos estudos relacionados à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) ⁽⁸⁵⁾. Além disso, a associação do polimorfismo CCR2-64I (rs1799864) e o risco de câncer em diferentes populações têm sido extensivamente investigados em muitos estudos. Até o momento, numerosos estudos realizados para investigar se o polimorfismo CCR2-64I está associado ao risco de câncer obtiveram como resultados dados conflitantes. Em uma metanálise, com estudos de caso-controle que enfocaram o polimorfismo CCR2-64I e o risco de câncer, houveram evidências de que a variante tanto para o genótipo homozigoto como para heterozigoto estava significativamente associada ao aumento do risco de câncer ⁽⁸⁶⁾.

A variante polimórfica CCR2-64I é retratada na literatura tanto como protetora no desenvolvimento e progressão de doenças inflamatórias. Entretanto, parece ser um fator de risco no desenvolvimento de câncer hepatocelular ⁽⁸⁷⁾ e de endométrio ⁽⁸⁴⁾. Esses achados inconsistentes na literatura científica reforçam a necessidade da

realização de mais estudos de forma a compreender melhor o papel da variante, tanto quanto ao papel na inflamação no desenvolvimento de câncer.

3. JUSTIFICATIVA

Considerando que o receptor de quimiocina CCR2 está envolvido em processos inflamatórios e na regulação do sistema imune, e que tais processos podem estar associados à atividade e progressão tumoral no hospedeiro, embora ainda existam muitas dúvidas sobre sua importância funcional nesses processos, torna-se pertinente a análise da associação potencial do polimorfismo CCR2-64I na fibrose, cirrose e desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em pacientes HCV + do Sul do Brasil.

4. QUESTÃO DE PESQUISA

O alelo da variante CCR2-64I confere proteção na suscetibilidade à infecção pelo HCV assim como exerce influência na progressão dos desfechos hepáticos relacionados à hepatite C?

5. HIPÓTESE

O alelo variante em heterozigose ou homozigose confere proteção tanto na suscetibilidade à infecção pelo vírus HCV quanto no desenvolvimento de doenças hepáticas decorrentes da infecção.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo Geral

Avaliar a influência do polimorfismo CCR2-64I em indivíduos HCV+.

6.2. Objetivos específicos

- Verificar a suscetibilidade à infecção pelo HCV nos indivíduos heterozigotos ou homozigotos para o alelo CCR2-64I;
- Analisar a relação entre a progressão das doenças hepáticas (fibrose, cirrose e HCC) no grupo HCV+ e o alelo CCR2-64I em indivíduos heterozigotos ou homozigotos.

7. ARTIGO EM INGLÊS

The genetic influence of polymorphism CCR2-64I in HCV infected patients

Riana Augusta Dauber Bevilaqua de Bem¹, Joel Henrique Ellwanger¹, Daniel Simon², José Artur Bogo Chies¹

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

² Laboratório de Genética Molecular Humana, Universidade Luterana do Brasil - ULBRA, Canoas, Brazil.

Correspondence: Dr. Jose Artur Bogo Chies

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

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

ABSTRACT

INTRODUCTION: Hepatitis C virus (HCV) infection can be associated to a wide spectrum of liver diseases which can be symptomatic or asymptomatic, presenting a persistent chronic phase. The continuous inflammatory process established in the liver can lead to the development of fibrosis, which can progress to cirrhosis and hepatocarcinoma (HCC). Chemokines and cytokines play important roles in viral clearance, infection control, inflammation, regeneration, and fibrosis, and are also implicated in the pathological processes that occur in the liver during viral infection. CCR2 is a chemokine receptor involved in cell migration, inflammatory processes and in immune system regulation. In this sense, the CCR2 molecule can be associated to the tumor activity in the host. Importantly, there are still many questions about the functional significance of the CCR2 molecule in tumor development and progression. The function of CCR2 in immunological responses suggests that the CCR2-64I polymorphism may have important roles in clinical outcomes associated to HCV infection.

OBJECTIVE: The aim of the present study was to investigate the potential association of the CCR2- 64I genetic variant in HCV positive patients with different clinical profiles (fibrosis, cirrhosis and hepatocarcinoma).

METHODS: We evaluated 293 samples of HCV + individuals from Porto Alegre collected at the Hospital de Clínicas, Porto Alegre. The samples were genotyped by Restriction Fragment Size Polymorphism (RFLP) technique using specific primers. For analysis, genotypic frequencies were tested for Hardy-Weinberg Equilibrium using chi-square test. The allele and genotype frequencies were compared with a control group ($n=118$) previously evaluated in the Laboratory of Immunobiology and

Immunogenetics of UFRGS. For the comparisons between groups, the chi-square test with Yates correction or Fisher's exact test was used. The value of $p < 0.05$ was established as statistically significant. This study was approved by the Ethics Committees of the institutions involved in the sample collection and all participants signed a consent form.

RESULTS: The genotypic frequencies were in agreement with the Hardy-Weinberg equilibrium. Considering the genotypic frequencies, the comparisons between the HCV + group and the control group ($p=0.123$), HCV + group/ fibrosis group and control group ($p=0.733$), HCV + group / cirrhosis group and control group ($p=0.309$) and HCV + group / HCC group and control group ($p=0.132$) did not present statistically significant differences. Similarly, there was no statistically significant difference when groups were compared in relation to allele frequencies ($p < 0.05$).

CONCLUSION: The CCR2-64I variant (rs1799864) did not directly influence the susceptibility to HCV infection, or the evaluated outcomes (i.e. development of fibrosis, cirrhosis and HCC). However, there are still inconsistencies and doubts in the scientific literature about the role of this genetic variant on different aspects of the HCV infection.

Keywords: hepatitis C, HCV, polymorphism, CCR2-64I, fibrosis, cirrhosis, HCC, chemokine receptor

1. INTRODUCTION

Hepatitis C virus infection and the liver inflammatory disease associated to this infection are major global health problems, affecting over 71 million people worldwide. The most affected regions in the world are the Eastern Mediterranean region and Europe, with a prevalence of 2.3% and 1.5% respectively ⁽¹⁾. The natural course of an HCV infection is variable and depends on viral and host characteristics. However, after acute infection, which mainly occurs through parenteral transmission, chronicity occurs in 50% to 85% of the exposed individuals, with several of them progressing to chronic hepatitis, cirrhosis, hepatocellular carcinoma and even liver failure requiring transplant ⁽²⁾.

It is well established that HCV can modulate the chemokine expression, *in vitro*. Therefore, it was postulated that HCV could, *in vivo*, drive its survival by subverting the immune response through altered leukocyte chemotaxis, resulting in impaired viral clearance and the establishment of a chronic low-grade inflammation ⁽³⁾. Inflammation is a usual feature in most liver diseases, and inflammatory cytokines and chemokines produced after HCV infection accelerate hepatocyte damage and liver disease progression. HCV infection triggers inflammation by various mechanisms including pathogen pattern recognition, inflammasome activation and intrahepatic inflammatory cascades, while oxidative and endoplasmic reticulum stress coexist with exacerbate inflammation and liver injury ⁽⁴⁾.

Data indicates that distinct chemokines and chemokine receptors may be associated with different stages of the chronic HCV infection-associated liver diseases. Chemokines are low molecular weight chemotactic peptides that mediate the recruitment of inflammatory cells into tissues and back into the lymphatic vessels and peripheral blood ⁽⁵⁾. The interactions among chemokines and their cognate

receptors help shape the immune response and therefore, have a major influence on the infection outcome. In a broad classification, chemokines can be divided into four subclasses CX3C, CXC, CC and XC, according to the arrangement of the N-terminal two cysteine residues. Corresponding to the four subclasses of chemokines, chemokine receptors, which are typical G-protein coupled receptors with seven trans-membrane domains, can also be classified in four families [CX3CR, CXCR, CCR and (X)CR] ^(6,7).

The CCR2 molecule, a member of the CCR family, is expressed on monocytes, macrophages, dendritic cells (DCs) and T cells. Ligands for CCR2 comprise distinct members of the chemokine (C-C motif) ligand (CCL) family, specifically CCL2, CCL7, CCL8 and CCL13, all of which expressed in the hepatic environment ^(8,9). Several studies have demonstrated that mRNA transcripts for CCL2 and CCR2 are significantly increased in the liver of HCV-infected patients ^(10,11). Furthermore, an increase in serum CCL2 levels correlates with progressive liver inflammation in infected patients when compared to healthy individuals ⁽¹²⁾.

The CCL2 molecule, also known as monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), is a major chemokine that recruits monocytes and macrophages to the sites of inflammation. Recent studies revealed that a high level of CCL2 expression in the tumor environment is associated with unfavorable patient prognosis in various types of cancer ⁽¹³⁻¹⁵⁾. CCL2 preferentially binds to the C-C chemokine receptor type 2 (CCR2), which is expressed in various tissues including thymus, lung, liver, kidney, pancreas and ovary ⁽¹⁶⁾. In bladder cancer, CCL2 has been reported to play an important role in epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis ⁽¹⁷⁾.

An extensively studied allelic variant of the *CCR2* gene, the CCR2-64I variant (rs1799864), is derived from a G-to-A nucleotide substitution at the gene position 190

that leads to the amino acid substitution of a valine (V) at position 64 by an isoleucine (I), within the first transmembrane domain of the CCR2 receptor ⁽¹⁸⁾. The CCR2-64I variant has been reported as a risk factor for bladder cancer ⁽¹⁹⁾ and hepatocellular cancer ⁽²⁰⁾, but in an opposed way, it has been described as a protective factor for breast cancer ⁽²¹⁾. Thus, the role of this genetic variant in tumor progression is still unclear.

Considering that CCR2 is involved in inflammatory processes and in immune system regulation, that such processes may be associated to the tumor activity and progression in the host, although there are still many questions about its functional significance in these processes, our aim was to investigate the potential association of the chemokine receptor gene CCR2-64I polymorphism in susceptibility to infection and in fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma development in HCV+ patients from Southern Brazil.

2. METHODS

2.1. Patients and controls

In this case-control study, 293 DNA samples of HCV infected patients from the *Hospital Clínicas de Porto Alegre* (HCPA), a public health institution from Southern Brazil, were analyzed. Amongst these patients 44 developed fibrosis, 158 cirrhosis and 91 patients presented HCC. A control healthy group ($n = 118$) previously evaluated in the Laboratory of Immunobiology and Immunogenetics of UFRGS was also included in this study ⁽²²⁾. The Table 1 presents demographic and clinical data of the HCV+ individuals stratified according to clinical outcome.

Table 1. Demographic and clinical data of the HCV+ individuals stratified according to clinical outcome.

Demographic and clinical data	Control group* <i>n</i> =119	HCV+ group <i>n</i> =293	Stratification of the HCV+ group, <i>n</i> =293		
			HCV+/fibrosis group <i>n</i> =44	HCV+/cirrhosis group <i>n</i> =158	HCV+/HCC group <i>n</i> =91
Age, mean ± SD	57.21 ± 7.91	59.97 ± 8.71	58.11 ± 9.88	59.60 ± 8.55	61.51 ± 8.25
Sex, <i>n</i> (%)					
Male	119 (100.0)	138 (47.1)	16 (36.4)	69 (43.7)	53 (58.2)
Female	-	155 (52.9)	28 (63.6)	89 (56.3)	38 (41.8)
Ethnicity, <i>n</i> (%)					
Caucasians	96 (83.5)	207 (70.6)	25 (56.8)	122 (77.2)	60 (65.9)
Non-caucasians	-	86 (29.4)	19 (43.2)	36 (22.8)	31 (34.1)
Declared smoker**, <i>n</i> (%)	-	180 (61.4)	19 (43.2)	103 (65.2)	58 (63.7)
Declared alcohol drinker**, <i>n</i> (%)	-	42 (14.3)	4 (9.1)	21 (13.3)	17 (18.7)
HCV transmission via blood transfusion, <i>n</i> (%)***	-	120 (41.0)	15 (34.1)	71 (44.9)	34 (37.4)

n, sample number. SD, standard deviation. HCC, hepatocarcinoma. *Data obtained from Zambra et al. (2013). **Currently or in the past (% based on total sample number). ***% based on total sample number.

Patients were ethnically classified as Caucasians or Non-caucasians (Afro-Brazilians or admixed individuals). The clinical and sociodemographic variables assessed in this study were development of liver fibrosis, cirrhosis or hepatocarcinoma, and characteristics such as sex, age, marital status, education level, age at infection, age at diagnosis, weight and height, BMI (Body mass index), smoking and alcoholism. In addition to data on skin color, data about the ethnicity of parents/ grandparents were reported by the participants. This study was approved by the Ethics Committees of the institutions involved in the sample collection and all participants signed an informed consent form.

2.2. Genotyping

The CCR2-64I (rs1799864) polymorphism was genotyped through Restriction Fragment Length Polymorphism PCR-RFLP using specific primers previously described by Smith et al. (27). The following primers were used for amplifying DNA: CCR2a: 5' T T G T G G G C A A C A T G A T G G 3' and CCR2b: 5' G A G C C C A C A A T G G G A G A G T A 3'. PCR samples were prepared to a final volume of 25 μ l as follows: 1 μ l of DNA; 2.5 μ l of 10X PCR buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl]; 1 μ l of 50 mM MgCl₂; 1 μ l of 3 mM dNTP mix; 1 μ l of de primers (10 pmol/ μ l cada); 18,3 μ l H₂O; and 0,2 μ l de Taq DNA polimerase 5U/ μ l (Invitrogen Corporation, San Diego, CA, USA). The initial cycle of PCR was carried out during one minute at 94 °C, followed by 40 cycles of 1 minute at 94 °C for denaturation, 1 minute at 55 °C for annealing, and 1 minute at 72 °C for extension; and finally sustained for 3 minutes at 72 °C. colocar microlitros

The PCR products were verified on 2% agarose gel (3 μ l PCR product + 2 μ l bromophenol blue) and analysed by electrophoresis in 100 V. The CCR2-resulting

128-bp fragment (10µl) was digested with 0.4 µl enzima *Bsa*BI (4U) for 16 h (overnight) at 60°C, producing 110-bp and 18-bp fragments (64I variant) or a single non-digested 128-bp fragment (wild type), which were visualized in a 3% agarose gel stained with 20 µl of ethidium bromide.

2.3. Statistical analysis

For analysis, genotypic frequencies distribution was tested for Hardy-Weinberg Equilibrium using chi-square test. For the comparisons between groups, the chi-square test with Yates correction or Fisher's exact test was used. The value of $p < 0.05$ was established as statistically significant.

3. RESULTS

3.1. Population

The case group and control group are predominantly of Caucasian ancestry (83.5% control group and 70.6% HCV+ group). The mean age observed in the control group was 57.21 ± 7.91 years (range: 41–75 years) and in the HCV+ group 59.97 ± 8.71 (range: 32– 81 years). All individuals of the control group were male since they were originally genotyped as controls to an association study dealing with prostate cancer. Among the HCV+ group, 138 (47.1 %) patients were male and 155 (52.9 %) female.

Considering demographic and clinical features, HCV+ individuals were stratified according to clinical outcome (fibrosis, cirrhosis and HCC), age, sex, ethnicity, declared smoker and alcohol drinker, both habits currently or in the past, and HCV transmission via blood transfusion. Analyses of the other collected variables were described by Ellwanger et al ⁽²⁸⁾. The analysis of the relationship

between alcohol consumption and fibrosis, cirrhosis and HCC was performed using the chi-square test. There was no statistically significant difference when outcomes groups [fibrosis and HCC ($p = 0.235$); cirrhosis and HCC ($p = 0.339$); fibrosis and cirrhosis ($p = 0.625$) were compared in relation to alcohol consumption.

3.2. CCR2-64I does not influence in clinicopathologic status

Among the HCV+ group, 44 (15%) patients had fibrosis at the time, while 158 (53.9%) patients had cirrhosis and 91 (31%) patients developed hepatocarcinoma. There was no statistically significant difference when the allelic frequency was compared in relation to hepatic outcomes in HCV+ ($p < 0.05$). The Table 2 shows the CCR2-64I genotypic and allelic frequencies.

Table 2. CCR2-64I genotypic and allelic frequencies

CCR2-64I	Control group* <i>n</i> =118	HCV+ group <i>n</i> =293	Stratification of the HCV+ group , <i>n</i> =293		
			HCV+/fibrosis group <i>n</i> =44	HCV+/cirrhosis group <i>n</i> =158	HCV+/HCC group <i>n</i> =91
wt/wt, <i>n</i> (%)	88 (74.6)	238 (81.2)	33 (75.0)	127 (80.4)	78 (85.7)
wt/64I, <i>n</i> (%)	27 (22.9)	53 (18.1)	11 (25.0)	30 (19.0)	12 (13.2)
64I/64I, <i>n</i> (%)	3 (2.5)	2 (0.7)	-	1 (0.6)	1 (1.1)
wt, <i>n</i> (%)	203 (86.0)	529 (90.3)	77 (87.5)	284 (89.9)	168 (92.3)
64I, <i>n</i> (%)	33 (14.0)	57 (9.7)	11 (12.5)	32 (10.1)	14 (7.7)

n, sample number. wt/wt, wild homozygote genotype. wt/64I, heterozygote genotype. 64I/64I, variant homozygote genotype. HCC, hepatocarcinoma. *Data obtained from Zambra et al. (2013).

3.3. CCR2-64I and HCV infection susceptibility

The genotypic frequencies in all groups were in agreement with the Hardy-Weinberg equilibrium. The allele frequencies of CCR2-64I were 14.0%, and 9.7% in control, and HCV+ groups, respectively. Considering the genotypic frequencies, the comparisons between the HCV + group and the control group ($p = 0.123$), HCV+/fibrosis patients and controls ($p = 0.733$), HCV+/cirrhosis patients and controls ($p = 0.309$) and HCV+/HCC patients and controls ($p = 0.132$) did not present statistically significant differences. The Table 3 presents the comparisons between the groups considering the genotypic frequencies.

Table 3. Comparisons between the groups considering the genotypic frequencies*

Comparison	p -value**
HCV+ <i>versus</i> Control	0.123
HCV+/fibrosis <i>versus</i> Control	0.733
HCV+/cirrhosis <i>versus</i> Control	0.309
HCV+/HCC group <i>versus</i> Control group	0.132

* Detailed data in Table 2. **Exact Fisher's test.

Similarly, comparison for the presence (64I/64I +wt/64I) or the absence (wt/wt) of the CCR2-64I allele considering HCV+/fibrosis patients versus controls (OR = 0.88, 95%CI = 0.42 - 1.83, P = 0.869), HCV+/cirrhosis patients versus controls (OR = 0.69, 95%CI = 0.41 - 1.16, P = 0.209) and HCV+/HCC patients versus controls (OR = 0.51, 95%CI = 0.27 - 0.99, P = 0.063) do not yield statistically significant differences when groups were compared in relation to allele frequencies ($p < 0.05$). The Table 4 presents the result of comparisons between the groups considering the allelic frequencies.

Table 4. Comparisons between the groups considering the allelic frequencies*

Comparison	O.R.	C.I. 95%	p -value**
HCV+ <i>versus</i> Control	0.66	0.42 - 1.05	0.100
HCV+/fibrosis <i>versus</i> Control	0.88	0.42 - 1.83	0.869
HCV+/cirrhosis <i>versus</i> Control	0.69	0.41 - 1.16	0.209
HCV+/HCC <i>versus</i> Control	0.51	0.27 - 0.99	0.063

O.R., odds ratio. C.I., confidence interval. * Detailed data in Table 2. **Pearson's chi-square with Yates's correction

4. DISCUSSION

In the present study, the term Afro-Brazilian designates phenotypically Black Brazilian individuals. This nomenclature does not directly evaluate individuals' ancestry through genetic markers, but rather phenotypic features such as skin color, and patients' self-report of ancestry. The self-report "color" classification is frequently used in Brazil, and is well documented in different studies⁽²³⁻²⁵⁾ including previous studies of our group⁽²⁶⁾. Actually, the Southern Brazilian population typically presents individuals classified as White with a mean European ancestry of 85.5% and 1% of African ancestry, while individuals classified as Brown and Black, have approximately 45% of African, 44% of European and 11% of Amerindian ancestry⁽²³⁾.

According to our results, the CCR2-64I variant did not directly influence the susceptibility to HCV infection, or the development of fibrosis, cirrhosis and HCC in the individuals evaluated. However, there are still inconsistencies in the scientific literature about the role of this genetic variant on different diseases and especially concerning aspects of HCV infection. A limitation of the present study is that the control group sample was composed only by men while the HCV group was

composed by both women and men, although there is no data in the literature suggesting that the frequencies of the evaluated variant is affected by gender. Also, the fact that the functional role of CCR2-64I in HCV infection and hepatic diseases development is still poorly understood limits the possibility of specific discussions.

In our group, Zambra et al. ⁽²²⁾ found CCR2-64I as a protective factor to prostate cancer when compared with benign prostatic hyperplasia, although the statistically significant difference was lost after correction for multiple comparisons. Similarly, Coelho et al ⁽²⁹⁾ found that the CCR2-64I polymorphism might have a protective role in the evolution from high-grade squamous intraepithelial lesions to invasive cervical cancer. In addition, other study showed ⁽³⁰⁾ a significant difference when the genotype and allelic frequencies in breast cancer and control groups were compared. Actually, in this study, both the mutated allele and the heterozygote genotype were significantly associated to breast cancer protection. In contrast, The CCR2-64I variant was reported as a risk factor for hepatocellular cancer by Yeh et al. ⁽³¹⁾. In their study, the authors verified the CCR2-64I gene polymorphism as an important factor for the susceptibility of HCC but not as an influencer in the clinical pathological progression of HCC⁽³¹⁾, and also described that the contribution of the CCR2-64I gene polymorphism to HCV susceptibility not affect the liver injury-related clinical pathological characteristics. Finally, Narter et al. ⁽³²⁾ suggested CCR2-64I as a risk factor for bladder cancer.

The essential function of CCR2 in immunological responses suggests that the CCR2-64I polymorphism may have key roles in the development of diseases associated to HCV infection. Chemokines and their receptors have been shown to regulate several events in carcinogenesis, including cellular proliferation, angiogenesis, tissue invasion and metastasis, and leukocyte infiltration ⁽³³⁾. Some

studies have suggested an influence of the CCR2/CCL2 axis in cancer metastasis, mainly by sustaining cancer cell proliferation and survival, stimulating cancer cell migration and invasion, and through the induction of deleterious inflammation and angiogenesis. CCL2 preferentially binds the CCR2 receptor, which is expressed in various tissues including blood, brain, heart, kidney, liver, lung, ovary, pancreas, spinal cord, spleen and thymus, although it can also binds to CCR4. The CCL2-CCR2 signaling axis is especially important for successful metastasis, and has been shown to be involved in both the early and late steps of the metastatic process in experimental models ⁽³⁴⁾. In a review, Lim et al. ⁽³⁵⁾ evaluated several clinical trials targeting either CCL2 or CCR2 in distinct experimental studies on metastatic cancers, with a particular focus on prostate, breast and colorectal cancers. It becomes evident that CCL2-CCR2 signaling has multiple key effects on both cancer and stromal cells, which altogether, appear to predominately favor metastatic development and progression. However, no trials that evaluate the CCL2-CCR2 signaling axis in fibrosis, cirrhosis and hepatocarcinoma were yet found in the literature. Our study stands out by the analysis of the potential of the CCR2 gene polymorphism in affect clinical outcomes of HCV infection.

Although one of the best characterized chemokines during hepatic fibrogenesis, acting in chronically inflamed liver, secreted by hepatocytes, biliary epithelial cells, Kupffer cells, and HSCs and its expression being associated with the infiltration of monocytes, which express the cognate receptor CCR2, the CCL2 molecule still do not revealed all their secrets concerning its relation with virus infection and cancer development ^(36, 37). In chronic hepatitis C, the expression of different chemokines in the liver has been described. Costantini et al. ^(38, 39) observed that several serum mediators are possible markers of specific outcomes related to

hepatic diseases, including C-X-C motif ligand (CXCL)-9, as a potential marker for evaluating the progression of CHC (definer CHC) to cirrhosis, and CXCL-10, CXCL-12 might be used as potential markers for evaluating the progression of chronic hepatitis to cirrhosis. Importantly, CXCL10 expression is increased in the liver and peripheral blood during chronic hepatitis C ^(40, 41, 42, 43) and CXCL9 and CXCL11 are also increased in the serum and liver of subjects with chronic hepatitis C ^(41,44). The intrahepatic expression of CCL5 is also elevated in inflammation and this molecule produced by hepatocytes, sinusoidal endothelial cells and biliary epithelium ⁽⁴⁵⁾. Finally, several studies have reported an increased level of CCL3 and CCL4 in the liver or in serum. The expression of these chemokines in the liver can be directly induced by HCV infection. Although no association of the CCR-64I polymorphism with hepatitis C susceptibility was observed in our study it is still important to continue to evaluate other chemokine ligands and their respective receptors as well as other polymorphisms that may be related to protection or susceptibility to hepatitis C virus infection.

In conclusion, our study suggests that the CCR2-64I variant is not directly associated to HCV infection susceptibility or outcome. Nevertheless, due to inconsistencies in the scientific literature about the role of this polymorphism, further investigations with functional assessments, meta-analysis and larger samples in different human populations could help to clarify the role of this genetic variant in HCV associated diseases. The understanding about CCR2-64I may be important to novel therapeutic approaches against HCV in the future aiming to clinical improvement of infected subjects.

REFERENCES

1. World Health Organization. Global Hepatitis Report, 2017 - Geneva. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2019.
2. Wang LS, D'Souza LS, Jacobson IM. Hepatitis C – A clinical review. *J Med Virol*. 2016; 88(11): 1844-1855.
3. Oo YH, Adams DH. The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver. *J Autoimmun*. 2010; 34: 45–54.
4. Conti F, Buonfiglioli F, Scuteri A, Crespi C, Bolondi L, Caraceni P, Foschi FG, Lenzi M, Mazzella G, Verucchi G, et al. Early occurrence and recurrence of hepatocellular carcinoma in HCV-related cirrhosis treated with direct-acting antivirals. *J Hepatol*. 2016; 65: 727–733.
5. Wald O, Weiss ID, Galun E, Peled A. Chemokines in hepatitis C virus infection: pathogenesis, prognosis and therapeutics. *Cytokine*. 2007; 39(1): 50-62.
6. Zlotnik A, Yoshie O. The chemokine superfamily revisited. *Immunity*. 2012; 36: 705–716.
7. Wasmuth HE, Tacke F, Trautwein C. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis*. 2010; 30: 215–225.
8. Nattermann J, Zimmermann H, Iwan A, von Lilienfeld-Toal M, Leifeld L, Nischalke HD. Hepatitis C virus E2 and CD81 interaction may be associated with altered trafficking of dendritic cells in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2006; 44: 945–954.

9. Oo YH, Shetty S, Adams DH. The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver. *Dig Dis*. 2010; 28: 31–44.
10. Asselah T, Bieche I, Laurendeau I, Paradis V, Vidaud D, Degott C, et al. Liver gene expression signature of mild fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2005; 129: 2064–2075.
11. Zhdanov KV, Gusev DA, Chirskii VS, Sysoev KA, Iakubovskaia LA, Shakhmanov DM, et al. Chronic HCV-infection and expression of mRNA of CC-chemokines and their receptors. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 2008; 4: 73-78.
12. Neuman MG, Benhamou JP, Marcellin P, Valla D, Malkiewicz IM, Katz GG. Cytokine–chemokine and apoptotic signatures in patients with hepatitis C. *Transl Res*. 2007;149:126–136.
13. Wang Z, Xie H, Zhou L, Liu Z, Fu H, Zhu Y, Xu L, Xu J. CCL2/CCR2 axis is associated with postoperative survival and recurrence of patients with non-metastatic clear-cell renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7 (32): 51525-51534.
14. Yang Y, Zhai C, Chang Y, Zhou L, Shi T, Tan C, Xu L, Xu J. High expression of chemokine CCL2 is associated with recurrence after surgery in clear-cell renal cell carcinoma. *Urol Oncol*. 2016; 34: 238.
15. Zhang J, Patel L, Pienta KJ. CC chemokine ligand 2 (CCL2) promotes prostate cancer tumorigenesis and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010; 21: 41–48.
16. Lim SY, Yuzhalin AE, Gordon-Weeks AN, Muschel RJ. Targeting the CCL2-CCR2 signaling axis in cancer metastasis. *Oncotarget*. 2016; 7: 28697–28710.

- 17.** Rao Q, Chen Y, Yeh CR, Ding J, Li L, Chang C, Yeh S. Recruited mast cells in the tumor microenvironment enhance bladder cancer metastasis via modulation of ER β /CCL2/CCR2 EMT/MMP9 signals. *Oncotarget*. 2016; 7: 7842–7855.
- 18.** Smith MW, Carrington M, Winkler C, Lomb D, Dean M, Huttley G, et al. CCR2 chemokine receptor and AIDS progression. *Nat Med* 1997; 3: 1052–1053.
- 19.** Yeh CB, Tsai HT, Chen YC, Kuo WH, Chen TY, Hsieh YH, et al. Genetic polymorphism of CCR2-64I increased the susceptibility of hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol* 2010; 102 (3): 264–270.
- 20.** Narter KF, Agachan B, Sozen S, Cincin ZB, Isbir T. CCR2-64I is a risk factor for development of bladder cancer. *Genet Mol Res* 2010; 9 (2): 685–692.
- 21.** Zafiroopoulos A, Crikas N, Passam AM, Spandidos DA. Significant involvement of CCR2-64I and CXCL12-3a in the development of sporadic breast cancer. *J Med Genet* 2004; 41(5): 59.
- 22.** Zambra FM, Biolchi V, Brum IS, Chies JA. CCR2 and CCR5 genes polymorphisms in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Human Immunology*. 2013; 74: 1003–1008.
- 23.** Pena SDJ , Pietro G Di, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy FSG, Kohlrausch F et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *Plos One*. 2011; 6: 17063.
- 24.** Leite TKM, Fonseca MRC, França NM, Parra EJ, Pereira RW. Genomic ancestry, self-reported “color” and quantitative measures of skin pigmentation in brazilian admixed siblings. *Plos one*. 2011; 6: 27162.

- 25.** Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 177-182.
- 26.** Vargas AE, Marrero AR, Salzano FM, Bortolini MC, Chies JAB. Frequency of CCR5 32 in Brazilian populations. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2006; 39: 321-325.
- 27.** Smith MW, Carrington M, Winkler C, Lomb D, Dean M, Huttley G, et al. CCR2 chemokine receptor and AIDS progression. *Nat Med* 1997; 3: 1052–1053.
- 28.** Ellwanger JH, Leal BK, Valverde-Villegas JM, Simon D, Marangon CG, Mattevi VS, Lazzaretti RK, Sprinz E, Kuhmmer R, Chies JAB. CCR5 Δ 32 in HCV infection, HCV/HIV co-infection, and HCV-related diseases. *Infection, Genetics and Evolution.* 2018; 59: 163–166.
- 29.** Coelho A, Matos A, Catarino R. Protective role of the polymorphism CCR2-64I in the progression from squamous intraepithelial lesions to invasive cervical carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2005; 96 (3): 760-764.
- 30.** Zafiropoulos A, Crikas N, Passam AM. Significant involvement of CCR2-64I and CXCL12-3a in the development of sporadic breast cancer. *J Med Genet.* 2004; 41(5):59.
- 31.** Yeh CB, Tsai HT, Chen YC, Kuo WH, Chen TY, Hsieh YH, et al. Genetic polymorphism of CCR2-64I increased the susceptibility of hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol.* 2010; 102 (3): 264–270.
- 32.** Narter KF, Agachan B, Sozen S, Cincin ZB, Isbir T. CCR2-64I is a risk factor for development of bladder cancer. *Genet Mol Res.* 2010; 9(2): 685-92.

- 33.** Larrubia JR, Martínez SB, Calvino M, Vilallobos ES, Cid TP. Role of chemokines and their receptors in viral persistence and liver damage during chronic hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* 2008 Dec 21; 14(47): 7149–7159.
- 34.** Lim SY, Yuzhalin AE, Weeks ANG, Musch RJ. Targeting the CCL2-CCR2 signaling axis in cancer metastasis. *Oncotarget.* 2016; 7 (19): 28697–28710.
- 35.** Lim, SY et al. Targeting the CCL2-CCR2 signaling axis in cancer metastasis. *Oncotarget.* 2016; 7 (19): 28697-28710.
- 36.** Ramm, GA. Chemokine (C-C motif) receptors in fibrogenesis and hepatic regeneration following acute and chronic liver disease. *Hepatology.* 2009; 50: 1664–1668.
- 37.** Marra F, Franco R De, Grappone C et al. Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 during active hepatic fibrogenesis: correlation with monocyte infiltration. *Am J Pathol.* 1998; 152: 423–430.
- 38.** Bartoli C, Civatte M, Pellissier JF, Figarella-Branger D. CCR2A and CCR2B, the two isoforms of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor are up-regulated and expressed by different cell subsets in idiopathic inflammatory myopathies. *Acta Neuropathol.* 2001; 102: 385–392.
- 39.** Sanders SK, Crean SM, Boxer PA, Kellner D, LaRosa GJ, Hunt SW. Functional differences between monocyte chemoattractant protein-1 receptor A and monocyte chemoattractant protein-1 receptor B expressed in a Jurkat T cell. *Journal of Immunology.* 2000; 165: 4877–4883.

- 40.** Patzwahl R, Meier V, Ramadori G, Mihm S. Enhanced expression of interferon-regulated genes in the liver of patients with chronic hepatitis C virus infection: detection by suppression-subtractive hybridization. *J Virol.* 2001; 75: 1332–1338.
- 41.** Shields PL, Morland CM, Salmon M, Qin S, Hubscher SG, Adams DH. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. *J Immunol.* 1999; 163: 6236–6243.
- 42.** Narumi S, Tominaga Y, Tamaru M, Shimai S, Okumura H, Nishioji K, Itoh Y, Okanoue T. Expression of IFN-inducible protein-10 in chronic hepatitis. *J Immunol.* 1997; 158: 5536–5544.
- 43.** Larrubia JR, Calvino M, Benito S, Sanz-de-Villalobos E, Perna C, Pérez-Hornedo J, González-Mateos F, García-Garzón S, Bienvenido A, Parra T. The role of CCR5/CXCR3 expressing CD8+ cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* 2007; 47: 632–641.
- 44.** Bièche I, Asselah T, Laurendeau I, Vidaud D, Degot C, Paradis V, Bedossa P, Valla DC, Marcellin P, Vidaud M. Molecular profiling of early stage liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Virology.* 2005; 332: 130–144.
- 45.** Apolinario A, Majano PL, Alvarez-Pérez E, Saez A, Lozano C, Vargas J, García-Monzón C. Increased expression of T cell chemokines and their receptors in chronic hepatitis C: relationship with the histological activity of liver disease. *Am J Gastroenterol.* 2002; 97: 2861–2870.

8. CONCLUSÃO

A variante CCR2-64I não influenciou diretamente a suscetibilidade à infecção pelo HCV, assim como também não foi um fator de proteção ou de risco no desenvolvimento de fibrose, cirrose e CHC. No entanto, ainda existem inconsistências e dúvidas na literatura científica sobre o papel dessa variante genética em diferentes aspectos da infecção pelo HCV.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse trabalho, apresentamos a atuação do polimorfismo genético CCR2-64I em pacientes infectados pelo HCV. Estudos adicionais tornam-se necessários para confirmar os achados encontrados nesta patologia. Além disso, os estudos que encontraram associação positiva ou negativa enfatizam a importância de estudos com grande número de caso-controle para confirmar os achados por eles publicados.

Vale ainda destacar que estudos envolvendo polimorfismos são complexos porque uma associação genética, embora válida para uma população étnica específica, pode não ser relevante para indivíduos de origens étnicas distintas. Nossa perspectiva é avaliar outros polimorfismos de genes de receptores envolvidos na infecção crônica da hepatite C para fins de suscetibilidade ao contágio e progressão dos desfechos hepáticos envolvidos nessa patologia.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Global Hepatitis Report, 2017 - Geneva. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2019.
2. Wang LS, D'Souza LS, Jacobson IM. Hepatitis C – A clinical review. *J Med Virol*. 2016; 88(11): 1844-1855.
3. Ragonnet R, Deuffic-Burban S, Boesecke C, Guiguet M, Lacombe K, Guedj J, Rockstroh JK, Yazdanpanah Y. Estimating the time to diagnosis and the chance of spontaneous clearance during acute hepatitis C in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Open Forum Infect Dis*. 2017; 4(1): 235.
4. Zhou WC, Zhang QB and Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2014; 20 (23): 7312.
5. Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *J of Hepatology*. 2014; 61(1): 58–68.
6. Zare F, Fattahi MR, Sepehrimanesh M, Safarpour AR. Economic burden of hepatitis C virus infection in different stages of disease: A report from Southern Iran. *Hepatitis monthly*. 2016; 16(4).
7. Albillos A, Lario M, Álvarez-Mon M. Cirrhosis-associated immune dysfunction: distinctive features and clinical relevance. *J Hepatol*. 2014; 61(1): 1385–1396.
8. Saito, T et al.. Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature*. 2008; 454 (7203): 523-527.
9. Wolf MJ, Roblek M, Lorentzen A, Heikenwalder M. Inflammatory chemokines and metastasis--tracing the accessory Oncogene. 2014; 33 (25): 3217-24.
10. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res*. 2006; 66 (2): 605-612.

11. Zhao Q. Dual targeting of CCR2 and CCR5: therapeutic potential for immunologic and cardiovascular diseases. *J Leukoc Biol.* 2010; 88(1): 41-55.
12. Stacy M, Horner MG. Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus. *Jr. Nat Med.* 2013; 19(7): 879–888.
13. Yeh CB, Tsai HT, Chen YC, Kuo WH, Chen TY, Hsieh YH. Genetic polymorphism of CCR2-64I increased the susceptibility of hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol.* 2010;102(3):264–70.
14. Narter KF, Agachan B, Sozen S, Cincin ZB, Isbir T. CCR2-64I is a risk factor for development of bladder cancer. *Genet Mol Res.* 2010; 9(2):685–92.
15. PetruzzIELLO A, MarigliANO S, LoquercIO G, Cozzolino A, Cacciapuoti C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J Gastroenterol.* 2016 Sep 14;22(34): 7824-40
16. Wei, L.; Lok, A. S. F. Impact of new hepatitis c treatments in different regions of the world. *Gastroenterology.* 2014; 146 (5): 1145–1150.
17. Lemoine, M.; Thursz, M. Hepatitis C, A global issue: Access to care and new therapeutic and preventive approaches in resource-constrained areas. *Seminars in Liver Disease.* 2014; 34(1): 89-97.
18. Brasil, Ministério da Saúde. *Sistema de Informação de Agravos de Notificação 2018.* Secretaria de Vigilância em Saúde. 2017.
19. Brasil, Ministério da Saúde. *Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções.* Secretaria de Vigilância em Saúde. 2017.

- 20.** Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, Simmonds P. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: Updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*. 2014; 59 (1): 318–327.
- 21.** Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Shearer K, Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection *Journal of Hepatology Update: Hepatitis C*. *Journal of Hepatology*. 2014; 44 (61): 45–57.
- 22.** Blanch, S et al. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterology e Hepatology*. 2017; 2(3): 161–176.
- 23.** Sadeghi F, Salehi-Vaziri M, Almasi-Hashiani A, Gholami-Fesharaki M, Pakzad R, Alavian SM. Prevalence of hepatitis C Virus genotypes among patients in countries of the Eastern Mediterranean Regional Office of WHO (EMRO): A Systematic Review and Meta-Analysis. *Hepatitis Monthly*. 2016; 16(4).
- 24.** Freitas, SZ et al. Coinfecção HIV e HCV: Prevalência, fatores associados e caracterização dos genótipos na Região Centro-Oeste do Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 2014; 56 (1): 517–524.
- 25.** Lampe E, Lewis-Ximenez L, Espírito-Santo MP, Delvaux NM, Pereira SA, Peres-da-Silva A, Martins RM, Soares MA, Santos AF, Vidal LL, Germano FN, de Martinez AM, Basso R, Pinho JR, Malta FM, Gomes-Gouvêa M, Moliterno RA, Bertolini DA, Fujishima MA, Bello G. Genetic diversity of HCV in Brazil. *Antiviral Therapy*. 2013; 18 (3): 435–444.

- 26.** Campiotto S, Pinho JRR, Carrilho FJ, Silva LC Da, Souto FJD, Spinelli V, Pereira LMMB, Coelho HSM, Silva AO, Fonseca JC, Rosa H, Lacet CMC, Bernardini AP. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2005; 38(1):41-49.
- 27.** Prince AM, Grady GF, Hazzi C, Brotman B, Kuhns WJ, Levine RW, Millian SJ. Long-Incubation Post-Transfusion Hepatitis without Serological Evidence of Exposure to Hepatitis B Virus. *Lancet.* 1974; 2(7875): 241-246.
- 28.** Pozzeto, B, Memmi, M, Garraud, O, Roblin, X, Berthelot, P. Health care associated hepatitis C virus infection. *World Journal of Gastroenterology*,. 2014; 20 (46): 17265–17278.
- 29.** International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2019.
- 30.** Roingeard P, Hourieux C, Blanchard E, Brand D, Ait-Goughoulte M. Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis. *Biology of the Cell.* 2004; 96 (2): 103–108.
- 31.** Fauteux-Daniel S, Larouche A, Calderon V, Boulais J, Béland C, Ransy DG, Boucher M, Lamarre V, Lapointe N, Boucoiran I, Le Campion A, Soudeyns H. Vertical Transmission of Hepatitis C Virus: Variable Transmission Bottleneck and Evidence of Midgestation In Utero Infection. *J Virol.* 2017; 91(23): 1372-1317.
- 32.** Gardenal, RVC. et al. Hepatite C e gestação: Análise de fatores associados à transmissão vertical. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2011; 44 (1): 43–47.
- 33.** Ferreira, A et al. Hepatites Virais A, B e C em crianças e adolescentes. *Revista Médica de Minas Gerais.* 2014; 24 (2): 46–60.

- 34.** Sharma SA, Feld JJ. Acute hepatitis C: management in the rapidly evolving world of HCV. *Curr Gastroenterol Rep.* 2014; 16 (2): 371.
- 35.** Saraiva GN, Rosário NF, Medeiros T, Leite PEC, Lacerda GS, Andrade TG, Azeredo EL, Ancuta P, Almeida JR, Xavier AR, Silva AA. Restoring Inflammatory Mediator Balance after Sofosbuvir-Induced Viral Clearance in Patients with Chronic Hepatitis C. *Mediators Inflamm.* 2018; 2018 (1): 8578051.
- 36.** Grebely J, Matthews GV, Hellard M, Shaw D, van Beek I, Petoumenos K, Alavi M, Yeung B, Haber PS, Lloyd AR, Kaldor JM, Dore GJ; ATACH Study Group. Adherence to treatment for recently acquired hepatitis C virus (HCV) infection among injecting drug users. *J Hepatol.* 2011; 55 (1): 76-85.
- 37.** Lingala S, Ghany MG. Natural History of Hepatitis C. *Gastroenterology clinics of North of America.* 2015; 44 (4): 717-34.
- 38.** Silveira AS. Hand-grip strength or muscle mass in cirrhotic patients: Who is the best? *Nutrition.* 2006; 22 (2): 218-219.
- 39.** Silva LD, Bering T, Rocha GA. The impact of nutrition on quality of life of patients with hepatitis C. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2017; 20(5): 420-425.
- 40.** Park SK, Cho YK, Park JH, Kim HJ, Park DI, Sohn CI, Jeon WK, Kim BI. Change of insulin sensitivity in hepatitis C patients with normal insulin sensitivity: a 5-year prospective follow-up study variation of insulin sensitivity in HCV patients. *Intern Med J.* 2010; 40 (7): 503-511.
- 41.** Sheikh MY, Choi J, Qadri I, Friedman JE, Sanyal AJ. Hepatitis C virus infection: molecular pathways to metabolic syndrome. *Hepatology.* 2008; 47 (6): 2127-2133.

- 42.** American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes – 2017.
- 43.** Romero-Gómez M. Hepatitis C and insulin resistance: steatosis, fibrosis and non response. *Rev Esp Enferm Dig.* 2006; 98 (8): 605-615.
- 44.** Moser B, Loetscher M, Piali L, Loetscher P. Lymphocyte responses to chemokines. *Int Rev Immunol.* 1998; 16 (1): 323–344.
- 45.** Karnoub AE, Weinberg RA. Chemokine networks and breast cancer metastasis. *Breast Dis.* 2007; 26(1) 75-85.
- 46.** Struyf S, Proost P, Van Damme J. Regulation of the immune response by the interaction of chemokines and proteases. *Adv Immunol.* 2003; 81(1): 1-44.
- 47.** Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett.* 2008; 267: 226-244.
- 48.** Melgarejo E, Medina MÁ, Sánchez-Jiménez F, Urdiales JL. Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator in inflammatory processes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009; 41(5): 998-1001.
- 49.** Hembruff SL, Cheng N. Chemokine signaling in cancer: Implications on the tumor microenvironment and therapeutic targeting. *Cancer Ther.* 2009 ; 7: 254-267.
- 50.** Zlotnik A, Yoshie O. The chemokine superfamily revisited. *Immunity.* 2012; 36(5): 705-716.
- 51.** Zhu Y, Murakami F. Chemokine CXCL12 and its receptors in the developing central nervous system: Emerging themes and future perspectives. *Dev. Neurobiol.* 2012; 72: 1349–1362.

- 52.** Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*. 1998; 393: 595–599.
- 53.** Calderon L, Boehm T. Three chemokine receptors cooperatively regulate homing of hematopoietic progenitors to the embryonic mouse thymus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011; 108: 7517–7122.
- 54.** Esche C, Stellato C, Beck LA. Chemokines: Key players in innate and adaptive immunity. *J. Investig. Dermatol*. 2005; 125: 615–628.
- 55.** Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008; 133 (5): 775-787.
- 56.** Dimberg A. Chemokines in angiogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immun.* 2010; 341: 59–80.
- 57.** Melgarejo E, Medina MÁ, Sánchez-Jiménez F, Urdiales JL. Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator in inflammatory processes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009; 41 (5): 998-1001.
- 58.** Oo YH, Adams DH. The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver. *J. Autoimmun*. 2010; 34: 45–54.
- 59.** The effect of obesity on intrahepatic cytokine and chemokine expression in chronic hepatitis C infection. Palmer C, Corpuz T, Guirguis M, O'Toole S, Yan K, Bu Y, Jorgenson J, Talbot M, Loi K, Lloyd A, Zekry A *Gut*. 2010 Mar; 59(3):397-404.
- 60.** Asselah T, Bieche I, Laurendeau I, Paradis V, Vidaud D, Degott C, Martinot M, Bedossa P, Valla D, Vidaud M, et al. Liver gene expression signature of mild fibrosis in patients with chronic hepatitis, C. *Gastroenterology*. 2005; 129: 2064–2075.

- 61.** Hokeness KL, Kuziel WA, Biron CA, Salazar-Mather TP. Monocyte chemoattractant protein-1 and CCR2 interactions are required for IFN- α/β -induced inflammatory responses and antiviral defense in liver. *J. Immunol.* 2005; 174: 1549–1556.
- 62.** Loetscher P, Uguccioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini C, Dayer JM. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature.* 1998; 391: 344–345.
- 63.** Megjugorac NJ, Young HA, Amrute SB, Olshalsky SL, Fitzgerald-Bocarsly P. Virally stimulated plasmacytoid dendritic cells produce chemokines and induce migration of T and NK cells. *J. Leukoc. Biol.* 2004; 75: 504–514.
- 64.** Salazar-Mather TP, Lewis CA, Biron CA. Type I interferons regulate inflammatory cell trafficking and macrophage inflammatory protein 1 α delivery to the liver. *J. Clin. Investig.* 2002; 110: 321–330.
- 65.** Decalf J, Fernandes S, Longman R, Ahloulay M, Audat F, Lefrerre F, Rice CM, Pol S, Albert ML. Plasmacytoid dendritic cells initiate a complex chemokine and cytokine network and are a viable drug target in chronic HCV patients. *J. Exp. Med.* 2007; 204: 2423–2437.
- 66.** Piqueras B, Connolly J, Freitas H, Palucka AK, Banchereau J. Upon viral exposure myeloid and plasmacytoid dendritic cells produce 3 waves of distinct chemokines to recruit immune effectors. *Blood.* 2006; 107: 2613–2618.
- 67.** Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 2006; 354(6): 610-621.

- 68.** Attar R, Agachan B, Kuran SB, Cacina C, Sozen S, Yurdum LM, Attar E, Isbir T. Association of CCL2 and CCR2 gene variants with endometrial cancer in Turkish women. *In Vivo*. 2010; 24(2): 243-248.
- 69.** Bartoli C, Civatte M, Pellissier JF, Figarella-Branger D. CCR2A and CCR2B, the two isoforms of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor are up-regulated and expressed by different cell subsets in idiopathic inflammatory myopathies. *Acta Neuropathol*. 2001; 102(4): 385-392.
- 70.** Navratilova Z. Polymorphisms in CCL2&CCL5 chemokines/chemokine receptors genes and their association with diseases. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2006; 150(2): 191-204.
- 71.** Deshmane SL1, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*. 2009; 29(6): 313-326.
- 72.** Lamagna C, Aurrand-Lions M, Imhof BA. Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis. *J. Leukoc. Biol*. 2006; 80: 705–713.
- 73.** Daly C, Rollins BJ. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in inflammatory disease and adaptive immunity: therapeutic opportunities and controversies. *Microcirculation*. 2003; 10: 247–257.
- 74.** Yoshimura T, Liu M, Chen X et al. Crosstalk between Tumor Cells and Macrophages in Stroma Renders Tumor Cells as the Primary Source of MCP-1/ MCP-1 in Lewis Lung Carcinoma. *Front. Immunol*. 2015; 6: 332.
- 75.** Kucukgergin C, Isman FK, Cakmakoglu B et al. Association of polymorphisms in MCP-1, CCR2, and CCR5 genes with the risk and clinicopathological characteristics of prostate cancer. *DNA Cell Biol*. 2012; 31: 1418–1424.

- 76.** Attar R, Agachan B, Kuran SB et al. Association of MCP-1 and CCR2 gene variants with endometrial cancer in Turkish women. *In Vivo*. 2010; 24: 243–248.
- 77.** Mitchem JB, DeNardo DG. Battle over MCP-1 for control of the metastatic niche: neutrophils versus monocytes. *Breast Cancer Res*. 2012; 14: 315.
- 78.** Soria G, Ben-Baruch A. The inflammatory chemokines MCP-1 and CCL5 in breast cancer. *Cancer Lett*. 2008; 267: 271–285.
- 79.** Bonapace L, Coissieux MM, Wyckoff J, Mertz KD, Varga Z, Junt T, Bentires-Alj M. Cessation of CCL2 inhibition accelerates breast cancer metastasis by promoting angiogenesis. *Nature*. 2014; 515: 130–133.
- 80.** Fujimoto H, Sangai T, Ishii G et al. Stromal MCP-1 in mammary tumors induces tumor-associated macrophage infiltration and contributes to tumor progression. *Int. J. Cancer*. 2009; 125: 1276–1284.
- 81.** Loberg RD, Ying C, Craig M, Day LL, Sargent E, Neeley C, Wojno K, Snyder LA, Yan L, Pienta KJ. Targeting CCL2 with systemic delivery of neutralizing antibodies induces prostate cancer tumor regression in vivo. *Cancer Res*. 2007; 67: 9417–9424.
- 82.** Smith MW, Carrington M, Winkler C, Lomb D, Dean M, Huttley G, et al. CCR2 chemokine receptor and AIDS progression. *Nat Med* 1997; 3: 1052–1053.
- 83.** Nakayama EE, Tanaka Y, Nagai Y, Iwamoto A, Shioda T. A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform. *AIDS*. 2004; 18(5): 729-38.
- 84.** Zafiropoulos A, Crikas N, Passam AM, Spandidos DA. Significant involvement of CCR2-64I and CXCL12-3a in the development of sporadic breast cancer. *J Med Genet* 2004; 41(5): 59.

- 85.** Narter KF, Agachan B, Sozen S, Cincin ZB, Isbir T. CCR2-64I is a risk factor for development of bladder cancer. *Genet Mol Res.* 2010; 9(2): 685-92.
- 86.** Rafrafi A, Kaabachi S, Kaabachi W, Chahed B, Amor AB, Mbarik M, Charrad R, Salah MO, Hamzaoui K, Sassi FH. CCR2-64I polymorphism is associated with Non-Small Cell Lung Cancer in Tunisian patients. *Hum Immunol.* 2015; 76(5): 348-354.
- 87.** Yeh CB, Tsai HT, Chen YC, Kuo WH, Chen TY, Hsieh YH, et al. Genetic polymorphism of CCR2-64I increased the susceptibility of hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol.* 2010; 102(3): 264–270.