

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ESTUDO DE POLIMORFISMOS DOS GENES CXCR2 E IL-8 EM PACIENTES  
COM CÂNCER DE PRÓSTATA E GRUPO CONTROLE**

Juliana Pires Marafon Franz

Porto Alegre

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ESTUDO DE POLIMORFISMOS DOS GENES CXCR2 E IL-8 EM PACIENTES  
COM CÂNCER DE PRÓSTATA E GRUPO CONTROLE**

Juliana Pires Marafon Franz

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Schwartzmann

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2015

#### CIP - Catalogação na Publicação

Franz, Juliana Pires Marafon

Estudo de polimorfismos dos genes CXCR2 e IL-8 em  
pacientes com câncer de próstata e grupo controle /  
Juliana Pires Marafon Franz. -- 2015.  
69 f.

Orientador: Gilberto Schwartzmann.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2015.

1. Câncer de próstata. 2. Polimorfismo genético. 3.  
Interleucina 8. 4. CXCR2. I. Schwartzmann, Gilberto,  
orient. II. Título.

**A minha família, pelo incentivo e carinho.**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Gilberto Schwartzmann, pela orientação e estímulo na realização desta pesquisa, por todas as oportunidades de crescimento científico e profissional.

Ao Professor Luiz Fernando Jobim, pela indispensável colaboração no desenvolvimento do trabalho laboratorial.

A Dra. Mariana Jobim, pela amizade e grande apoio na realização deste estudo.

A toda equipe do Laboratório de Imunologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial a Pâmela Portela, por todo o auxílio e disponibilidade no desenvolvimento prático deste projeto.

A todos os professores, médicos e funcionários do Serviço de Oncologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela acolhida, troca de experiências e por contribuírem para o meu aperfeiçoamento. Foi um privilégio fazer parte desta equipe!

Aos pacientes, pelo exemplo de força e coragem que enfrentam a suas doenças, que serve de inspiração diária para o meu trabalho.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela excelência nas atividades de ensino e pesquisa.

A Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, pela oportunidade concedida.

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE), pelo auxílio financeiro.

Ao Professor Mário Wagner, a Susi Comey e a Patrícia Salim pela análise estatística criteriosa e importantes sugestões na interpretação e descrição dos resultados.

Aos meus pais, pelo amor e incentivo constante, por investir no meu estudo e sempre acreditar na minha capacidade de desbravar novos horizontes.

As minhas queridas irmãs, Letícia e Denise, pelo apoio e amizade.

Ao meu marido Alexandre, pelo amor, incentivo e companheirismo, que foram fundamentais para realização deste projeto.

A minha amada filha Alice, por cada gesto carinhoso, cada sorriso, que enchem o meu dia de alegria e me dão força para superar novos desafios.

A Deus, por todas as conquistas e bençãos na minha vida.

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte desta trajetória.

**“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas,  
que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos,  
que nos levam sempre aos mesmos lugares.  
É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la,  
teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos”.**

(Fernando Pessoa)

## RESUMO

A Interleucina 8 (IL-8) é uma quimiocina CXC angiogênica que tem papel importante no desenvolvimento e progressão de vários tumores malignos, incluindo o câncer de próstata (CaP). O polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) -251 T/A da região promotora do gene da IL-8, relativo ao local de início da transcrição deste gene, está associado com a produção desta citocina. O efeito da IL-8 é mediado através de dois receptores de alta afinidade, CXCR1 e CXCR2. O presente estudo investigou a influência da variação dos genes IL-8 e CXCR2 na susceptibilidade e nas características clinicopatológicas do CaP em um grupo de brasileiros. Duzentos e um pacientes e 185 controles saudáveis foram selecionados neste estudo caso-controle. Amostras de sangue foram coletadas para extração de DNA; a tipagem da IL-8 -251 T/A e CXCR2 +1208 C/T foi realizada através da reação em cadeia da polimerase com sequência específica de primers (PCR-SSP), seguida pela eletroforese em gel de agarose. O risco associado entre os genótipos, a susceptibilidade do CaP e as características do tumor, foi estimado pelo *odds ratio* (OR), com intervalo de confiança de 95%, usando análise de regressão logística e ajustando para idade ao diagnóstico. Encontramos uma associação estatisticamente significativa entre o genótipo heterozigoto CT do gene CXCR2 +1208 e CaP. Este genótipo foi significativamente menos frequente em pacientes com estágio clínico T3-T4 comparado com T1-T2 (56.7% versus 80.5%). Nossos achados sugerem que os portadores do genótipo CT CXCR2 +1208 tiveram um efeito protetor para estágio avançado de CaP (CT versus CC: OR ajustado = 0.25;  $P = 0.02$ ). Não foi encontrada associação significativa entre o polimorfismo -251 T/A da IL-8 e os parâmetros clinicopatológicos do CaP. Estes resultados indicam que o genótipo CT do CXCR2 +1208 é menos frequente em estágios avançados de CaP, sugerindo que este receptor de quimiocina tenha um papel na patogênese desta doença.

**Palavras chave:** Interleucina 8; Receptores; CXCL8; CXCR2; Polimorfismo; Câncer de Próstata.



## ABSTRACT

Interleukin-8 (IL-8) is an angiogenic CXC chemokine that plays an important role in both the development and progression of several human malignancies including prostate cancer (PC). A single nucleotide polymorphism (SNP) at -251 upstream of the transcriptional start site of the IL-8 gene has been shown to influence its production. The effects of IL-8 are mediated by two highly related chemokine receptors, CXCR1 and CXCR2. The present study investigated the influence of the IL-8 and CXCR2 gene variation on susceptibility and clinicopathological characteristics of PC in a group of Brazilian subjects. Two hundred and one patients and 185 healthy controls were enrolled in a case-control study. Blood was collected for DNA extraction; typing of IL-8 -251 T/A and CXCR2 +1208 C/T genes was performed by polymerase chain reaction with sequence-specific primers (PCR-SSP), followed by agarose gel electrophoresis. Risk association between the genotypes, PC susceptibility and tumor characteristics was estimated by odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (95% CI) using logistic regression analysis, after adjusting for age at diagnosis. A significant association was found between the heterozygous CXCR2 +1208 CT genotype and PC. The CXCR2 +1208 CT genotype was significantly less frequent in patients with clinical stage T3-T4 compared to T1-T2 (56.7 versus 80.5%). Our findings suggest that carriers of the CXCR2 +1208 CT genotype had a protective effect for advanced PC (CT versus CC: adjusted OR = 0.25;  $P = 0.02$ ). No association was observed between the SNP for IL-8 -251 T/A and clinicopathological parameters of PC. These results indicated that the CXCR2 +1208 CT genotype is less frequent in advanced stages of PC, suggesting that this chemokine receptor plays a role in the pathogenesis of this disease.

**Keywords:** Interleukin 8; Receptors; IL-8; CXCL8; CXCR2; Polymorphism; Prostate Cancer

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos deste estudo.....	16
<b>Figura 2</b> – Vias de conexão entre a inflamação e o câncer.....	26
<b>Figura 3</b> – O papel das quimiocinas e seus receptores no ambiente tumoral .....	29
<b>Figura 4</b> – Vias de sinalização celular ativada pela IL-8 através dos receptores CXCR1 e CXCR2.....	30
<b>Figura 5</b> – O papel de sinalização da IL-8 no microambiente tumoral.....	31

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Classificação clínica do câncer de próstata.....	22
<b>Tabela 2</b> – Estratégias terapêuticas de acordo com estágio do câncer de próstata .....	24

## LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

<b>Table 1</b> – Allele and genotype distribution of the IL-8 and CXCR2 SNPs in healthy controls and PC patients.....	62
<b>Table 2</b> – Correlation between CXCR2 and IL-8 in healthy controls and PC patients.....	63
<b>Table 3</b> – The IL-8 -251 T/A and CXCR2 +1208 C/T genotype distributions in healthy controls and in patients with PC.....	63
<b>Table 4</b> – Analysis of the IL-8 -251 T/A polymorphism with clinicopathological parameters in PC patients.....	64
<b>Table 5</b> – Analysis of the CXCR2 +1208 C/T polymorphism with clinicopathological parameters in PC patients.....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ACS** – Sociedade Americana de Câncer (*American Cancer Society*)

**ADT** – Terapia de Privação de Andrógeno (*Androgen Deprivation Therapy*)

**AJCC** – Comitê Conjunto Americano sobre o Câncer (*American Joint Committee on Cancer*)

**AP-1** – Proteína Ativadora 1 (*Activator Protein 1*)

**AR** – Receptor de Andrógeno (*Androgen Receptor*)

**AUA** – Associação Americana de Urologia (*American Urological Association*)

**Bax** – Proteína pró-apoptótica de domínio BH3-only associada à Bcl-2 (*Bcl-2 associated protein X*)

**Bcl-2** – Proteína 2 de linfoma de células B (*B-cell lymphoma protein 2*)

**Bcl-xL** – Proteína antiapoptótica de linfoma de células B extra grande (*B-cell lymphoma-extra large*)

**CAG** – bases citocina-adenina-guanina

**CaP** – Câncer de Próstata (*Prostate Cancer; PC*)

**CAPES** – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

**CMV** – Citomegalovírus

**CNPq** – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

**COX-2** – Cicloxigenase 2

**CXCL** – Ligante de quimiocina CXC (*C-X-C chemokines Ligante*)

**CXCR1** – Receptor de quimiocina CXC tipo 1 (*C-X-C chemokines receptor type 1*)

**CXCR2** – Receptor de quimiocina CXC tipo 2 (*C-X-C chemokines receptor type 2*)

**dNTPs** – Desoxirribonucleotídeo Fosfatados (*Deoxynucleotide triphosphates*)

**DNA** – Ácido Desoxirribonucleico

**DST** – Doença Sexualmente Transmissível

**ELR** – Ácido glutâmico-leucina-arginina (*Glutamic acid-leucine-arginine; Glu-Leu-Arg*)

**EUA** – Estados Unidos da América

**FIPE** – Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos

**GPCR** – Receptor Acoplado à Proteína G (*G Protein-Coupled Receptor*)

**HCPA** – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**HIF 1 $\alpha$**  – Fator Induzível por Hipóxia 1 alfa (*Hypoxia-Inducible Factor 1 alfa*)

**HPB** – Hiperplasia Prostática Benigna

**HPV** – Papiloma Vírus Humano

**HSV** – Herpes Vírus Humano

**IC 95%** – Índice de Confiança a 95% (*95% Confidence Intervals*)

**IL-1 $\beta$**  – Interleucina 1 beta (*Interleukin 1 beta*)

**IL-6** – Interleucina 6 (*Interleukin 6*)

**IL-8** – Interleucina 8; CXCL-8 (*Interleukin 8*)

**IL-10** – Interleucina 10 (*Interleukin 10*)

**INCA** – Instituto Nacional do Câncer

**ISUP** – *International Society of Urological Pathology*

**MARS** – *Multivariate Adaptive Regression Splines*

**MMP-2** – Metaloproteinase da matriz 2

**MMP-9** – Metaloproteinase da matriz 9

**mRNA** – Ácido Ribonucleico mensageiro

**NCCN** – *National Comprehensive Cancer Network*

**NF- $\kappa$ B** – Fator Nuclear kappa de células B (*Nuclear Factor kappa B*)

**OR** – *Odds Ratio*

**PCR** – Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

**PSA** – Antígeno Prostático Específico (*Prostate Specific Antigen*)

**SD** – Desvio Padrão (*Standard Deviation*)

**SEER** – *Surveillance, Epidemiology, and Results Program*

**SG** – Sobrevida Global

**SLD** – Sobrevida Livre de Doença

**SNP** – Polimorfismo de Nucleotídeo Único (*Single Nucleotide Polymorphism*)

**SOAD** – Fundação Central Sul-Americana para o Desenvolvimento de Drogas Anticâncer

**SSP** – Sequência de Primers Específicos (*Sequence-Specific Primers*)

**STAT 3** – Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*)

**TNF- $\alpha$**  – Fator de Necrose Tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* )

**TNM** – Tumor-Linfonodo-Metástase (*Tumor-Lymph Node-Metastasis*)

**TR** – Toque retal

**USTR** – Ultrassonografia transretal

**UV** – Ultravioleta (Ultraviolet)

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES .....	16
2.2 CÂNCER DE PRÓSTATA.....	17
2.2.1 <i>INCIDÊNCIA</i> .....	17
2.2.2 <i>ETIOLOGIA</i> .....	17
2.2.3 <i>PATOLOGIA</i> .....	19
2.2.4 <i>CLÍNICA</i> .....	23
2.2.5 <i>TRATAMENTO</i> .....	24
2.3 INFLAMAÇÃO E CÂNCER.....	25
2.4 CITOCINAS .....	27
2.5 QUIMIOCINAS .....	28
2.5.1 <i>INTERLEUCINA 8 E SEUS RECEPTORES</i> .....	29
2.6 POLIMORFISMOS DOS GENES IL-8 E CXCR2.....	32
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>34</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
4.1 OBJETIVO PRIMÁRIO .....	35
4.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS .....	35
<b>5 REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>36</b>
<b>6 ARTIGO ORIGINAL</b> .....	<b>45</b>
<b>CXCR2 +1208 CT genotype may predict earlier clinical stage at diagnosis in patients with prostate cancer</b> .....	<b>45</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>65</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>66</b>
A – PROTOCOLO DE PESQUISA DE COLETA DE DADOS.....	66
B – TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO (CASOS).....	67
C – TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO (CONTROLES).....	68

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CaP) é o tumor maligno mais incidente entre os homens no Brasil, sem considerar os tumores de pele não-melanoma (1). Os fatores de risco bem estabelecidos para esta doença são a idade, etnia e história familiar de CaP (2). Além disso, a inflamação crônica tem sido diretamente associada com o risco de desenvolvimento do CaP (3).

A inflamação crônica pode levar a tumorigênese danificando o DNA através da liberação de radicais de oxigênio e nitrogênio, aumentando a proliferação celular e estimulando a angiogênese (4). A importância da inflamação no CaP é destacada pelo achado de que aproximadamente 20% dos pacientes com inflamação crônica na próstata desenvolveram CaP depois de 5 anos de seguimento, quando comparados com pacientes sem alterações de inflamação crônica (3).

No microambiente tumoral, a angiogênese é determinada pelo desequilíbrio entre o excesso e a falta de fatores angiogênicos (5). Neste contexto, a quimiocina CXC parece ter papel relevante na regulação da angiogênese (6). Vários estudos têm demonstrado que a interleucina-8 (IL-8; CXCL8), membro da família das quimiocinas CXC, e seus receptores, CXCR1 e CXCR2, são potentes reguladores angiogênicos (7–9). Destes dois receptores de alta afinidade para IL-8, a importância do CXCR2 em mediar a angiogênese demonstrou ser fundamental para neovascularização induzida pela IL-8 (7,10,11).

A IL-8 foi originalmente descrita como quimioatrativa de leucócitos (12,13) e, posteriormente, verificou-se possuir propriedades mitogênicas e angiogênicas (14). O aumento da expressão da IL-8 e dos seus receptores, tem sido bem caracterizado em células cancerosas, células endoteliais, infiltração de neutrófilos e macrófagos associados ao tumor, sugerindo que a IL-8 possa funcionar como um fator regulatório importante dentro do microambiente do tumor (15). Estudos recentes demonstraram que a superexpressão de IL-8 está associada com progressão da doença e metástase em vários tipos de tumores sólidos (16–24), incluindo CaP (25–



29). Pesquisa em modelo ortotópico *in vivo*, correlacionou a expressão da IL-8 em linhagens celulares de CaP com angiogênese, tumorigênese e metástases (27).

Os polimorfismos em genes de citocinas têm sido associados com aumento da inflamação e da produção de citocinas e, possivelmente, maior risco de câncer. Os polimorfismos genéticos são definidos como modificações na sequência de nucleotídeo, que estão presentes em pelo menos 1% da população (30). Os polimorfismos mais comuns são caracterizados pela alteração de apenas um nucleotídeo na sequência do DNA, e são denominados polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) (31,32). Considerando que o risco para o desenvolvimento de câncer parece ser influenciado pelos padrões dos SNPs que cada indivíduo possui, o estudo destes polimorfismos, em determinados genes alvo, pode ajudar a definir os grupos de risco para o desenvolvimento de câncer; assim como, identificar padrões de influência no prognóstico e na resposta aos tratamentos antineoplásicos (32).

O SNP na posição -251 da região promotora da IL-8 tem sido associado com aumento dos níveis plasmáticos (33) e com atividade promotora da IL-8 (19). Evidências demonstraram que o alelo A da IL-8 -251 está associado com alto nível de expressão desta proteína e com infiltração severa de neutrófilos (33). Além disso, este alelo está associado com aumento de risco e pior prognóstico de vários tumores sólidos (19,34–38). Já o polimorfismo +1208 C/T, que está localizado na região não-codificante do gene CXCR2, tem sido correlacionado com a patogênese e susceptibilidade de doenças crônicas inflamatórias (39) e tumores sólidos (38,40).

Portanto, o presente trabalho tem como objetivo estudar a associação dos polimorfismos IL-8 -251 T/A e CXCR2 +1208 C/T com a susceptibilidade e fatores prognósticos do CaP. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e contou com o apoio financeiro do FIPE (Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do HCPA).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES

Esta revisão da literatura está focada nos aspectos relacionados a associação dos polimorfismos dos genes da IL-8 e do CXCR2 e câncer de próstata. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: PubMed e Portal de Periódicos da CAPES, no período de 1960 a 2015. Foram realizadas buscas através dos termos “Cancer”, “Prostate cancer”, “IL-8”, “Polymorphism IL-8 -251 T/A”, “CXCR2”, “Polymorphism CXCR2 +1208 C/T” e suas combinações apresentadas na Figura 1.

**Figura 1 – Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos deste estudo.**

PALAVRAS-CHAVE	PUBMED		CAPES		
	Artigos	Id	Artigos	Id	
1- Cancer	3066653 artigos	1	1847046 artigos		
2- Prostate cancer	128109 artigos	2	297313 artigos		
3- IL-8	32336 artigos	3	24469 artigos		
4- Polymorphism IL-8 -251 T/A	43 artigos	4	69 artigos		→ 22 artigos
5- CXCR2	1578 artigos	5	1605 artigos		→ 50 artigos
6- Polymorphism CXCR2 +1208 C/T	7 artigos	6	13 artigos		→ 5 artigos
	4907 artigos	1+3	5687 artigos		→ 107 artigos
	21 artigos	1+4	28 artigos		→ 15 artigos
	383 artigos	1+5	539 artigos		→ 41 artigos
	2 artigos	1+6	15 artigos		→ 2 artigos
	224 artigos	2+3	386 artigos		→ 24 artigos
	2 artigos	2+4	3 artigos		→ 2 artigos
	27 artigos	2+5	89 artigos		→ 7 artigos
	0 artigos	2+6	4 artigos		→ 0 artigos

Legenda: Caixas em amarelo indicam os artigos que foram incluídos na revisão de acordo com os critérios de inclusão. Este é o resultado da busca da combinação das palavras-chave. Fonte: Elaborado pela autora (2015).

## 2.2 CÂNCER DE PRÓSTATA

### 2.2.1 INCIDÊNCIA

O CaP é o câncer mais comum em homens, excluindo os tumores de pele não melanoma, e a segunda causa de morte por câncer em homens no Brasil. A estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2014 foi de 68.800 casos novos de CaP no Brasil, aproximadamente 23% de todos os tumores malignos em homens. Esses valores correspondem a um risco estimado de 70,42 casos novos a cada 100 mil homens; com a maior incidência na região Sul, onde estima-se 91,24/100 mil. Para o Rio Grande do Sul, foram estimados 5.740 casos novos de CaP, sendo 910 casos diagnosticados em Porto Alegre; com taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes de 105,70 e 133,04, respectivamente (1).

A última estimativa mundial apontou o CaP como sendo o segundo tipo de câncer mais frequente em homens, cerca de 1,1 milhão de casos novos em 2012 e aproximadamente 70% dos casos diagnosticados em regiões mais desenvolvidas. As taxas de incidência são mais elevadas na Austrália/ Nova Zelândia, América do Norte e Europa Ocidental; seguida pelas regiões menos desenvolvidas, como o Caribe, África do Sul e América do Sul, mas permanecem baixas em populações Asiáticas (41). Nos Estados Unidos da América (EUA), a *American Cancer Society* (ACS) estima 200.800 casos novos de CaP para o ano de 2015, com aproximadamente 27.540 mortes por esta doença (42).

### 2.2.2 ETIOLOGIA

Os únicos fatores de risco bem estabelecidos são o aumento da idade, etnia e história familiar de CaP (2). Baseado em dados do SEER (*Surveillance, Epidemiology, and Results Program*) de 2010 a 2012, a idade mediana de diagnóstico do CaP é 66 anos, ou seja, é uma doença que afeta predominantemente homens mais velhos. A probabilidade de desenvolver este câncer antes dos 49 anos é de 0,3%, aos 70 anos ou mais é de 10,9% e no decorrer de toda a vida é de

aproximadamente 15% (42). A mortalidade pelo CaP é maior entre homens com idades entre 75-84, com idade mediana de 80 anos (43).

O risco de CaP é maior em homem negros que em homens brancos (44). Nos EUA, os homens negros têm risco 1,6 vezes maior de desenvolver o tumor prostático e uma mortalidade pela doença 2,4 vezes maior quando comparados com homens brancos (42). Estudos recentes sugerem que uma série de mutações genéticas em homens negros predispõe estes indivíduos ao CaP; a etnia, associada a fatores ambientais, como dieta e migração, são considerados fatores determinantes no desenvolvimento desta doença (44). Além disso, diferenças étnicas associadas ao risco de CaP têm sido atribuídas a variabilidade polimórfica da repetição CAG no gene do receptor de andrógeno (AR) (45).

A história familiar positiva é outro fator de risco importante para o CaP. Estudos caso-controle mostraram que indivíduos com antecedentes familiares de neoplasia prostática têm maior probabilidade de desenvolver a doença. Os riscos aumentam 2,2 vezes quando um parente de primeiro grau (pai ou irmão) é afetado pela doença, 4,9 vezes quando dois parentes de primeiro grau são portadores do tumor e 10,9 vezes quando três parentes têm a doença (46).

Outros fatores de risco têm sido investigados na etiologia do CaP, incluindo hormônios, fatores dietéticos, obesidade, inatividade física, ocupação, tabagismo, fatores sexuais e susceptibilidade genética (2). Estudos em gêmeos relataram que até 42% do risco de CaP pode ser explicado por fatores hereditários (47). Embora genes de alta penetrância possam explicar apenas uma pequena porcentagem dos casos, polimorfismos genéticos comuns podem desempenhar um papel importante entre os casos esporádicos (48). Polimorfismos envolvendo genes que codificam o receptor de andrógeno, a 5 $\alpha$ -redutase tipo II e o receptor da vitamina D têm sido associados com um risco variável da doença (49–52).

A dieta também tem sido considerada um fator importante na etiologia do CaP. Dietas com base em gordura animal, carne vermelha, embutidos e cálcio têm sido associadas ao aumento no risco de desenvolver esta doença. Além disso, a obesidade também é apontada no aumento do risco de desenvolver essa neoplasia, em especial para aquelas de comportamento mais agressivo. Em contrapartida, é

possível que dietas ricas em vegetais, vitaminas D e E, licopeno e ômega-3 sejam capazes de conferir algum efeito protetor contra este câncer (1).

O papel da inflamação crônica na etiologia do CaP também têm sido proposto (3,53,54). A fonte de inflamação intra-prostática é frequentemente desconhecida, mas pode ser causada por infecção (agentes sexualmente transmissíveis), lesão celular (devido a exposição a trauma químico ou físico causado por refluxo de urina e formação de cálculos na próstata), variações e/ou exposição hormonal ou fatores alimentares (55). Uma meta-análise revisou estudos de prostatite e CaP e reportou um risco relativo global de 1,6 (56). Vários estudos epidemiológicos têm sido realizados para explorar possíveis associações entre as doenças sexualmente transmissíveis (DST) e o CaP. Infecções como citomegalovírus (CMV), papiloma vírus humano (HPV) e herpes vírus humano (HSV) podem ser fatores de risco mais importantes para CaP, do que a sífilis e a gonorreia (54).

### 2.2.3 PATOLOGIA

As neoplasias da próstata são representadas pelos adenocarcinomas em cerca de 98% das vezes e o restante compreende casos de sarcomas, carcinoma epidermoide e carcinoma de células transicionais. Os adenocarcinomas se localizam na zona periférica da glândula em cerca de 75% dos casos, na zona transicional em aproximadamente 25% e na zona central em menos de 5% dos pacientes (57).

Há também variantes de adenocarcinoma mais raras, com diferenciação neuroendócrina, ou de padrão de pequenas células, com características distintas; entre as quais, uma maior predileção pelo envolvimento linfonodal, menores elevações de PSA, hormônio resistência e maior agressividade clínica (58).

Nos pacientes com adenocarcinomas da próstata, a diferenciação glandular constitui um importante fator prognóstico, relacionando-se com o comportamento biológico do tumor e a sobrevida do paciente. O sistema de graduação histológico mais utilizado é o proposto por Gleason em 1966, que descreve as características biológicas do tumor no que concerne ao grau de diferenciação (59). O escore de Gleason é dado pela soma dos graus do padrão primário (predominante) e do

padrão secundário (segunda maior área representada), numa variação de 2 a 10, com o escore 2 (1+1) correspondendo as neoplasias mais diferenciadas e o escore 10 (5+5) as neoplasias mais anaplásicas (60,61).

O sistema de graduação de Gleason é um importante preditor de prognóstico do CaP. De acordo com Stark, um terço dos homens que apresentaram Gleason 9 a 10, no tumor extraído por prostatectomia, morreram provavelmente devido a micrometástases ao diagnóstico; e pacientes com Gleason 4+3, tiveram uma taxa de mortalidade três vezes maior quando comparado aos tumores Gleason 3+4 (62). Pacientes com escore de Gleason  $\geq 7$  têm sido associado a maior risco de doença extra-prostática e recorrência bioquímica (63).

Em 2005, a ISUP (*International Society of Urological Pathology*) revisou o sistema de graduação, utilizando a imunoistoquímica, e concluiu que a maioria dos graus 1 e 2 se tratavam de hiperplasia adenomatosa atípica. Estes padrões foram considerados alterações precoces, que não correspondiam necessariamente ao câncer, e foram retirados da classificação. Dessa forma, o grau passou a variar de 6 (3+3) até 10 (5+5) (64). Na última conferência da ISUP, realizada em 2014, foi proposto um novo sistema de classificação do CaP, que é baseado no tradicional grau de Gleason, porém varia de 1 a 5, sendo 1 a forma mais indolente e 5 a forma mais agressiva de câncer (65).

A maioria dos tumores prostáticos é assintomática, desenvolvendo-se de forma lenta e silenciosa. Estima-se que, antes do advento do teste do antígeno prostático específico (PSA), apenas 25% dos tumores eram detectados clinicamente (66). O rastreamento generalizado utilizando o teste de PSA começou em 1991, após a publicação de um estudo demonstrando que as elevações de PSA em homens assintomáticos estavam associadas a um risco maior de CaP (67). Apesar da abundância de dados que se acumulam sobre o impacto da triagem do CaP na morbidade e mortalidade, a evidência do benefício com rastreamento, permanece conflituosa (68). Estima-se que 23% a 42% dos tumores de próstata detectados na triagem representem excesso de diagnóstico, e esta taxa pode ser superior a 50% em homens com 75 anos ou mais (69).

Os principais métodos utilizados para diagnosticar o CaP incluem o toque retal (TR), que pode identificar anormalidades na textura, consistência e tamanho da próstata, e a dosagem dos níveis do PSA, que é uma serina protease regulada por andrógeno produzida pelas células epiteliais prostáticas. Nos pacientes que apresentarem áreas de maior consistência na glândula e/ou alteração dos níveis séricos de PSA, está indicada a biópsia da próstata guiada por ultrassonografia transretal (USTR) (57).

O PSA é considerado o marcador sérico mais comumente utilizado para o CaP (70), mas pode estar alterado em outras afecções como hipertrofia benigna da próstata, prostatite, infecções do trato urinário, trauma ou ejaculação recente (71,72). Além disso, o CaP pode estar presente na ausência completa de elevação do PSA (73). O protocolo Americano para detecção precoce do CaP considera o nível de PSA tradicional de 4.0ng/mL um limiar razoável para uma avaliação mais aprofundada (68).

A Sociedade Americana de Urologia (AUA) recomenda a triagem com PSA para homens de 55 a 69 anos. O painel não recomenda a triagem de rotina do PSA em homens com idade superior a 70 anos ou em homens com expectativa de vida inferior a 10 a 15 anos (74). Entretanto, existem controvérsias quanto a idade ideal para começar a triagem para CaP. Evidências observacionais sugerem que o teste de PSA basal, em homens na faixa dos 40 anos e início dos 50 anos, pode ter valor para estratificação de risco no futuro. Embora muitos defendam testar precocemente somente homens de alto risco, devido a história familiar ou etnia, o PSA sérico basal pode ser um forte preditor de risco do CaP no futuro, em comparação a qualquer um destes fatores de risco (75).

As diretrizes da NCCN para detecção precoce do CaP sugerem que os testes devem começar na idade de 45 anos. O painel recomenda repetir o teste a cada 2 a 4 anos, para homens com idade de 45 a 75 anos, se o PSA for <1.0ng/mL, e a cada 1 a 2 anos, se o PSA for ≥1.0ng/mL. O painel concorda que o teste do PSA só deve ser oferecido aos homens com uma expectativa de vida de 10 anos ou mais. No entanto, os participantes não concordam quanto ao momento de descontinuar os testes de rotina em homens assintomáticos mais velhos (75).

Após a confirmação da presença de adenocarcinoma de próstata, através do resultado anatomopatológico da biópsia prostática, é necessário definir se a doença é localizada ou sistêmica. Para isso, utiliza-se o sistema de estadiamento (classificação TNM), desenvolvido pelo *The American Joint Committee on Cancer* (76). Neste sistema o “T” se refere ao tamanho do tumor primário, “N” a extensão do envolvimento do nódulo linfático e “M” a presença ou ausência de metástases.

**Tabela 1 – Classificação clínica do câncer de próstata**

---

T - Tumor primário

TX O tumor primário não pode ser avaliado

T0 Não há evidência de tumor primário

T1 Tumor clinicamente inaparente, não palpável nem visível por meio de exame de imagem

T1a Achado histológico incidental: tumor em 5% ou menos do tecido ressecado

T1b Achado histológico incidental: tumor em mais de 5% do tecido ressecado

T1c Tumor identificado por biópsia por agulha (por exemplo, devido a PSA elevado)

T2 Tumor confinado à próstata<sup>1</sup>

T2a Tumor que envolve uma metade de um dos lobos ou menos

T2b Tumor que envolve mais da metade de um dos lobos, mas não ambos os lobos

T2c Tumor que envolve ambos os lobos

T3 Tumor que se estende através da cápsula prostática<sup>2</sup>

T3a Extensão extracapsular (uni ou bilateral), incluindo envolvimento microscópico do colo vesical

T3b Tumor que invade vesícula(s) seminal(ais)

T4 Tumor que está fixo ou que invade outras estruturas adjacentes, que não as vesículas seminais: esfíncter externo, reto, músculos elevadores do ânus, e/ou parede pélvica

N - Linfonodos regionais

NX Os linfonodos regionais não podem ser avaliados

N0 Ausência de metástase em linfonodo regional

N1 Metástase em linfonodo regional

M - Metástase a distância\*

M0 Ausência de metástase a distância

M1 Metástase a distância

M1a Linfonodo(s) não regional(ais)

M1b Osso(s)

M1c Outra(s) localização(ões)

---

**Notas:** <sup>1</sup>Tumor encontrado em um ou em ambos os lobos, por biópsia por agulha, mas não palpável nem visível por exame de imagem, é classificado como T1c.

<sup>2</sup>A invasão do ápice prostático ou da cápsula prostática (mas não além desta) é classificada como T2 e não como T3

\*Usa-se a categoria mais avançada quando existe metástase em mais de uma localização. A categoria mais avançada é pM1c.



Dados recentes do SEER apontam que, no momento do diagnóstico, 80% dos pacientes apresentam o tumor confinado à glândula, 12% têm comprometimento de linfonodos regionais, 4% é metastático e em 4% dos casos a extensão da doença é desconhecida (43).

#### 2.2.4 CLÍNICA

Nos pacientes com tumor circunscrito à próstata, a doença é assintomática. Por outro lado, mais de 90% dos pacientes com CaP localmente avançado apresenta-se com manifestações de obstrução infravesical e evidência de hematúria macroscópica, em geral relacionada com infiltração do trígono vesical pelo tumor. O aparecimento súbito de obstrução infravesical em um paciente com padrão miccional recente satisfatório é manifestação comum em CaP. Em casos de hiperplasia benigna, os sintomas obstrutivos tendem a evoluir de forma mais lenta. De forma incomum, pacientes com esta neoplasia podem apresentar dores ósseas, uremia, anemia, perda de peso, adenopatia cervical ou inguinal, linfedema, trombose venosa de membros inferiores ou hemospermia, como manifestação da doença (57).

Se o tumor for localizado há necessidade de definir o grupo de risco do paciente como guia de prognóstico e tratamento. Foi publicada em 1998 a seguinte classificação, recomendada até os dias atuais: baixo risco, T1-T2a e escore de Gleason  $\leq 6$  e PSA  $\leq 10$ ; risco intermediário, T2b e/ou escore de Gleason 7 e/ou PSA 10-20; e alto risco,  $\geq T2c$  ou escore de Gleason 8-10 ou PSA  $>20$  (63).

O desafio do diagnóstico consiste em identificar precocemente o paciente cujo tumor tem maior potencial de agressividade, possibilitando uma escolha terapêutica mais adequada, com baixa taxa de morbidade e melhor qualidade de vida para o paciente. Existe uma variedade de parâmetros clinicopatológicos, como o estágio do tumor, escore de Gleason e a cinética do PSA, que têm sido utilizados na prática clínica para ajudar a prever quais pacientes têm mau prognóstico para progressão da doença e mortalidade (77–79). Entretanto, a capacidade de prognóstico dos parâmetros clínicos ainda é limitada, mas pode ser melhorada pela incorporação de outros fatores, incluindo marcadores genéticos (80).

### 2.2.5 TRATAMENTO

A estratégia de tratamento dos casos de CaP deve levar em conta as perspectivas de vida do paciente. A orientação conservadora (vigilância clínica ou tratamento hormonal) está justificada nos casos com perspectiva de vida menor que 10 anos, quer seja pela idade avançada do paciente ou pela existência de doenças complexas associadas. Quando as condições gerais e a idade prenunciam chances razoáveis de sobrevivência de mais de 10 anos, o tratamento curativo radical deve ser adotado (57).

**Tabela 2 – Estratégias terapêuticas de acordo com estágio do CaP**

Doença localizada	
Baixo risco	Vigilância ativa Braquiterapia Prostatectomia radical Radioterapia radical
Risco Intermediário	Vigilância ativa Braquiterapia Prostatectomia radical Radioterapia radical ± ADT neoadjuvante
Alto risco	ADT neoadjuvante + radioterapia radical + ADT adjuvante Prostatectomia radical + linfadenectomia pélvica
Doença localmente avançada	
	ADT neoadjuvante + radioterapia radical + ADT adjuvante Prostatectomia radical + linfadenectomia pélvica
Doença metastática	
Sem terapia hormonal prévia	ADT
Resistente à castração (primeira linha)	Abiraterona Docetaxel Enzalutamida Rádio-223 Sipuleucel-T
Segunda linha (pós-docetaxel)	Abiraterona Cabazitaxel Enzalutamida Rádio-223

Nota: Opções citadas em ordem alfabética  
ADT, terapia de privação de andrógenos

Fonte: Adaptado de *Cancer of the prostate: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*, 2015 (81).

### 2.3 INFLAMAÇÃO E CÂNCER

As células cancerosas são reconhecidas como um potente agente agressor gerando entre tantas respostas: a inflamação. Sinteticamente, a inflamação pode ser dita como uma reação dos tecidos vascularizados frente a um agente agressor, cuja finalidade é a reparação da estrutura e funções e, conseqüentemente, manutenção da homeostasia tecidual. O processo inflamatório tem como evento central a migração celular, e como agente principal os leucócitos, em especial os neutrófilos, que são as principais células recrutadas para o sítio inflamatório e possuem um importante papel na vigilância e destruição de células neoplásicas (82,83).

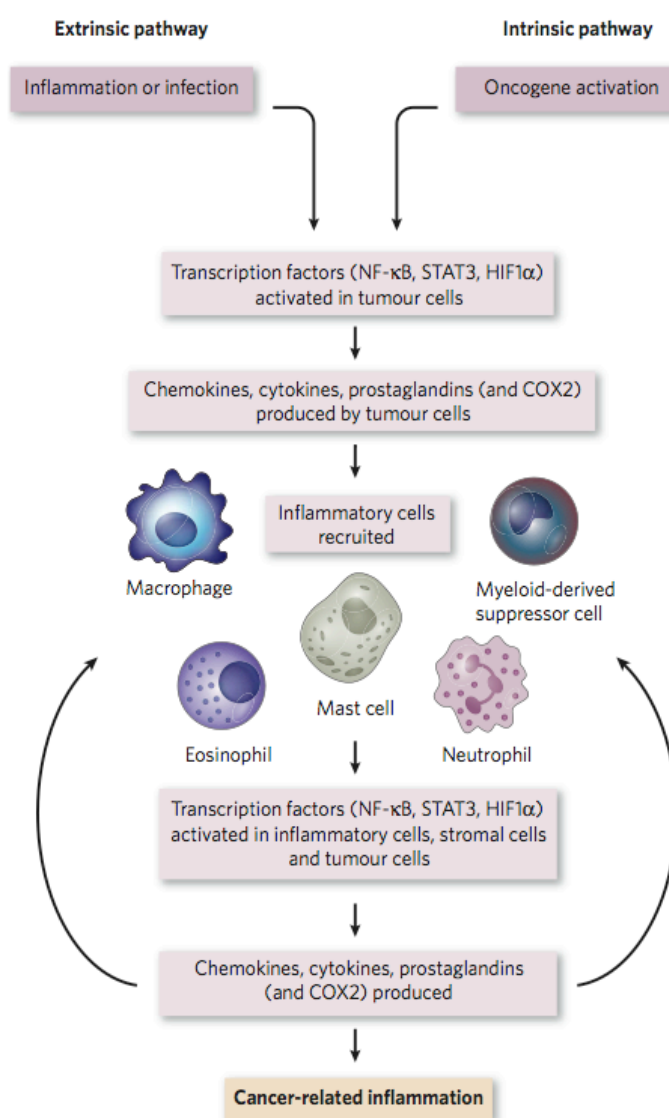
Estudos epidemiológicos demonstraram que a inflamação crônica predispõe os indivíduos a vários tipos de câncer. Estima-se que infecções e respostas inflamatórias subjacentes estão ligadas a 15-20% de todas as mortes por câncer em todo o mundo (84). Existem muitos fatores desencadeadores de inflamação crônica que aumentam o risco de desenvolver câncer; como, por exemplo, infecções microbianas (infecção por *Helicobacter pylori* está associada com câncer gástrico e linfoma gástrico de tecido linfoide associado à mucosa), doenças autoimunes (doença inflamatória intestinal está associada com câncer de cólon), e condições inflamatórias de origem desconhecida (prostatite está associada com CaP) (85).

Para Mantovani e colaboradores, a conexão entre a inflamação e o câncer pode ser desencadeada através de duas vias: a intrínseca e a extrínseca. A via intrínseca é ativada por eventos genéticos que causam a neoplasia. Estes eventos incluem a ativação de vários tipos de oncogenes através de mutação, rearranjo e amplificação cromossômica, e inativação de genes supressores de tumor. As células que sofrem esta transformação produzem mediadores inflamatórios que vão gerar um microambiente inflamatório em tumores, onde não existia qualquer condição inflamatória subjacente (tumores da mama). Por outro lado, na via extrínseca, condições inflamatórias ou infecciosas aumentam o risco de desenvolvimento de câncer em determinados locais anatômicos (cólon, próstata e pâncreas) (85).

As duas vias convergem, resultando na ativação de fatores de transcrição, principalmente do fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3) e fator induzível por hipóxia 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) em células tumorais.

Estes fatores de transcrição coordenam a produção de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e quimiocinas; bem como, a produção de cicloxigenase 2 (COX-2), que por sua vez, resulta na produção de prostaglandinas. Estes fatores recrutam e ativam vários leucócitos, principalmente as células da linhagem mielomonocítica. Posteriormente, as citocinas ativam os mesmos fatores de transcrição em células inflamatórias, estromais e tumorais, resultando na produção de mais mediadores inflamatórios e num microambiente inflamatório favorável ao câncer (figura 2) (85).

**Figura 2 – Vias de conexão entre a inflamação e o câncer**



Legenda: NF-κB, fator nuclear kappa B; STAT3, transdutor de sinal e ativador da transcrição 3; HIF1α, fator induzível por hipóxia 1α; COX2, cicloxigenase 2. Fonte: Adaptado de Mantovani et al. (2008, p.437).

## 2.4 CITOCINAS

O desenvolvimento de uma resposta imune efetiva envolve, além das células inflamatórias, as células linfoides e as hematopoéticas. As interações entre estas células são complexas e mediadas por um grupo de proteínas coletivamente designadas citocinas (86).

As citocinas são proteínas secretadas pelas células da imunidade natural e adquirida, que medeiam muitas das funções dessas células, e são produzidas em resposta a microrganismos e outros antígenos. Na fase de ativação das respostas imunes adquiridas, as citocinas estimulam o crescimento e a diferenciação de linfócitos e, nas fases efetoras da imune natural e adquirida, elas ativam diferentes células efetoras para eliminar microrganismos e outros antígenos. As citocinas também estimulam o desenvolvimento de células hematopoéticas. A nomenclatura das citocinas é frequentemente baseada em suas fontes celulares. Como muitas citocinas são sintetizadas por leucócitos (por exemplo, macrófagos ou células T) e atuam em outros leucócitos, elas também são chamadas de interleucinas (87).

As citocinas frequentemente influenciam a síntese e as ações de outras citocinas. As ações das citocinas podem ser locais e sistêmicas. As citocinas iniciam suas ações pela ligação a receptores de membrana específicos nas células-alvo. Sinais externos regulam a expressão de receptores de citocinas e, portanto, o potencial de resposta das células às citocinas. Dessa forma, as respostas celulares para maioria das citocinas consistem em alterações na expressão gênica em células-alvo, resultando na expressão de novas funções e, algumas vezes, na proliferação das próprias células-alvo (87).

Todos os receptores de citocina consistem em uma ou mais proteínas transmembrana, cujas porções extracelulares são responsáveis pela ligação da citocina, e as porções citoplasmáticas são responsáveis por dar início às vias de sinalização intracelular. Essas vias de sinalização são ativadas pelo agrupamento receptor induzido do ligante, unindo as porções citoplasmáticas de duas ou mais moléculas de receptor, em um processo análogo à sinalização por antígenos para receptores de células T e B (87).

As citocinas são divididas em quatro grupos, entre eles as quimiocinas, que são um grupo de citocinas que afetam a quimiotaxia e o comportamento dos leucócitos, desempenhando um papel fundamental na resposta inflamatória (86).

## 2.5 QUIMIOCINAS

As quimiocinas estão quase todas subdivididas em dois grupos: subgrupo CC, cujas cisteínas conservadas são contíguas; e o subgrupo CXC, cujas cisteínas conservadas são separadas por algum outro aminoácido (X) (86). Os receptores de quimiocinas pertencem à superfamília da rodopsina que são acoplados a proteína G e que tem sua estrutura composta por sete domínios transmembrana  $\alpha$ -helicoidais (88). Devido aos receptores de quimiocinas serem específicos a uma subclasse de quimiocinas, o sistema de nomenclatura dos receptores utiliza o termo CXC e acrescenta a letra “R” (receptor), seguido do número (89,90).

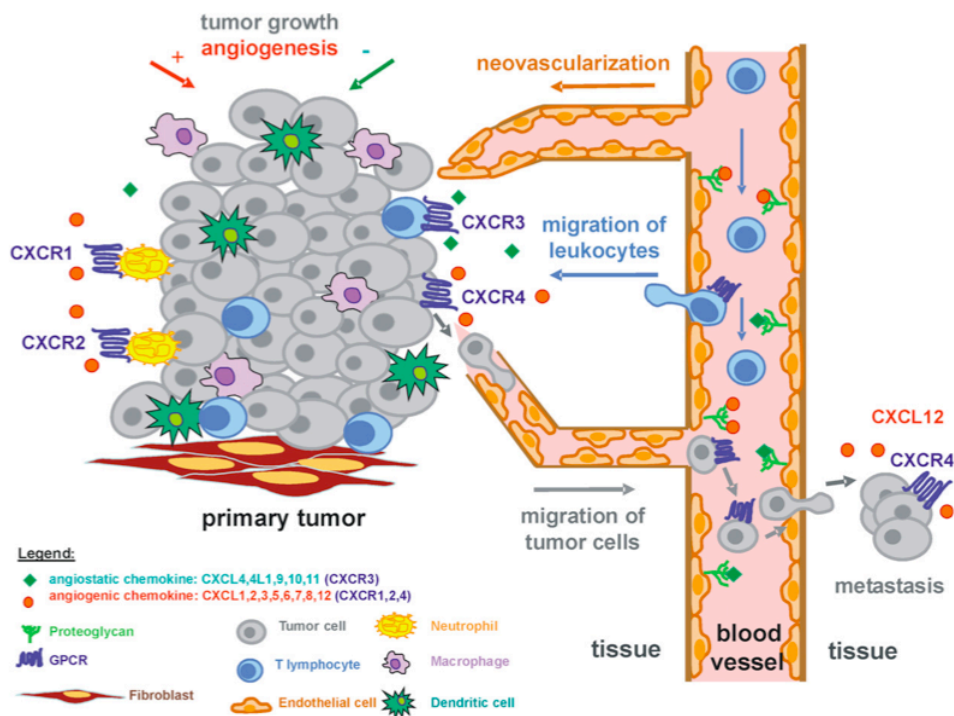
Sendo assim, a família CXC das quimiocinas é um grupo de citocinas quimiotáticas, definidas por quatro resíduos de aminoácido cisteína altamente conservados, com as duas primeiras cisteínas separadas por um resíduo de aminoácido não-conservado. O terminal amina das quimiocinas CXC determina a sua especificidade para a ligação aos seus receptores cognatos. Por exemplo, as quimiocinas CXC que contém a sequência ácido glutâmico-leucina-arginina (Glu-Leu-Arg) (“ELR” *motif*, ELR<sup>+</sup>) no terminal amina da molécula são potentes promotores da angiogênese (6,91,92).

A IL-8, membro da família das quimiocinas CXC (93), possui a sequência de aminoácidos Glu-Leu-Arg (ELR<sup>+</sup>), e tem mostrado exercer efeitos angiogênicos direto nas células endoteliais *in vitro* e *in vivo* (94–96). O CXCR1 e o CXCR2 são receptores expressos sobre os neutrófilos, ambos têm 77% da sequência de aminoácidos em comum, e ligam-se a IL-8 com similar afinidade (97).

A capacidade da IL-8 para induzir a angiogênese, depende da expressão dos seus receptores CXCR1 e CXCR2 nas células endoteliais (98). Considerando que, o CXCR2 se liga a todas as quimiocinas CXC ELR<sup>+</sup> que induzem a angiogênese, incluindo a IL-8, podemos dizer que o CXCR2 é um mediador dos efeitos pró-

angiogênicos da IL-8. Vários relatos confirmam a importância do CXCR2 na mediação dos efeitos da angiogênese em células endoteliais microvasculares humanas (7,11,98).

**Figura 3 – O papel das quimiocinas e seus receptores no ambiente tumoral**



Legenda: CXCL, ligante de quimiocina CXC; GPCR, receptor acoplado à proteína G.  
Fonte: Adaptado de Vandercappellen et al. (2008, p.229)(99).

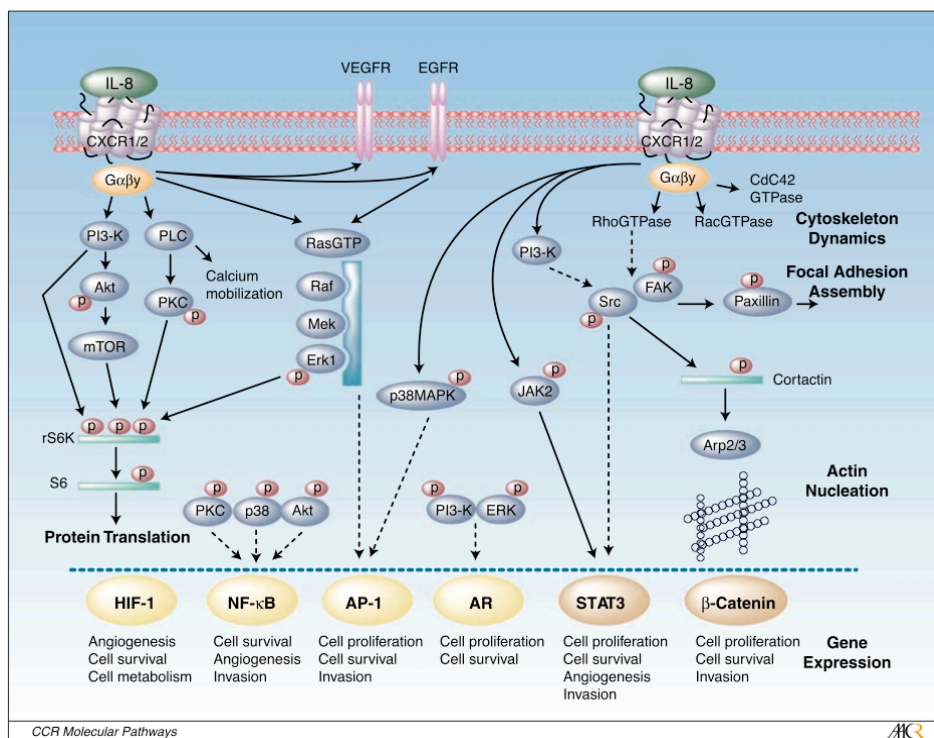
### 2.5.1 INTERLEUCINA 8 E SEUS RECEPTORES

A IL-8 é uma proteína de 8.400 Dalton produzida por monócitos, macrófagos, células endoteliais, fibroblastos, queratinócitos e vários tipos de células tumorais (100). A expressão desta quimiocina é regulada por estímulos diferentes, tais como sinais inflamatórios (por exemplo, fator de necrose tumoral  $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), estresse químico e ambiental (hipóxia e exposição a agentes citotóxicos) e hormônios esteroides (andrógenos, estrógenos e dexametasona) (15,101,102).

A síntese e secreção aumentada da IL-8 pelas células tumorais representa um grande impacto no microambiente tumoral, já que os receptores CXCR1 e CXCR2 também são expressos nas células endoteliais, neutrófilos e macrófagos associados ao tumor. Depois de ativados, estes receptores transmitem potentes

sinais reguladores capazes de promover a tradução de proteínas e regular a atividade de uma variedade de fatores de transcrição (Figura 4) (15).

**Figura 4 – Vias de sinalização celular ativada pela IL-8 através dos receptores CXCR1 e CXCR2**



Legenda: HIF-1, Fator induzível por hipóxia-1; NF-κB, Fator nuclear kappa B; AP-1, Proteína ativadora-1; AR, Receptor de andrógeno; STAT3, Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3.

Fonte: Adaptado de Waugh and Wilson (2008, p.6736).

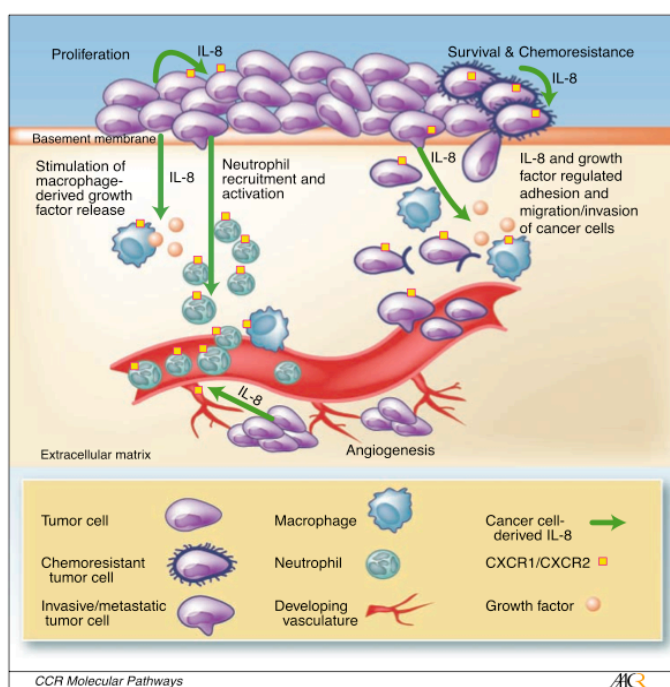
Recentemente, foi demonstrado que a sinalização da IL-8 aumenta a transcrição do receptor de andrógeno em linhagens celulares de CaP, sugerindo que esta quimiocina tem um papel importante na modulação da transição deste câncer para um estado andrógeno-independente (103). Neste contexto, o STAT3 e a β-catenina são considerados significativos tanto do ponto de vista de sua atividade de transcrição independentes, como também, pela sua capacidade de agir como co-ativadores do receptor de andrógeno (104). Como consequência da ativação destes fatores de transcrição, cada um independentemente associado com a progressão do câncer, a sinalização da IL-8 pode induzir a transcrição de vários genes envolvidos na angiogênese, regulação do ciclo celular, migração e invasão, e evasão da apoptose (15).



Os efeitos pro-angiogênicos da IL-8 derivam da sua capacidade de inibir a apoptose de células endoteliais. Esta inibição está associada com o aumento dos níveis de fatores anti-apoptóticos de Bcl-2 (*B-cell lymphoma protein 2*) e Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra large*), bem como, com a diminuição dos níveis pró-apoptóticos de Bax (*Bcl-2 associated protein X*). Além disso, a IL-8 estimula o aumento da expressão de mRNA (ácido ribonucleico mensageiro) das células endoteliais e das metaloproteinase da matriz MMP-2 e MMP-9, sugerindo que esta interleucina esteja envolvida na degradação da matriz extracelular, conduzindo a migração de células endoteliais, invasão e organização do tubo capilar (8).

A IL-8 derivada do tumor tem a capacidade de exercer um grande impacto no microambiente tumoral, já que o aumento da secreção desta interleucina pelas células tumorais aumenta a sua capacidade de proliferação e sobrevivência através de vias de sinalização autocrina (15,105). Além disso, a IL-8 ativa as células endoteliais da vasculatura tumoral, promovendo a angiogênese, e induz a infiltração quimiotática de neutrófilos para o local do tumor, estimulando a secreção de fatores de crescimento adicionais pelos macrófagos associados ao tumor, aumentando a capacidade proliferativa e invasiva das células tumorais (Figura 5) (8,15,95,105,106).

**Figura 5 – O papel de sinalização da IL-8 no microambiente tumoral**



Fonte: Adaptado de Waugh and Wilson (2008, p.6737).

## 2.6 POLIMORFISMOS DOS GENES IL-8 E CXCR2

O gene da IL-8 está localizado no braço longo do cromossomo 4 e consiste de quatro exons, três introns e uma região promotora proximal (107). A transcrição deste gene codifica uma proteína de 99 aminoácidos, que depois é processada de modo a dar origem a uma proteína competente de 77 aminoácidos nas células não imunológicas ou de 72 aminoácidos nos monócitos e macrófagos (15).

Vários polimorfismos foram relatados no gene da IL-8 (108). Entre estes, foi identificado no ano de 2000, o SNP na posição nucleotídica -251 da região promotora da IL-8, relativo ao local de início da transcrição deste gene (33). Evidências demonstraram que o polimorfismo -251 T/A está associado com a produção da IL-8 ou expressão desta proteína (19,33,36). Dados revelaram que o alelo A da IL-8 -251 está associado a um elevado nível de expressão de IL-8 e uma infiltração severa de neutrófilos (33); além disso, está associado a um aumento de risco e pior prognóstico para câncer de próstata, cólon, gástrico, nasofaringe e mama (34–38,40). Os resultados destes estudos mostraram que o aumento desta proteína tem um impacto no desenvolvimento e progressão do câncer via regulação da resposta imune e angiogênese do tumor.

Recentemente, um estudo caso-controle demonstrou que o genótipo TT da IL-8 -251 (baixo produtor de IL-8) (33), estava significativamente diminuído nos pacientes com CaP quando comparado aos controles, e o genótipo AA (alto produtor) estava correlacionado com aumento do log do nível de PSA mensurado antes da remoção do tumor (35). Entretanto, outros estudos que investigaram a correlação entre o polimorfismo -251 T/A da IL-8 e o CaP, não encontraram associação significativa com a susceptibilidade e prognóstico do CaP (109,110).

Resultados da meta-análise, realizada em 2012, mostraram que os pacientes portadores do alelo A -251 tiveram de 12 a 21% aumento do risco de câncer. Os portadores deste alelo apresentaram risco elevado para câncer de mama, gástrico e nasofaríngeo; risco reduzido para CaP e ausência de predisposição para câncer coloretal e de pulmão. Estes achados reforçam as evidências crescentes que o alelo A na região promotora da IL-8 está emergindo como alelo de baixa penetrância que influencia na susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer (111).

Entretanto, a frequência do alelo A varia em diferentes áreas geográficas e populações étnicas. Além disso, os efeitos genéticos deste polimorfismo pode variar de um câncer para outro e até, no mesmo tipo de tumor (111). Os polimorfismos em genes de citocinas são diferentemente distribuídos entre africanos e caucasianos, e interagem de forma diferente em ambos os grupos étnicos para modificar o risco desta doença. Isso pode ser devido à frequência de polimorfismos em cada população ou a presença de outros fatores (SNPs e fatores de transcrição) que possam modular a interação dos diferentes marcadores genéticos na população e, subsequentemente, modificar o risco de desenvolver o câncer (112).

Em relação ao gene CXCR2 (localizado no 2q35), alguns polimorfismos têm sido bastante investigados em estudos de associação com doenças (86). Entre eles, os três mais investigados são: o polimorfismo +785 C/T localizado no exon 3 (mas que não altera a sequência de aminoácidos da proteína), e os polimorfismos +1208 C/T e +1440 G/A que estão localizados na região 3' não traduzida do mesmo exon (39). Polimorfismos nesta região têm a capacidade de alterar o processamento de RNAm, sua estabilidade e tradução (86).

Diversos estudos indicam que o polimorfismo +1208 C/T pode fornecer informações valiosas sobre a patogênese e susceptibilidade da doença inflamatória crônica (39,113). Recentemente, alguns pesquisadores têm estudado a correlação entre os polimorfismos do gene CXCR2 e tumores sólidos, confirmando esta associação no câncer de mama e pâncreas (40,114), mas não no CaP (110). O genótipo TT do CXCR2 +1208 foi identificado como sendo de alto risco para câncer de mama. Os pacientes portadores do alelo T mostraram uma associação significativa com fenótipo de agressividade desta doença (definido pelo tamanho do tumor, grau histológico alto e presença de linfonodo ou metástase) e também uma associação com diminuição da sobrevida global (SG) e sobrevida livre de doença (SLD) (40).

Sendo assim, desde que a expressão da IL-8 e seu receptor CXCR2 tem sido correlacionada com aumento da angiogênese e tumorigênese, estes genes têm sido considerados alvos atrativos para o desenvolvimento de novas terapias (27).

### 3 JUSTIFICATIVA

As quimiocinas e seus respectivos genes receptores, em especial o CXCR2, estão sendo associadas a patogênese de várias doenças, incluindo alguns tipos de câncer. O estudo de polimorfismos relacionados aos genes da inflamação e angiogênese pode nos auxiliar na compreensão do desenvolvimento e progressão de tumores sólidos e também na identificação de grupos de risco de pacientes com melhor ou pior prognóstico.

O papel dos genes IL-8 e CXCR2 na regulação da resposta imune tumoral e angiogênese tem sido demonstrado em estudos recentes, porém com resultados contraditórios. Sendo assim, a finalidade desta pesquisa é elucidar a associação entre os polimorfismos IL-8 -251 T/A e CXCR2 +1208 C/T e o CaP, até então não relatados na literatura.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Investigar os polimorfismos dos genes IL-8 -251 T/A e CXCR2 +1208 C/T em um grupo de pacientes com CaP e comparar com um grupo controle de indivíduos saudáveis.

### 4.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Avaliar a frequência dos polimorfismos dos genes IL-8 -251 T/A e CXCR2 +1208 C/T, através do método PCR-SSP, em pacientes com CaP e grupo controle;
- Avaliar a frequência dos polimorfismos dos genes IL-8 -251 T/A e CXCR2 +1208 C/T nos pacientes com CaP e correlacionar com fatores prognósticos conhecidos, tais como nível de PSA pré-tratamento, escore de Gleason, estadiamento clínico e presença de metástase ao diagnóstico.

## 5 REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2014 - Incidência de câncer no Brasil [Internet]. Rio de Janeiro: INCA; 2014. [citado 2015 Mar 11]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>.
2. Hsing AW, Chokkalingam AP. Prostate cancer epidemiology. *Front Biosci*. 2006;11:1388–413.
3. MacLennan GT, Eisenberg R, Fleshman RL, Taylor JM, Fu P, Resnick MI, et al. The influence of chronic inflammation in prostatic carcinogenesis: a 5-year followup study. *J Urol*. 2006;176(3):1012–6.
4. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860–7.
5. Strieter RM, Burdick MD, Mestas J, Gomperts B, Keane MP, Belperio JA. Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis. *Eur J Cancer*. 2006;42(6):768–78.
6. Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, et al. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol*. 2000;68(1):1–8.
7. Heidemann J, Ogawa H, Dwinell MB, Rafiee P, Maaser C, Gockel HR, et al. Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. *J Biol Chem*. 2003;278(10):8508–15.
8. Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol*. 2003;170(6):3369–76.
9. Singh S, Sadanandam A, Singh RK. Chemokines in tumor angiogenesis and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26(3-4):453–67.
10. Strieter RM, Belperio JA, Phillips RJ, Keane MP. CXC chemokines in angiogenesis of cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 2004;14(3):195–200.
11. Addison CL, Daniel TO, Burdick MD, Liu H, Ehlert JE, Xue YY, et al. The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J Immunol*. 2000;165(9):5269–77.
12. Matsushima K, Morishita K, Yoshimura T, Lavu S, Kobayashi Y, Lew W, et al. Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med*. 1988;167(6):1883–93.

13. Matsushima K, Baldwin E, Mukaida N. Interleukin-8 and MCAF: novel leukocyte recruitment and activating cytokines. *Chem Immunol.* 1992;51:236–65.
14. Inoue K, Slaton JW, Kim SJ, Perrotte P, Eve BY, Bar-eli M, et al. Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastasis in androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2000;6(5):2104-19.
15. Waugh DJJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(21):6735–41.
16. Arenberg DA, Kunkel SL, Polverini PJ, Glass M, Burdick MD, Strieter RM. Inhibition of interleukin-8 reduces tumorigenesis of human non-small cell lung cancer in SCID mice. *J Clin Invest.* 1996;97(12):2792–802.
17. Kitadai Y, Haruma K, Sumii K, Yamamoto S, Ue T, Yokozaki H, et al. Expression of interleukin-8 correlates with vascularity in human gastric carcinomas. *Am J Pathol.* 1998;152(1):93–100.
18. Ahmed OI, Ahmed OI, Adel AM, Adel AM, Diab DR, Diab DR, et al. Prognostic value of serum level of interleukin-6 and interleukin-8 in metastatic breast cancer patients. *Egypt J Immunol.* 2006;13(2):61–8.
19. Taguchi A, Ohmiya N, Shirai K, Mabuchi N, Itoh A, Hirooka Y, et al. Interleukin-8 promoter polymorphism increases the risk of atrophic gastritis and gastric cancer in Japan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(11):2487–93.
20. Ben-Baruch A. Inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor-microenvironment interactions. *Breast Cancer Research.* 2003;5(1):31–6.
21. Ren Y, Poon RT, Tsui HT, Chen WH, Li Z, Lau C, et al. Interleukin-8 serum levels in patients with hepatocellular carcinoma: correlations with clinicopathological features and prognosis. *Clin Cancer Res.* 2003;9(16):5996–6001.
22. Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro Oncol.* 2005;7(2):122–33.
23. Li A, Varney ML, Singh RK. Expression of interleukin 8 and its receptors in human colon carcinoma cells with different metastatic potentials. *Clin Cancer Res.* 2001;7(10):3298–304.
24. Lee YS, Choi I, Ning Y, Kim NY, Khatchadourian V, Yang D, et al. Interleukin-8 and its receptor CXCR2 in the tumour microenvironment promote colon cancer growth, progression and metastasis. *Br J Cancer.* Nature Publishing Group. 2012;106(11):1833–41.

25. Moore BB, Arenberg DA, Stoy K, Morgan T, Addison CL, Morris SB, et al. Distinct CXC chemokines mediate tumorigenicity of prostate cancer cells. *Am J Pathol.* 1999;154(5):1503–12.
26. Ferrer FA, Miller LJ, Andrawis RI, Kurtzman SH, Albertsen PC, Laudone VP, et al. Angiogenesis and prostate cancer: in vivo and in vitro expression of angiogenesis factors by prostate cancer cells. *Urology.* 1998;51(1):161–7.
27. Sun JK, Uehara H, Karashima T, Mccarty M, Shih N, Fidler IJ. Expression of interleukin-8 correlates with angiogenesis, tumorigenicity, and metastasis of human prostate cancer cells implanted orthotopically in nude mice. *Neoplasia.* 2001;3(1):33–42.
28. Murphy C, McGurk M, Pettigrew J, Santinelli A, Mazzucchelli R, Johnston PG, et al. Nonapical and cytoplasmic expression of interleukin-8, CXCR1, and CXCR2 correlates with cell proliferation and microvessel density in prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11(11):4117–27.
29. Veltri RW, Miller MC, Zhao G, Ng A, Marley GM, Wright GL, et al. Interleukin-8 serum levels in patients with benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Urology.* 1999;53(1):139–47.
30. Knudsen LE, Loft SH, Autrup H. Risk assessment: the importance of genetic polymorphisms in man. *Mutat Res.* 2001;482(1-2):83–8.
31. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene.* 1999;234(2):177–86.
32. Erichsen HC, Chanock SJ. SNPs in cancer research and treatment. *Br J Cancer.* 2004;90(4):747–51.
33. Hull J, Thomson A, Kwiatkowski D. Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families. *Thorax.* 2000;55(12):1023–7.
34. Lurje G, Zhang W, Schultheis AM, Yang D, Groshen S, Hendifar AE, et al. Polymorphisms in VEGF and IL-8 predict tumor recurrence in stage III colon cancer. *Ann Oncol.* 2008;19(10):1734–41.
35. McCarron SL, Edwards S, Evans PR, Gibbs R, Dearnaley DP, Dowe A. Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer. *Cancer Res.* 2002;62(12):3369–72.
36. Ohyauchi M, Imatani A, Yonechi M, Asano N, Miura A, Iijima K, et al. The polymorphism interleukin 8 -251 A/T influences the susceptibility of *Helicobacter pylori* related gastric diseases in the Japanese population. *Gut.* 2005;54(3):330–5.
37. Nasr H Ben, Chahed K, Mestiri S, Bouaouina N, Snoussi K, Chouchane L. Association of IL-8 (-251)T/A polymorphism with susceptibility to and



- aggressiveness of nasopharyngeal carcinoma. *Hum Immunol.* 2007;68(9):761–9.
38. Kamali-Sarvestani E, Aliparasti MR, Atefi S. Association of interleukin-8 (IL-8 or CXCL8) -251 T/A and CXCR2 +1208 C/T gene polymorphisms with breast cancer. *Neoplasma.* 2007;54(6):484–9.
  39. Renzoni E, Lympany P, Sestini P, Pantelidis P, Wells A, Black C, et al. Distribution of novel polymorphisms of the interleukin-8 and CXC receptor 1 and 2 genes in systemic sclerosis and cryptogenic fibrosing alveolitis. *Arthritis Rheum.* 2000;43(7):1633–40.
  40. Snoussi K, Mahfoudh W, Bouaouina N, Fekih M, Khairi H, Helal AN, et al. Combined effects of IL-8 and CXCR2 gene polymorphisms on breast cancer susceptibility and aggressiveness. *BMC Cancer.* 2010;10(283):1-12.
  41. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015;136:E359–86.
  42. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2015. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(1):5–29.
  43. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2012, National Cancer Institute. Bethesda, MD, based on November 2014 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2015. [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2012/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/)
  44. Kheirandish P, Chinegwundoh F. Ethnic differences in prostate cancer. *Br J Cancer.* 2011;105(4):481–5.
  45. Ingles SA, Ross RK, Yu MC, Irvine RA, La Pera G, Haile RW, et al. Association of prostate cancer risk with genetic polymorphisms in vitamin D receptor and androgen receptor. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89(2):166–70.
  46. Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC. Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate.* 1990;17(4):337–47.
  47. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer - analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med.* 2000;343(2):78–85.
  48. Schaid DJ. The complex genetic epidemiology of prostate cancer. *Hum Mol Genet.* 2004;13(1):R103–21.
  49. Gonzalgo ML, Isaacs WB. Molecular pathways to prostate cancer. *J Urol.* 2003;170(6):2444–52.

50. Giovannucci E, Stampfer MJ, Krithivas K, Brown M, Dahl D, Brufsky A, et al. The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(7):3320–3.
51. Jaffe JM, Malkowicz SB, Walker AH, Macbride S, Peschel R, Tomaszewski J, et al. Association of SRD5A2 genotype and pathological characteristics of prostate tumors. *Cancer Res*. 2000;60(6):1626–30.
52. Taylor JA, Hirvonen A, Watson M, Pittman G, Mohler JL, Bell DA. Association of prostate cancer with vitamin D receptor gene polymorphism. *Cancer Res*. 1996;56(18):4108–10.
53. De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol*. 1999;155(6):1985–92.
54. Palapattu GS, Sutcliffe S, Bastian PJ, Platz EA, De Marzo AM, Isaacs WB, et al. Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights. *Carcinogenesis*. 2005;26(7):1170–81.
55. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(4):256–69.
56. Dennis LK, Dawson DV. Meta-analysis of measures of sexual activity and prostate cancer. *Epidemiology*. 2002;13(1):72–9.
57. Nesrallah LJ, Srougi M. Tumores da próstata. In: Hoff PMG. *Tratado de oncologia*. São Paulo: Atheneu; 2013. p. 1887-910.
58. Vashchenko N, Abrahamsson P. European Urology Neuroendocrine Differentiation in Prostate Cancer : Implications for New Treatment Modalities. *Eur Urol*. 2005;47:147–55.
59. Gleason DF. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep*. 1966;50(3):125–8.
60. Gleason DF, Mellinger GT. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol*. 1974;111(1):58–64.
61. Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: A perspective. *Hum Pathol*. 1992;23(3):273–9.
62. Stark JR, Perner S, Stampfer MJ, Sinnott JA, Finn S, Eisenstein AS, et al. Gleason score and lethal prostate cancer: Does 3 + 4 = 4 + 3? *J Clin Oncol*. 2009;27(21):3459–64.
63. D'Amico A V, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick GA, et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer.

- JAMA. 1998;280(11):969–74.
64. Epstein JI. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2005;29(9):1228–42.
  65. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma: definition of grading patterns and proposal for a new grading system. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2015 Oct 21 [citado 2015 Nov 25] Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26492179>.
  66. Etzioni R, Cha R, Feuer EJ, Davidov O. Asymptomatic incidence and duration of prostate cancer. *Am J Epidemiol*. 1998;148(8):775–85.
  67. Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Dodds KM, Coplen DE, Yuan JJ, et al. Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *N Engl J Med*. 1991;324(17):1156–61.
  68. Wolf AM, Wender RC, Etzioni RB, Thompson IM, Amico AV, Volk RJ, et al. American Cancer Society guideline for the early detection of prostate cancer update 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010;60(2):70–98.
  69. Draisma G, Etzioni R, Tsodikov A, Mariotto A, Wever E, Gulati R, et al. Lead time and overdiagnosis in prostate-specific antigen screening: importance of methods and context. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(6):374–83.
  70. Balk SP, Ko Y-J, Bubley GJ. Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol*. 2003;21(2):383–91.
  71. Nadler RB, Humphrey PA, Smith DS, Catalona WJ, Ratliff TL. Effect of inflammation and benign prostatic hyperplasia on elevated serum prostate specific antigen levels. *J Urol*. 1995;154(2):407–13.
  72. Herschman JD, Smith DS, Catalona WJ. Effect of ejaculation on serum total and free prostate-specific antigen concentrations. *Urology*. 1997;50(2):239–43.
  73. Thompson IM, Ankerst DP, Chi C, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, et al. Assessing prostate cancer risk: results from the Prostate Cancer Prevention Trial. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(8):529–34.
  74. Carter HB. American Urological Association (AUA) guideline on prostate cancer detection: process and rationale. *BJU Int*. 2013;112(5):543–7.
  75. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). Prostate cancer early detection version 2.2015. Fort Washington: National Comprehensive Cancer Network; 2015.
  76. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. The American

- Joint Committee on Cancer (AJCC): cancer staging manual. 7th ed. New York: Springer; 2010.
77. Choueiri TK, Xie W, D'Amico AV, Ross RW, Hu JC, Pomerantz M, et al. Time to prostate-specific antigen nadir independently predicts overall survival in patients who have metastatic hormone-sensitive prostate cancer treated with androgen-deprivation therapy. *Cancer*. 2009;115(5):981–7.
  78. Hussain M, Tangen CM, Higano C, Schelhammer PF, Faulkner J, Crawford ED, et al. Absolute prostate-specific antigen value after androgen deprivation is a strong independent predictor of survival in new metastatic prostate cancer: data from Southwest Oncology Group Trial 9346 (INT-0162). *J Clin Oncol*. 2006;24(24):3984–90.
  79. Stewart AJ, Scher HI, Chen MH, McLeod DG, Carroll PR, Moul JW, et al. Prostate-specific antigen nadir and cancer-specific mortality following hormonal therapy for prostate-specific antigen failure. *J Clin Oncol*. 2005;23(27):6556–60.
  80. Bao BY, Pao JB, Huang CN, Pu YS, Chang TY, Lan YH, et al. Polymorphisms inside MicroRNAs and MicroRNA target sites predict clinical outcomes in prostate cancer patients receiving androgen-deprivation therapy. *Clin Cancer Res*. 2011;17(4):928–36.
  81. Parker C, Gillessen S, Heidenreich A, Horwich A. Cancer of the prostate: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2015;26(5):V69-77.
  82. Dejana E, Corada M, Lampugnani MG. Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J*. 1995;9(10):910–8.
  83. Henson PM. Dampening inflammation. *Nat Immunol*. 2005;6(12):1179–81.
  84. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001;357(9225):539–45.
  85. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):436–44.
  86. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. *Imunologia de Kuby*. 6ed. Porto Alegre: Artmed; 2008.
  87. Abbas AK, Lichtman AH, Pilla S. *Imunologia celular e molecular*. 6a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
  88. Sprenger H, Lloyd AR, Lautens LL, Bonner TI, Kelvin DJ. Structure, genomic organization, and expression of the human interleukin-8 receptor B gene. *J Biol Chem*. 1994;269(15):11065–72.
  89. Mukaida N. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary

- diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003;284(4):L566–77.
90. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000;12(2):121–7.
  91. Luster AD. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*. 1998;338(7):436–45.
  92. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem*. 1995;270(45):27348–57.
  93. Leonard EJ, Yoshimura T. Neutrophil attractant/activation protein-1 (NAP-1 [interleukin-8]). *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1990;2(6):479–86.
  94. Strieter RM, Kasahara K, Allen RM, Standiford TJ, Rolfe MW, Becker FS, et al. Cytokine-induced neutrophil-derived interleukin-8. *Am J Pathol*. 1992;141(2):397–407.
  95. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*. 1992;258(5089):1798–801.
  96. Uguccioni M, Gionchetti P, Robbiani DF, Rizzello F, Peruzzo S, Campieri M, et al. Increased expression of IP-10, IL-8, MCP-1, and MCP-3 in ulcerative colitis. *Am J Pathol*. 1999;155(2):331–6.
  97. Lee J, Horuk R, Rice GC, Bennett GL, Camerato T, Wood WI. Characterization of two high affinity human interleukin-8 receptors. *J Biol Chem*. 1992;267(23):16283–7.
  98. Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, et al. Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood*. 2000;96(1):34–40.
  99. Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett*. 2008;267(2):226–44.
  100. Baggiolini M, Loetscher P, Moser B. Interleukin-8 and the chemokine family. *Int J Immunopharmacol*. 1995;17(2):103–8.
  101. Matsushima K, Oppenheim JJ. Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and TNF. *Cytokine*. 1989;1(1):2–13.
  102. Walz A, Peveri P, Aschauer H, Baggiolini M. Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987;149(2):755–61.
  103. Seaton A, Scullin P, Maxwell PJ, Wilson C, Pettigrew J, Gallagher R, et al. Interleukin-8 signaling promotes androgen-independent proliferation of prostate

- cancer cells via induction of androgen receptor expression and activation. *Carcinogenesis*. 2008;29(6):1148–56.
104. Pienta KJ, Bradley D. Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2006;12(6):1665–71.
  105. Xie K. Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2001;12(4):375–91.
  106. Murdoch C, Monk PN, Finn A. CXC chemokine receptor expression on human endothelial cells. *Cytokine*. 1999;11(9):704–12.
  107. Mukaida N, Shiroo M, Matsushima K. Genomic structure of the human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor IL-8. *J Immunol*. 1989;143(4):1366–71.
  108. Hull J, Rowlands K, Lockhart E, Sharland M, Moore C, Hanchard N, et al. Haplotype mapping of the bronchiolitis susceptibility locus near IL8. *Hum Genet*. 2004;114(3):272–9.
  109. Michaud DS, Daugherty SE, Berndt SI, Platz EA, Yeager M, Crawford ED, et al. Genetic polymorphisms of interleukin-1B (IL-1B), IL-6, IL-8, and IL-10 and risk of prostate cancer. *Cancer Res*. 2006;66(8):4525–30.
  110. Yang HP, Woodson K, Taylor PR, Pietinen P, Albanes D, Virtamo J, et al. Genetic variation in interleukin 8 and its receptor genes and its influence on the risk and prognosis of prostate cancer among Finnish men in a large cancer prevention trial. *Eur J Cancer Prev*. 2006;15(3):249–53.
  111. Wang N, Zhou R, Wang C, Guo X, Chen Z, Yang S, et al. -251 T/A polymorphism of the interleukin-8 gene and cancer risk: A HuGE review and meta-analysis based on 42 case-control studies. *Mol Biol Rep*. 2012;39(3):2831–41.
  112. Zabaleta J, Lin H-Y, Sierra RA, Hall MC, Clark PE, Sartor OA, et al. Interactions of cytokine gene polymorphisms in prostate cancer risk. *Carcinogenesis*. 2008;29(3):573–8.
  113. Barnes P. Molecular genetics of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 1999;54(3):245–52.
  114. Donahue TR, Hines OJ. CXCR2 and RET single nucleotide polymorphisms in pancreatic cancer. *World Journal of Surgery*. 2009;33(4):710–5.

## 6 ARTIGO ORIGINAL

### **CXCR2 +1208 CT genotype may predict earlier clinical stage at diagnosis in patients with prostate cancer**

Juliana M Franz<sup>a</sup>, Pâmela Portela<sup>a</sup>, Patricia H Salim<sup>b</sup>, Milton Berger<sup>c</sup>, Luiz Fernando Jobim<sup>b,d,e</sup>, Rafael Roesler<sup>f,g</sup>, Mariana Jobim<sup>b</sup>, Gilberto Schwartzmann<sup>d,f,h</sup>

<sup>a</sup>Graduate Program in Medical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>b</sup>Department of Immunology, Hospital de Clínicas, Porto Alegre, Brazil

<sup>c</sup>Department of Urology, Hospital de Clínicas, Porto Alegre, Brazil

<sup>d</sup>Department of Internal Medicine, School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>e</sup>Graduate Program in Surgery, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>f</sup>Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>g</sup>Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>h</sup>Department of Oncology, Hospital de Clínicas, Porto Alegre, Brazil

#### **\*Corresponding author**

Mariana Jobim, PhD

Department of Immunology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350, Bairro Bom Fim. CEP 90035-903

Porto Alegre-RS, Brazil. Tel/fax: +55 5133598020.

E-mail: mjobim@hcpa.edu.br

#### **Keywords:**

Interleukin 8; Receptors; IL-8; CXCL8; CXCR2; Polymorphism; Prostate Cancer

## ABSTRACT

Interleukin-8 (IL-8) is an angiogenic CXC chemokine that plays an important role in both the development and progression of several human malignancies including prostate cancer (PC). A single nucleotide polymorphism (SNP) at -251 upstream of the transcriptional start site of the IL-8 gene has been shown to influence its production. The effects of IL-8 are mediated by two highly related chemokine receptors, CXCR1 and CXCR2. The present study investigated the influence of the IL-8 and CXCR2 gene variation on susceptibility and clinicopathological characteristics of PC in a group of Brazilian subjects. **METHODS:** Two hundred and one patients and 185 healthy controls were enrolled in a case-control study. Blood was collected for DNA extraction; typing of IL-8 -251 T/A and CXCR2 +1208 C/T genes was performed by polymerase chain reaction with sequence-specific primers (PCR-SSP), followed by agarose gel electrophoresis. Risk association between the genotypes, PC susceptibility and tumor characteristics was estimated by odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (95% CI) using logistic regression analysis, after adjusting for age at diagnosis. **RESULTS:** A significant association was found between the heterozygous CXCR2 +1208 CT genotype and PC. The CXCR2 +1208 CT genotype was significantly less frequent in patients with clinical stage T3-T4 compared to T1-T2 (56.7 versus 80.5%). Our findings suggest that carriers of the CXCR2 +1208 CT genotype had a protective effect for advanced PC (CT versus CC: adjusted OR = 0.25;  $P = 0.02$ ). No association was observed between the SNP for IL-8 -251 T/A and clinicopathological parameters of PC. **CONCLUSION:** These results indicated that the CXCR2 +1208 CT genotype is less frequent in advanced stages of PC, suggesting that this chemokine receptor plays a role in the pathogenesis of this disease.

## INTRODUCTION

Prostate cancer (PC) is the second most common cancer and the world's fifth leading cause of cancer-related death among men (Ferlay et al. 2015). In the United States alone it is estimated that 220,800 new cases of PC will be diagnosed in 2015 and that close to 27,500 men will die from the disease (Siegel et al. 2015). In Brazil,



there were approximately 68,800 new cases of PC in 2014, or an estimated risk of 70 new cases per 100,000 men, ranking first among male cancers, with the exception of non-melanoma skin cancer (INCA 2014). Age, ethnicity and a family history of PC are currently the only established risk factors for this disease. Evidence on diet, especially animal fat and red meat intake, is only somewhat consistent (Hsing & Chokkalingam 2006). Furthermore, chronic inflammation has been directly associated with the risk of developing PC (MacLennan et al. 2006).

Chronic inflammation may lead to tumorigenesis by damaging DNA through radical oxygen and nitrogen species, enhancing cell proliferation and stimulating angiogenesis (Coussens & Werb 2002). The importance of inflammation in the development of PC is highlighted by the finding that approximately 20% of patients presenting chronic inflammation in the prostate developed PC after a 5 year follow-up, when compared to patients with no chronic inflammatory changes (MacLennan et al. 2006). PC tumorigenesis and metastasis is dependent on angiogenesis. The CXC chemokines are a unique family of cytokines capable of regulating angiogenesis (Belperio et al. 2000).

The CXC family of chemokines is a chemotactic group of cytokines, defined by four highly conserved cysteine amino acid residues, with the first two cysteines separated by a non-conserved amino acid residue (Strieter et al. 1995; Luster 1998; Belperio et al. 2000). The N-terminus of CXC chemokines dictates their specificity for binding to their cognate receptors. For example, CXC chemokines that contain a glutamic acid-leucine-arginine (Glu-Leu-Arg) motif ("ELR" motif; ELR+) in the N-terminus of the molecule that immediately precedes the first cysteine amino acid residue are potent promoters of angiogenesis (Strieter et al. 1995; Luster 1998; Belperio et al. 2000). ELR+ CXC chemokines play an important role in tumor growth and progression in a number of tumors (Strieter et al. 2004), including PC (Moore et al. 1999).

Interleukin-8 (IL-8, CXCL-8), a member of the ELR+ CXC chemokine, which was originally described as a leukocyte chemoattractant (Matsushima et al. 1992), was subsequently found to possess mitogenic and angiogenic properties (Inoue et al. 2000). Increased expression of IL-8 and its receptors has been characterized in cancer cells, endothelial cells, infiltrating neutrophils, and tumor-associated

macrophages, suggesting that IL-8 may function as a significant regulatory factor within the tumor microenvironment (Waugh & Wilson 2008). Serum levels of IL-8 were found to be significantly elevated in patients with PC (Ferrer et al. 1998; Moore et al. 1999; Sun et al. 2001; Murphy et al. 2005). These levels are highly correlated with the stage of the disease and are an independent variable from the ratio of free/total prostate specific antigen (PSA) (Veltri et al. 1999). Moreover, expression of IL-8 in PC cells has been shown to correlate with angiogenesis, tumorigenicity, and metastasis (Sun et al. 2001).

The biological effects of IL-8 are mediated through the binding of IL-8 to two cell-surface G protein-coupled receptors, denominated CXCR1 and CXCR2 (Holmes et al. 1991). Of these two high affinity receptors for IL-8, the importance of CXCR2 in mediating chemokine-induced angiogenesis is fundamental to IL-8-induced neovascularization (Addison et al. 2000; Heidemann et al. 2003; Strieter et al. 2004). IL-8 and CXCR2 overexpression may be a risk factor in the development and progression of solid tumors (Li et al. 2001; Ben-Baruch 2003; Savage et al. 2004; Brat et al. 2005; Horikawa et al. 2005; Mestas et al. 2005; Wente et al. 2006; Kamali-Sarvestani et al. 2007; Snoussi et al. 2010; Lee et al. 2012).

Polymorphisms in the promoter regions of cytokine genes may influence PC development via regulation of the antitumor immune response and pathways of tumor angiogenesis (McCarron et al. 2002). The IL-8 gene is located on chromosome 4q13-21 and consists of four exons, three introns, and a proximal promoter region (Mukaida et al. 1989). Several polymorphisms have been identified in IL-8 and CXCR2 genes (Hull et al. 2000; Renzoni et al. 2000). A common single nucleotide polymorphism at position -251 of the IL-8 promoter region has been associated with increased plasma levels of IL-8 (Hull et al. 2000) and with IL-8 promoter activities (Taguchi et al. 2005). Studies suggests that the IL-8 -251 T/A polymorphism is related to a greater risk of developing malignant diseases (McCarron et al. 2002; Ohyauchi et al. 2005; Nasr et al. 2007; Lurje et al. 2008). In addition, several authors report that the +1208 C/T polymorphism, located in the non-coding region of the CXCR2 gene, may provide valuable information on pathogenesis and susceptibility to chronic inflammatory disease (Renzoni et al. 2000) and solid tumors (Kamali-Sarvestani et al. 2007; Snoussi et al. 2010).

The present study examined IL-8 -251 T/A (rs 4073) and CXCR2 +1208 C/T (rs 1801032) polymorphisms in a group of 175 patients with PC and 185 healthy controls, aiming to identify the potential association between these polymorphisms and susceptibility and prognostic factors of the disease. To the best of our knowledge, this is the first study of IL-8 and CXCR2 gene polymorphisms in a Caucasian Brazilian population with PC.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Patients and controls**

IL-8 and CXCR2 genotype and allele frequencies were determined in a control group of 185 subjects and 201 patients with PC. Controls and patients were selected from the same population living in Southern Brazil and participants were not related. DNA samples from the healthy controls recruited from screening studies and patients were obtained from the Urology Department of Hospital de Clínicas de Porto Alegre in 2012. All subjects were Caucasian. Inclusion criteria for controls were PSA <4.0ng/ml, normal digital rectal examination, and no family history of PC. The study was approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (IRB0000921) and all participants provided written informed consent.

Clinical characteristics were obtained from medical records and included age at diagnosis, family history (determined by first-degree relatives), smoking history, pretreatment prostate specific antigen (PSA) level, Gleason score, and clinical stage [using criteria from the American Joint Committee on Cancer tumor node metastasis (TNM) cancer staging] (Edge & Compton 2010). All patients included in this study had prostate adenocarcinoma confirmed by histopathological analyses. Patients whose tumors showed neuroendocrine features were excluded. These samples represented a spectrum of histologic types according to the Gleason grading system (Gleason & Mellinger 1974; Stark et al. 2009). To that end, well differentiated tumors and those with Gleason scores less than 5 were not considered. Histopathological information was available for 93% of the subjects.

All participants were Brazilian, most had European and/or African ancestry,

and lived in the metropolitan area of Porto Alegre, in Rio Grande do Sul State. None of the patients had Asian or Native Brazilian ancestry. Twenty one cases (10.4%) were excluded as no-Caucasian, three had missing values for the pretreatment predictor variables, and two lacked genotype data due to insufficient DNA and genotyping failure, leaving a final analysis cohort of 175 men (12.9% of initial cohort).

### **IL-8 -251 T/A and CXCR2 +1208 C/T genotyping**

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using a modified salting out technique, described by Miller SA et al. (Miller et al. 1988). IL-8 and CXCR2 genes were typed in patients and controls using polymerase chain reaction with sequence-specific primers (PCR-SSP), as described by Kamali-Sarvestani et al. (Kamali-Sarvestani et al. 2006). As an internal control,  $\beta$ -globin specific primers were included in PCR-SSP. For the genotyping of IL-8, 10 $\mu$ l of PCR reaction mixture were used consisting of 250ng of genomic DNA, 200mmol/L dNTPs, 2.25mMMgCl<sub>2</sub>, 1 x Taq DNA polymerase buffer, 2 units of Taq DNA polymerase, 10pmol of each test primer and 5pmol of internal control primers. This was followed by a touchdown procedure of 25s at 95°C, annealing for 45s at temperatures decreasing from 68°C (4 cycles) to 61°C (20 cycles), and an extension step at 72°C for 40s. The annealing temperature for the remaining 5 cycles was 58°C for 40s. Determination of CXCR2 gene polymorphism was carried out with the same PCR reaction mixture, except for MgCl<sub>2</sub> concentration, which was 1.7mM. The touchdown procedure applied was similar to IL-8 genotyping except for the annealing temperatures in the three consecutive steps, which were 70, 65, and 55°C, respectively. The reaction products of IL-8 and CXCR2 gene amplification were separated on 2.5% agarose gel, stained with ethidium bromide, submitted to electrophoresis and visualized under UV transillumination.

### **Statistical Analysis**

Data were analyzed using SPSS for Windows, version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Sample size was calculated with a significance level of 0.05 and 80%

power, using WinPepi software. The genotype and allele frequencies of IL-8 and CXCR2 were tested for the Hardy-Weinberg equilibrium for both patient and control groups using the chi-square ( $X^2$ ) test. Carrier frequencies for the alleles and their combinations were compared using Yates' chi-squared test or Fisher's exact test. Two-sample t tests, one-way ANOVA, and chi-square testing were used to explore the bivariate association between PC status and other covariates for continuous and categorical variables. Risk association between the genotypes, PC susceptibility and tumor characteristics was estimated by OR and 95% CI using logistic regression analysis. The model for adjusted OR included age at diagnosis. Statistical significance was set as  $P < 0.05$ . The association between IL-8 and CXCR2 genotypes and clinicopathological parameters was evaluated by Pearson's  $X^2$  test. Clinicopathological parameters were dichotomized as follows: pretreatment PSA level (<10 versus  $\geq 10$ ), Gleason score (<7 versus  $\geq 7$ ), clinical stage [T1-T2 (localized disease) versus T3-T4 (advanced disease)], and metastatic disease [T1/M1 (negative versus positive)] at diagnosis.

## RESULTS

Genotype distribution and allele frequencies for IL-8 -251 T/A and CXCR2 +1208 C/T polymorphisms in 185 controls and 175 patients with PC are shown in Table 1. The allele frequency of IL-8 and CXCR2 genes were in Hardy-Weinberg equilibrium in both patients and controls. No significant difference was found between frequencies of the IL8 -251 T/A and CXCR2 +1208 C/T alleles. The allele frequency of IL-8 -251A was 0.44 in patients with PC and 0.48 in controls. Furthermore, no correlation was observed between IL8 and CXCR2 genotype distributions in PC patients and healthy controls (Table 2).

Mean age at diagnosis was  $67 \pm 7,8$  (SD) years for patients and  $61 \pm 7,3$  years in controls. One-way ANOVA testing was used to explore the association between IL-8 and CXCR2 genotype distributions and age at diagnosis, as well as PSA level and log PSA level. Only IL-8 -251 was statistically significantly associated with age at diagnosis ( $P = 0.01$ ); however, the post hoc test (Tukey) showed no intragroup difference ( $P = 0.11$ ). There was no evidence of association between IL-8

and CXCR2 genotypes, and family history of PC and smoking history (all  $P > 0.13$ ). Nevertheless, these results should be confirmed in a larger sample of patients, as the information obtained from the medical records was limited.

Among patients, the median pretreatment PSA level was 9.4 (range 6.0-15.7). In addition, 54% of patients exhibited a PSA level  $<10$ , 47% had a Gleason score  $<7$ , and 82% were diagnosed with clinical stage T1-T2. Overall, 7% of patients had metastatic disease at time of diagnosis.

The OR estimate for -251A allele carriers was 0.80 (95% CI 0.58-1.09;  $P = 0.16$ ), adjusted for age at diagnosis. There was no significant difference in allelic and genotypic frequency distribution between patients and controls, suggesting that the -251A allele carriers were not susceptible to PC (Table 3).

Distributions of IL-8 -251 T/A and CXCR2 +1208 C/T polymorphisms according to the clinicopathological parameters of PC are presented in Tables 4 and 5. In order to analyze the effects of these polymorphisms on tumor characteristics at diagnosis, the AA genotype for IL-8 and TT genotype for CXCR2 were defined as high-risk and all data for the other genotypes were calculated accordingly.

Frequency of the CXCR2 +1208 CT genotype was significantly lower in patients with clinical stage T3-T4 compared to T1-T2 (56.7% versus 80.5%, respectively). This result demonstrates that carriers of the CXCR2 +1208 CT genotype had a protective effect for advanced PC, as defined by clinical stage T3-T4 (CT versus CC: adjusted OR = 0.25; 95% CI 0.08-0.80;  $P = 0.02$ ). No associations were found for pretreatment PSA level, Gleason score, and presence of metastatic disease, or between the SNP for IL-8 -251 T/A and clinicopathological parameters of PC.

## DISCUSSION

Emerging evidence suggests that IL-8 plays an important role in the pathogenesis of cancer through the modulation of tumor immune response or enhanced angiogenesis (Coussens & Werb 2002; Grivennikov et al. 2010). IL-8 gene coding exhibits several functional polymorphisms, fifteen of which have been

characterized (Hull et al. 2004). Among these, a common SNP at -251 upstream of the transcriptional start site has been shown to influence IL-8 production, and altered transcriptional activity of the IL-8 promoter has been confirmed by in vitro studies (Hull et al. 2000; Lee et al. 2005; Canedo et al. 2008). SNPs in cytokine genes have been associated with increased inflammation, greater cytokine production and possibly increased PC risk (Zabaleta et al. 2008a). However, the effects of cytokine SNPs on PC susceptibility have not been consistent.

The ability of IL-8 to elicit angiogenic activity depends on the endothelial cell expression of its receptors. CXCR1 and CXCR2 are both expressed by endothelial cells, but only CXCR2 expression is required for endothelial cell chemotaxis (Addison et al. 2000). When the function of CXCR2 is blocked, endothelial cell response to IL-8 is abrogated (Heidemann et al. 2003). Several studies have confirmed the importance of CXCR2 in mediating the effects of angiogenesis in human microvascular endothelial cells (Addison et al. 2000; Heidemann et al. 2003). CXCR2 +1208 C/T gene polymorphism has the potential to alter mRNA processing, stability or translation and is located in the 3'untranslated region of exon 3 (Sprenger et al. 1994). Three single polymorphisms at positions +785 C/T, +1208 C/T and +1440 G/A were reported in the CXCR2 gene. Several studies have indicated that the +1208 C/T polymorphism located in the non-coding region of the CXCR2 gene may provide valuable information on pathogenesis and susceptibility to chronic inflammatory disease and solid tumors (Renzoni et al. 2000; Donahue & Hines 2009; Snoussi et al. 2010).

Given the importance of IL-8 and CXCR2 in tumorigenesis and angiogenesis, we investigated the relationship between IL-8 -251 T/A and CXCR2 +1208 C/T and PC. To our knowledge, this is the first report investigating the possible role of CXCR2 +1208 C/T polymorphism in the susceptibility and prognosis factors of this disease. Our results demonstrated that carriers of the CXCR2 +1208 CT genotype had a protective effect for advanced PC, as defined by clinical stage T3-T4. No significant association was observed for pretreatment PSA level, Gleason score and presence of metastatic disease. Moreover, no significant difference was observed in the frequencies of IL-8 -251 T/A and CXCR2 +1208 C/T alleles, with no correlation between IL-8 and CXCR2 genotype distributions in PC cases and healthy controls.

A study investigated other IL-8 polymorphisms and correlated them with the degree of disease aggressiveness, demonstrating that Caucasian-American patients with the IL-8 -47 CT genotype displayed increased risk of aggressive PC (Zabaleta et al. 2009). McCarron et al. studied a sample of Caucasian individuals and reported that the IL-8 -251 TT genotype decreased significantly in 238 PC patients compared to 235 controls. In addition, the data showed a significant correlation and possible influence of IL-8 on increased log PSA level measured before tumor removal. No significant associations were observed between cytokine genotype and tumor stage, grade, disease-free survival, or overall survival (McCarron et al. 2002). However, controls in this study were not representative of the cases (controls were men and women, and were drawn from an organ donor bank).

Seven common genetic polymorphisms of cytokines IL-1B, IL-6, IL-8 and IL-10 were examined in White non-Hispanic and Black non-Hispanic men divided into 503 PC cases and 652 controls, with no associations observed for either risk of PC or risk of advanced disease (Michaud et al. 2006). Another case-control study examined the most representative SNPs for IL-8 and its receptor (CXCR1 and CXCR2) genes in 584 cases of primary PC and 584 matched controls in order to evaluate if these SNPs are associated with susceptibility and prognosis of PC. No strong association was reported between the SNPs for IL-8 -251 (A>T), CXCR1 +860 (C>G) and CXCR2 -1010 (A>G), subsequent risk of PC or individual prognostic factors among cases (Yang et al. 2006).

In a prospective study, 17 common SNPs were genotyped in 12 genes, including IL-8, in 258 white PC cases and 258 matched controls in order to evaluate the association between SNPs involved in immune response and obesity and PC (Wang et al. 2009). Results from this study, indicated that carrying the variant A allele at IL-10 -1082 G>A was associated with an overall increased risk of PC, particularly organ-confined/low grade disease. IL-10 is an anti-inflammatory cytokine that regulates both innate and adaptive immunity (Moore et al. 2001). IL-10 may influence the pathogenesis of PC by inhibiting the production of pro-inflammatory cytokines, including TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-8 (Moore et al. 2001), and indirectly inhibit tumor invasion and metastasis (Stearns et al. 1999). None of the other candidate SNPs, including IL-8, was statistically significant or consistently associated with PC (Wang et al. 2009).



Interestingly, a study has shown that in PC, SNPs in cytokine genes are differentially distributed among African-Americans and Caucasians and interact differently in both ethnic groups to modify PC risk (Zabaleta et al. 2008b). The frequency of the -251A allele varies in different geographic areas and ethnic populations. Moreover, genetic effects of the polymorphism have been shown to vary from one type of cancer to the other. Even at the same tumor site, results are conflicting. Consequently, the statistical power of an individual study could be very limited to efficiently assess the -251A allele (Wang et al. 2012).

Recently, a meta-analysis based on 42 case-controls showed that carriers of the -251A allele exhibited an overall 12-21% greater risk for the cancer studied. The carriers of the -251A allele showed an elevated risk of breast, gastric and nasopharyngeal cancer as well as a reduced risk of PC, but no evidence was found to indicate that the -251A allele predisposed its carriers to colorectal and lung cancers. A major concern in this meta-analysis is heterogeneity between the component studies. When stratified separately according to "racial descent", it was found that -251A homozygotes, heterozygotes and -251A alleles increased cancer risk among the African and Asian group, but not the European group, which may indicate that the -251A allele is an ethnicity-dependent risk factor for cancer (Wang et al. 2012).

In this same meta-analysis, the authors analyzed four studies investigating the association between the -251A allele and PC in Europeans, with 1496 patients and 1518 controls (McCarron et al. 2002; Michaud et al. 2006; Yang et al. 2006; Wang et al. 2009). The OR estimate for the -251A allele carriers showed no significance (OR=0.95, 95% CI 0.72-1.25). However, the statistical test indicated significant heterogeneity among these studies. This finding can be attributed to the data set from McCarron et al., in which gender and age were statically significant in patients and controls. After exclusion of this data set, the pooled OR estimate for -251A allele carriers was 0.83 (95% CI 0.70-0.99) (Wang et al. 2012). It is interesting to note that our analyses showed that the OR, adjusted for age at diagnosis, was 0.80 for -251A allele carriers (95% CI 0.58-1.09); the *P*-value was not statistically significant, but this result was similar to the OR in the previously mentioned meta-analysis, which indicated that the -251A allele carriers have a decreased risk of PC.

The study of genetic variation can elucidate critical determinants in environmental exposure and cancer, which could have future implications for preventive and early intervention strategies. More extensive studies are needed to understand the effect these SNPs may play in predicting the risk of PC and in modifying the severity and final outcome of the disease (Zabaleta et al. 2008a).

In this regard, the understanding of the complex role chemokines and their receptors play in cancer and inflammation is a strong possibility for new therapeutic opportunities (Yan et al. 2006). Since the expression of IL-8 and its receptor CXCR2 has been correlated with enhanced angiogenesis and tumorigenicity, these genes are attractive targets for the development of anticancer treatments (Sun et al. 2001).

In conclusion, the association observed between the CXCR2 +1208 CT genotype and stage of disease at PC presentation suggests this chemokine receptor plays a role in the pathogenesis of this disease. Additional studies of other ethnically diverse populations should be performed to ascertain whether this gene could be a marker of PC. Furthermore, studies are needed to examine the functionality of CXCR2 polymorphisms and better understand the results of association-disease research.

### **Conflict of interests**

The authors declare there are no conflicts of interest.

### **Acknowledgements**

This study was supported by the Department of Immunology of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. G.S. and R.R. are supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), and the South American Office for Anticancer Drug Development (SOAD), Porto Alegre, Brazil.

## References

- Addison, C.L., Daniel, T.O., Burdick, M.D., Liu, H., Ehlert, J.E., Xue, Y.Y., Buechi, L., Walz, A., Richmond, A. & Strieter, R.M. (2000) The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *Journal of immunology*, **165**, 5269.
- Belperio, J.A., Keane, M.P., Arenberg, D.A., Addison, C.L., Ehlert, J.E., Burdick, M.D. & Strieter, R.M. (2000) CXC chemokines in angiogenesis. *Journal of leukocyte biology*, **68**, 1.
- Ben-Baruch, A. (2003) Inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor-microenvironment interactions. *Breast cancer research*, **5**, 31.
- Brat, D.J., Bellail, A.C. & Van Meir, E.G. (2005) The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro-oncology*, **7**, 122.
- Canedo, P., Castanheira-Vale, A.J., Lunet, N., Pereira, F., Figueiredo, C., Gioia-Patricola, L., et al. (2008) The interleukin-8 -251\*T/\*A polymorphism is not associated with risk for gastric carcinoma development in a Portuguese population. *European journal of cancer prevention*, **17**, 28.
- Coussens, L.M. & Werb, Z. (2002) Inflammation and cancer. *Nature*, **420**, 860.
- Donahue, T.R. & Hines, O.J. (2009) CXCR2 and RET single nucleotide polymorphisms in pancreatic cancer. *World journal surgery*, **33**, 710.
- Edge, S.B. & Compton, C.C. (2010) The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology*, **17**, 1471.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D. & Bray, F. (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, **136**, E359.
- Ferrer, F.A., Miller, L.J., Andrawis, R.I., Kurtzman, S.H., Albertsen, P.C., Laudone, V.P. & Kreutzer, D.L. (1998) Angiogenesis and prostate cancer: in vivo and in vitro expression of angiogenesis factors by prostate cancer cells. *Urology*, **51**, 161.
- Gleason, D.F. & Mellinger, G.T. (1974) Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *The journal of urology*, **111**, 58
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R. & Karin, M. (2010) Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, **140**, 883.

- Heidemann, J., Ogawa, H., Dwinell, M.B., Rafiee, P., Maaser, C., Gockel, H.R., et al. (2003) Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. *Journal of biological chemistry*, **278**, 8508.
- Holmes, W.E., Lee, J., Kuang, W.J., Rice, G.C. & Wood, W.I. (1991) Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science*, **253**, 1278.
- Horikawa, T., Kaizaki, Y., Kato, H., Furukawa, M. & Yoshizaki, T. (2005) Expression of interleukin-8 receptor A predicts poor outcome in patients with nasopharyngeal carcinoma. *The laryngoscope*, **115**, 62.
- Hsing, A.W. & Chokkalingam, A.P. (2006) Prostate cancer epidemiology. *Frontiers in bioscience*, **11**, 1388.
- Hull, J., Rowlands, K., Lockhart, E., Sharland, M., Moore, C., Hanchard, N. & Kwiatkowski, D.P. (2004). Haplotype mapping of the bronchiolitis susceptibility locus near IL8. *Human genetics*, **114**, 272.
- Hull, J., Thomson, A. & Kwiatkowski, D. (2000) Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families. *Thorax*, **55**, 1023.
- INCA. Instituto Nacional do Câncer. (2014) Estimativa 2014 - Incidência de câncer no Brasil [Internet]. Available at <http://inca.gov.br/estimativa/2014>.
- Inoue, K., Slaton, J.W., Eve, B.Y., Kim, S.J., Perrotte, P., Bar-eli, M., Radinsky, R. & Dinney, C.P.N. (2000) Interleukin 8 Expression Regulates Tumorigenicity and Metastasis in Androgen-independent Prostate Cancer. *Clinical cancer research*, **6**, 2104.
- Kamali-Sarvestani, E., Aliparasti, M.R. & Atefi, S. (2007) Association of interleukin-8 (IL-8 or CXCL8) -251T/A and CXCR2 +1208C/T gene polymorphisms with breast cancer. *Neoplasma*, **54**, 484.
- Kamali-Sarvestani, E., Nikseresht, A-R., Aliparasti, M-R. & Vessal, M. (2006) IL-8 (-251 A/T) and CXCR2 (+1208 C/T) gene polymorphisms and risk of multiple sclerosis in Iranian patients. *Neuroscience Letters*, **404**, 159.
- Lee, W-P., Tai, D-I., Lan, K-H., Li, AF-Y., Hsu, H-C., Lin, E-J., et al. (2005) The -251T allele of the interleukin-8 promoter is associated with increased risk of gastric carcinoma featuring diffuse-type histopathology in Chinese population. *Clinical cancer research*, **11**, 6431.
- Lee, Y.S., Choi, I., Ning, Y., Kim, N.Y., Khatchadourian, V., Yang, D., et al. (2012) Interleukin-8 and its receptor CXCR2 in the tumour microenvironment promote colon cancer growth, progression and metastasis. *British journal of cancer*, **106**, 1833.

- Li, A., Varney, M.L. & Singh, R.K. (2001) Expression of interleukin 8 and its receptors in human colon carcinoma cells with different metastatic potentials. *Clinical cancer research*, **7**, 3298.
- Lurje, G., Zhang, W., Schultheis, A.M., Yang, D., Groshen, S., Hendifar, A.E., et al. (2008) Polymorphisms in VEGF and IL-8 predict tumor recurrence in stage III colon cancer. *Annals of oncology*, **19**, 1734.
- Luster, A.D. (1998) Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *The New England journal of medicine*, **338**, 436.
- MacLennan, G.T., Eisenberg, R., Fleshman, R.L., Taylor, J.M., Fu, P., Resnick, M.I. & Gupta, S. (2006) The influence of chronic inflammation in prostatic carcinogenesis: a 5-year followup study. *The journal of urology*, **176**, 1012.
- Matsushima, K., Baldwin, E. & Mukaida, N. (1992) Interleukin-8 and MCAF: novel leukocyte recruitment and activating cytokines. *Chemical immunology*, **51**, 236.
- McCarron, S.L., Edwards, S., Evans, P.R., Gibbs, R., Dearnaley, D.P. & Dowe, A. (2002) Influence of Cytokine Gene Polymorphisms on the Development of Prostate Cancer. *Cancer research*, **62**, 3369.
- Mestas, J., Burdick, M.D., Reckamp, K., Pantuck, A., Figlin, R.A. & Strieter, R.M. (2005) The role of CXCR2/CXCR2 ligand biological axis in renal cell carcinoma. *Journal of immunology*, **175**, 5351.
- Michaud, D.S., Daugherty, S.E., Berndt, S.I., Platz, E.A., Yeager, M., Crawford, E.D., Hsing, A., Huang, W.Y. & Hayes, R.B. (2006) Genetic polymorphisms of interleukin-1B (IL-1B), IL-6, IL-8, and IL-10 and risk of prostate cancer. *Cancer research*, **66**, 4525.
- Miller, S.A., Dykes, D.D. & Polesky, H.F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*, **16**, 1215.
- Moore, B.B., Arenberg, D.A., Stoy, K., Morgan, T., Addison, C.L., Morris, S.B., et al. (1999) Distinct CXC chemokines mediate tumorigenicity of prostate cancer cells. *The American journal of pathology*, **154**, 1503.
- Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L. & O'Garra, A. (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology*, **19**, 683.
- Mukaida, N., Shiroo, M. & Matsushima, K. (1989) Genomic structure of the human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor IL-8. *Journal of immunology*, **143**, 1366.
- Murphy, C., McGurk, M., Pettigrew, J., Santinelli, A., Mazzucchelli, R., Johnston, P.G., Montironi, R. & Waugh, D.J.J. (2005) Nonapical and cytoplasmic expression of interleukin-8, CXCR1, and CXCR2 correlates with cell

proliferation and microvessel density in prostate cancer. *Clinical cancer research*, **11**, 4117.

- Nasr, H.B., Chahed, K., Mestiri, S., Bouaouina, N., Snoussi, K. & Chouchane, L. (2007) Association of IL-8 (-251)T/A polymorphism with susceptibility to and aggressiveness of nasopharyngeal carcinoma. *Human immunology*, **68**, 761.
- Ohyauchi, M., Imatani, A., Yonechi, M., Asano, N., Miura, A., Lijima, K., Koike, T., Sekine, H., Ohara, S. & Shimosegawa, T. (2005) The polymorphism interleukin 8 -251 A/T influences the susceptibility of Helicobacter pylori related gastric diseases in the Japanese population. *Gut*, **54**, 330.
- Renzoni, E., Lympny, P., Sestini, P., Pantelidis, P., Wells, A., Black, C., et al. (2000) Distribution of novel polymorphisms of the interleukin-8 and CXC receptor 1 and 2 genes in systemic sclerosis and cryptogenic fibrosing alveolitis. *Arthritis and rheumatism*, **43**, 1633.
- Savage, S.A., Abnet, C.C., Mark, S.D., Qiao, Y-L., Dong, Z-W., Dawsey, S.M., Taylor, P.R. & Chanock, S.J. (2004) Variants of the IL8 and IL8RB genes and risk for gastric cardia adenocarcinoma and esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer epidemiology biomarkers & prevention*, **13**, 2251.
- Siegel, R.L., Miller, K.D. & Jemal, A. (2015) Cancer Statistics, 2015. *CA: a cancer journal for clinicians*, **65**, 5.
- Snoussi, K., Mahfoudh, W., Bouaouina, N., Fekih, M., Khairi, H., Helal, A.N. & Chouchane, L. (2010). Combined effects of IL-8 and CXCR2 gene polymorphisms on breast cancer susceptibility and aggressiveness. *BMC Cancer*, **10**, 1.
- Sprenger, H., Lloyd, A.R., Lautens, L.L., Bonner, T.I. & Kelvin, D.J. (1994). Structure, genomic organization, and expression of the human interleukin-8 receptor B gene. *The journal of biological chemistry*, **269**, 11065.
- Stark, J.R., Perner, S., Stampfer, M.J., Sinnott, J.A., Finn, S., Eisenstein, A.S., et al. (2009). Gleason score and lethal prostate cancer: Does 3 + 4 = 4 + 3? *Journal of clinical oncology*, **27**, 3459.
- Stearns, M.E., Rhim, J. & Wang, M. (1999) Interleukin 10 (IL-10) inhibition of primary human prostate cell- induced angiogenesis: IL-10 stimulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and inhibition of matrix metalloproteinase (MMP)-2/MMP-9 secretion. *Clinical cancer research*, **5**, 189.
- Strieter, R.M., Belperio, J.A., Phillips, R.J. & Keane, M.P. (2004) CXC chemokines in angiogenesis of cancer. *Seminars in cancer biology*, **14**, 195.
- Strieter, R.M., Polverini, P.J., Kunkel, S.L., Arenberg, D.A., Burdick, M.D., Kasper, J., et al. (1995) The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *Journal of biological chemistry*, **270**, 27348.

- Sun, J.K., Uehara, H., Karashima, T., Mccarty, M., Shih, N. & Fidler, I.J. (2001) Expression of Interleukin-8 Correlates with Angiogenesis, Tumorigenicity, and Metastasis of Human Prostate Cancer Cells Implanted Orthotopically in Nude Mice. *Neoplasia*, **3**, 33.
- Taguchi, A., Ohmiya, N., Shirai, K., Mabuchi, N., Itoh, A., Hirooka, Y., Niwa, Y. & Goto, H. (2005) Interleukin-8 promoter polymorphism increases the risk of atrophic gastritis and gastric cancer in Japan. *Cancer epidemiology biomarkers & prevention*, **14**, 2487.
- Veltri, R.W., Miller, M.C., Zhao, G., Ng, A., Marley, G.M., Wright, G.L., Vessella, R.L. & Ralph, D. (1999) Interleukin-8 serum levels in patients with benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Urology*, **53**, 139.
- Wang, M-H., Helzlsouer, K.J., Smith, M.W., Hoffman-Bolton, J.A., Clipp, S.L., Grinberg, V., et al. (2009) Association of IL10 and other immune response- and obesity-related genes with prostate cancer in CLUE II. *The prostate*, **69**, 874.
- Wang, N., Zhou, R., Wang, C., Guo, X., Chen, Z., Yang, S. & Li, Y. (2012) -251 T/A polymorphism of the interleukin-8 gene and cancer risk: A HuGE review and meta-analysis based on 42 case-control studies. *Molecular biology reports*, **39**, 2831.
- Waugh, D.J.J. & Wilson, C. (2008) The interleukin-8 pathway in cancer. *Clinical cancer research*, **14**, 6735.
- Wente, M.N., Keane, M.P., Burdick, M.D., Friess, H., Büchler, M.W., Ceyhan, G.O., Reber, H.A., Strieter, R.M. & Hines, O.J. (2006) Blockade of the chemokine receptor CXCR2 inhibits pancreatic cancer cell-induced angiogenesis. *Cancer letters*, **241**, 221.
- Yan, L., Anderson, G.M., DeWitte, M. & Nakada, M.T. (2006) Therapeutic potential of cytokine and chemokine antagonists in cancer therapy. *European journal of cancer*, **42**, 793.
- Yang, H.P., Woodson, K., Taylor, P.R., Pietinen, P., Albanes, D., Virtamo, J. & Tangrea, J.A. (2006) Genetic variation in interleukin 8 and its receptor genes and its influence on the risk and prognosis of prostate cancer among Finnish men in a large cancer prevention trial. *European journal of cancer prevention*, **15**, 249.
- Zabaleta, J., Lin, H-Y., Sierra, R.A., Hall, M.C., Clark, P.E., Sartor, O.A., Hu, J.J. & Ochoa, A.C. (2008a) Interactions of cytokine gene polymorphisms in prostate cancer risk. *Carcinogenesis*, **29**, 573.
- Zabaleta, J., Schneider, B.G., Ryckman, K., Hooper, P.F., Camargo, M.C., Piazuelo, M.B., et al. (2008b) Ethnic differences in cytokine gene polymorphisms: Potential implications for cancer development. *Cancer immunology, immunotherapy*, **57**, 107.

Zabaleta, J., Su, L.J., Lin, H.Y., Sierra, R.A., Hall, M.C., Sartor, A.O., Clark, P.E., Hu, J.J. & Ochoa, A.C. (2009) Cytokine genetic polymorphisms and prostate cancer aggressiveness. *Carcinogenesis*, **30**, 1358.

## Tables

**Table 1. Allele and genotype distribution of the IL-8 and CXCR2 SNPs in healthy controls and PC patients**

	Healthy control		Prostate cancer		<i>P</i> -value*
	n	%	n	%	
<b>IL8 -251 T/A</b>					
T	192	51.89	195	55.71	0.34
A	178	48.11	155	44.29	0.30
<b>Genotypes</b>					
TT	55	29.73	54	30.86	0.32
TA	82	44.32	87	49.71	
AA	48	25.95	34	19.43	
<b>CXCR2 +1208 C/T</b>					
C	183	49.46	167	47.71	0.64
T	187	50.54	183	52.29	0.69
<b>Genotypes</b>					
CC	26	14.05	17	9.71	0.41
TC	131	70.81	133	76.00	
TT	28	15.14	25	14.29	

\**P*-values of alleles were calculated by Fisher's exact test and genotypes by chi-squared test.



**Table 2. Correlation between CXCR2 and IL-8 in healthy controls and PC patients**

	Healthy Control		Prostate cancer		<i>P</i> -value*
	n	%	n	%	
<b>CXCR2 CC</b>					
IL8 T+	26	50.00	15	44.12	0.75
IL8 A+	26	50.00	19	55.88	0.66
<b>IL8 TT</b>					
IL8 TA	12	46.16	5	29.41	0.50
IL8 AA	7	26.92	7	41.18	
<b>CXCR2 CT</b>					
IL8 T+	135	51.53	146	54.89	0.49
IL8 A+	127	48.47	120	45.11	0.49
<b>IL8 TT</b>					
IL8 TA	59	45.04	70	52.63	0.32
IL8 AA	34	25.95	25	18.80	
<b>CXCR2 TT</b>					
IL8 T+	31	55.36	34	68.00	0.26
IL8 A+	25	44.64	16	32.00	0.23
<b>IL8 TT</b>					
IL8 TA	11	39.29	12	48.00	0.26
IL8 AA	7	25.00	2	8.00	

\* Chi-square test or Fisher's exact test.

**Table 3. The IL-8 -251 T/A and CXCR2 +1208 C/T genotype distributions in healthy controls and in patients with PC**

Genotypes	Patients (n=175) n (%)	Controls (n=185) n (%)	Crude OR (95% CI)	<i>P</i> value <sup>a</sup>	Adjusted OR (95% CI) <sup>b</sup>	<i>P</i> -value
<b>IL-8 -251 T/A</b>						
TT	54 (30.90)	55 (29.70)	1			
TA	87 (49.70)	82 (44.30)	1.08 [0.67-1.75]	0.75	0.82 [0.48-1.39]	0.46
AA	34 (19.40)	48 (25.90)	0.72 [0.41-1.29]	0.27	0.65 [0.35-1.21]	0.17
Alleles						
T allele	195 (56.00)	192 (52.00)				
A allele	155 (44.00)	178 (48.00)	0.86 [0.64-1.15]	0.30	0.80 [0.58-1.09]	0.16
<b>CXCR2 +1208 C/T</b>						
CC	17 (9.70)	26 (14.10)	1			
TC	133 (76.00)	131 (70.80)	1.55 [0.81-3.00]	0.19	1.28 [0.64-2.56]	0.48
TT	25 (14.30)	28 (15.10)	1.37 [0.60-3.09]	0.45	1.07 [0.45-2.54]	0.88
Alleles						
C allele	167 (47.00)	183 (49.00)				
T allele	183 (53.00)	187 (51.00)	1.07 [0.80-1.44]	0.64	1.01 (0.74-1.38]	0.95

<sup>a</sup> *P* value determined by  $\chi^2$  test.<sup>b</sup> ORs were adjusted for age at diagnosis.

**Table 4. Analysis of the IL-8 -251 T/A polymorphism with clinicopathological parameters in PC patients**

Genotypes	Number of patients (%)		Crude OR (95% CI)	P value <sup>a</sup>	Adjusted OR (95% CI) <sup>b</sup>	P value
<b>PSA</b>	<b>&lt;10</b>	<b>≥10</b>				
TT	26 (29.20)	26 (34.20)	1			
TA	45 (50.60)	36 (47.40)	0.80 [0.40-1.60]	0.53	0.67 [0.32-1.39]	0.28
AA	18 (20.20)	14 (18.40)	0.78 [0.32-1.89]	0.58	0.78 [0.32-1.91]	0.58
Alleles						
T allele	97 (54.50)	88 (57.90)				
A allele	81 (45.50)	64 (42.10)	0.87 [0.56-1.35]	0.54	0.85 [0.55-1.33]	0.49
<b>Gleason score</b>	<b>&lt;7</b>	<b>≥7</b>				
TT	25 (30.10)	29 (31.50)	1			
TA	44 (53.00)	43 (46.70)	0.84 [0.43-1.66]	0.62	0.75 [0.37-1.51]	0.42
AA	14 (16.90)	20 (21.70)	1.23 [0.52-2.93]	0.64	1.24 [0.51-2.99]	0.63
Alleles						
T allele	94 (56.60)	101 (54.90)				
A allele	72 (43.40)	83 (45.10)	1.07 [0.70-1.64]	0.74	1.07 [0.70-1.63]	0.77
<b>Clinical stage</b>	<b>T1/T2</b>	<b>T3/T4</b>				
TT	39 (29.30)	13 (43.30)	1			
TA	68 (51.10)	10 (33.30)	0.44 [0.18-1.10]	0.08	0.42 [0.17-1.07]	0.07
AA	26 (19.50)	7 (23.30)	0.80 [0.28-2.30]	0.69	0.81 [0.28-2.30]	0.69
Alleles						
T allele	146 (54.90)	36 (60.00)				
A allele	120 (45.10)	24 (40.00)	0.81 [0.46-1.44]	0.47	0.81 [0.46-1.43]	0.47
<b>N1/M1</b>	<b>Negative</b>	<b>Positive</b>				
TT	47 (31.10)	5 (41.70)	1			
TA	75 (49.70)	3 (25.00)	0.38 [0.09-1.65]	0.19	0.31 [0.07-1.40]	0.13
AA	29 (19.20)	4 (33.30)	1.30 [0.32-5.23]	0.72	1.44 [0.34-6.06]	0.62
Alleles						
T allele	169 (56.00)	13 (54.20)				
A allele	133 (44.00)	11 (45.80)	1.08 [0.47-2.48]	0.87	1.09 [0.47-2.54]	0.84

<sup>a</sup> P value determined by  $\chi^2$  test.<sup>b</sup> ORs were adjusted for age at diagnosis.

TT genotype taken as a hazard ratio of unity, and all data for the other genotypes were calculated against this.

**Table 5. Analysis of the CXCR2 +1208 C/T polymorphism with clinicopathological parameters in PC patients**

Genotypes	Number of patients (%)		Crude OR (95% CI)	P value <sup>a</sup>	Adjusted OR (95% CI) <sup>b</sup>	P value
<b>PSA</b>	<b>&lt;10</b>	<b>≥10</b>				
CC	8 (9.00)	8 (10.50)	1			
CT	70 (78.70)	55 (72.40)	0.79 [0.28-2.23]	0.65	0.68 [0.24-1.98]	0.48
TT	11 (12.40)	13 (17.10)	1.18 [0.33-4.20]	0.80	0.98 [0.27-3.57]	0.97
Alleles						
C allele	86 (48.30)	71 (46.70)				
T allele	92 (51.70)	81 (53.30)	1.07 [0.69-1.65]	0.77	1.02 [0.66-1.59]	0.93
<b>Gleason score</b>	<b>&lt;7</b>	<b>≥7</b>				
CC	9 (10.80)	8 (8.70)	1			
CT	64 (77.10)	69 (75.00)	1.21 [0.44-3.33]	0.71	1.11 [0.40-3.08]	0.85
TT	10 (12.00)	15 (16.30)	1.69 [0.49-5.85]	0.41	1.48 [0.42-5.22]	0.54
Alleles						
C allele	82 (49.40)	85 (46.20)				
T allele	84 (50.60)	99 (53.80)	1.14 [0.75-1.73]	0.55	1.10 [0.72-1.69]	0.65
<b>Clinical stage</b>	<b>T1/T2</b>	<b>T3/T4</b>				
CC	10 (7.50)	6 (20.00)	1			
CT	107 (80.50)	17 (56.70)	0.27 [0.09-0.82]	0.02	0.25 [0.08-0.80]	0.02
TT	16 (12.00)	7 (23.30)	0.73 [0.19-2.80]	0.65	0.69 [0.17-2.70]	0.59
Alleles						
C allele	127 (47.70)	29 (48.30)				
T allele	139 (52.30)	31 (51.70)	0.98 [0.56-1.71]	0.93	0.97 [0.55-1.70]	0.91
<b>N1/M1</b>	<b>Negative</b>	<b>Positive</b>				
CC	14 (9.30)	2 (16.70)	1			
CT	115 (76.20)	9 (75.00)	0.55 [0.11-2.80]	0.47	0.39 [0.07-2.14]	0.28
TT	22 (14.60)	1 (8.30)	0.32 [0.03-3.85]	0.37	0.21 [0.02-2.67]	0.23
Alleles						
C allele	143 (47.40)	13 (54.20)				
T allele	159 (52.60)	11 (45.80)	0.76 [0.33-1.75]	0.52	0.70 [0.30-1.63]	0.41

<sup>a</sup> P value determined by  $\chi^2$  test.<sup>b</sup> ORs were adjusted for age at diagnosis.

CC genotype taken as a hazard ratio of unity, and all data for the other genotypes were calculated against this.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O CaP é um dos tumores malignos mais diagnosticados em homens e, apesar da alta incidência desta doença, a sua etiologia ainda não é bem esclarecida. Os únicos fatores de risco comprovados até o momento são o aumento da idade, etnia e história familiar de CaP. Pesquisadores têm investigado numerosas variantes genéticas que podem influenciar na biossíntese de andrógenos, no metabolismo de carcinógenos, no reparo de DNA e nas vias de inflamação crônica, mas os resultados permanecem inconclusivos (2).

Polimorfismos nos genes de citocinas têm sido associados com aumento da inflamação e, possivelmente, maior risco de CaP (112). Neste contexto, evidências crescentes têm demonstrado a influência de polimorfismos dos genes da IL-8 e CXCR2 no desenvolvimento e a progressão de tumores sólidos, através de mecanismos que envolvem a modulação da resposta imune e estímulo à angiogênese (34-38,40).

Este estudo mostrou uma associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo +1208 C/T do gene CXCR2 e CaP, sugerindo que este receptor de quimiocina desempenhe um papel na patogênese dos tumores prostáticos. O genótipo heterozigoto CT do gene CXCR2 +1208 foi significativamente menos frequente em pacientes com estágio avançado de CaP. Esta observação não havia sido anteriormente documentada na literatura. No entanto, estudos adicionais em diferentes populações e etnias, deverão ser realizados para confirmar estes achados.

Portanto, a descoberta e definição do papel funcional dos genes de citocinas, na regulação da resposta imune inata e adaptativa, pode revelar novos marcadores de diagnóstico, prognóstico e potenciais alvos terapêuticos, e poderá ter implicações futuras em estratégias de prevenção e intervenção precoce do câncer.

## ANEXOS

### A – PROTOCOLO DE PESQUISA DE COLETA DE DADOS

#### PROJETO 11-0534

Número da amostra \_\_\_\_\_ Prontuário \_\_\_\_\_ Escolaridade \_\_\_\_\_  
 Iniciais do Paciente \_\_\_\_\_ Etnia \_\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_\_ DN \_\_\_\_\_

#### DIAGNÓSTICO

Data \_\_\_\_\_ PSA \_\_\_\_\_ TR \_\_\_\_\_ Escore de Gleason \_\_\_\_\_

#### SINTOMAS

- ( ) Urinários ou prostatismo  
 ( ) Disfunção sexual  
 ( ) Emagrecimento, dor óssea, sangramento ou trombose  
 ( ) Outros \_\_\_\_\_

#### HISTÓRIA MÉDICA PREGRESSA

- ( ) Tabagismo ( ) Etilismo ( ) Obesidade  
 ( ) História Familiar de CaP Grau de parentesco \_\_\_\_\_  
 ( ) HAS ( ) DM Outras comorbidades \_\_\_\_\_

#### ESTADIAMENTO

Tamanho do tumor \_\_\_\_\_  
 Acometimento de linfonodos \_\_\_\_\_  
 Presença de metástases \_\_\_\_\_

#### RISCO

- ( ) Baixo ( ) Intermediário ( ) Alto

#### TRATAMENTO

( ) Prostatectomia radical Data \_\_\_\_\_  
 ( ) Radioterapia Data \_\_\_\_\_  
 ( ) Orquiectomia Data \_\_\_\_\_ **MEDICAMENTOS**  
 ( ) Bloqueio hormonal Data \_\_\_\_\_  
 ( ) Quimioterapia Data \_\_\_\_\_  
 ( ) Bifosfonados Data \_\_\_\_\_  
 PSA pré-tratamento \_\_\_\_\_ Nadir PSA \_\_\_\_\_

#### RECIDIVA

( ) Bioquímica Data \_\_\_\_\_ PSA \_\_\_\_\_  
 ( ) Sistêmica Data \_\_\_\_\_ Localização \_\_\_\_\_

#### CONDUTA

\_\_\_\_\_

#### OBSERVAÇÕES

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

## B – TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO (CASOS)

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Prezado Senhor,

Este **Termo de Consentimento** pode conter palavras que você não entenda. Peça ao pesquisador que explique as palavras ou informações não compreendidas completamente. O Sr. possui uma neoplasia prostática também denominada Câncer de Próstata. As causas que levam ao aparecimento dessa doença ainda não foram totalmente elucidadas, entretanto alguns fatores de risco já foram identificados, tais como fatores genéticos, raciais e dietéticos. Assim, estamos convidando o Sr. a nos ajudar a compreender os problemas genéticos através do estudo que estamos realizando. O Câncer de Próstata é o sexto tipo de Câncer mais comum no mundo e é o mais prevalente em homens. Alguns fatores como idade, etnia, predisposição familiar, dieta altamente calórica, hormônios masculinos são fatores de risco para o desenvolvimento desta doença. O objetivo do trabalho é estudar os genes CXCR2 e IL-8 em pacientes com Câncer de Próstata.

Estamos solicitando a sua permissão para análise do seu DNA armazenado. Não será necessário fazermos uma coleta de sangue, somente sua autorização para utilização do seu sangue armazenado. Com esse sangue, iremos fazer estudos do DNA (são substâncias que contém todas as informações sobre a formação do corpo humano). Iremos comparar os genes de pacientes com Câncer de Próstata e indivíduos sadios.

Como os assuntos em medicina evoluem muito rapidamente, o material armazenado para esta pesquisa poderá ser analisado para outros fatores que possam vir a ser considerados relevantes dentro desta linha de pesquisa, após nova avaliação do comitê de ética. O paciente tem a total liberdade de não querer entrar no estudo, ou de sair do mesmo, quando quiser, sem que isso traga prejuízos no seu cuidado. Não há formas de ressarcimento ou de indenização decorrentes da participação na pesquisa. Você tem o direito de solicitar informações e esclarecer dúvidas sobre a pesquisa que venha a participar. A sua identidade será mantida em sigilo. Os resultados do estudo serão sempre apresentados como o retrato de um grupo e não de uma pessoa. A sua participação neste estudo é muito importante e voluntária. Caso haja a necessidade de maiores explicações, O Sr. poderá telefonar para 3359-8020 (Serviço de Imunologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre). Contato: Pesquisadora executora: Mariana Jobim

Esse documento se encontra em duas vias de igual conteúdo e valor.

Eu, \_\_\_\_\_, (responsável legal) abaixo assinado(a), ciente dos termos acima descritos, permito a coleta do sangue para a pesquisa: **“Estudo de polimorfismos dos genes CXCR2 e IL-8 em pacientes com Câncer de Próstata e Grupo Controle”**.

---

## C – TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO (CONTROLES)

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Prezado Senhor,

Este **Termo de Consentimento** pode conter palavras que você não entenda. Peça ao pesquisador que explique as palavras ou informações não compreendidas completamente.

As causas que levam ao aparecimento do Câncer de Próstata ainda não foram totalmente elucidadas, entretanto alguns fatores de risco já foram identificados, tais como fatores genéticos, raciais e dietéticos. Assim, estamos convidando o Sr. a nos ajudar a compreender os problemas genéticos através do estudo que estamos realizando.

O Câncer de Próstata é o sexto tipo de Câncer mais comum no mundo e é o mais prevalente em homens. Alguns fatores como idade, etnia, predisposição familiar, dieta altamente calórica, hormônios masculinos são fatores de risco para o desenvolvimento desta doença. O objetivo do trabalho é estudar os genes CXCR2 e IL-8 em pacientes com Câncer de Próstata e em indivíduos saudáveis.

Estamos solicitando a sua permissão para análise do seu DNA armazenado. Não será necessário fazermos uma coleta de sangue, somente sua autorização para utilização do seu sangue armazenado. Com esse sangue, iremos fazer estudos do DNA (são substâncias que contém todas as informações sobre a formação do corpo humano). Iremos comparar os genes de pacientes com Câncer de Próstata e indivíduos sadios (como o Sr).

Como os assuntos em medicina evoluem muito rapidamente, o material armazenado para esta pesquisa poderá ser analisado para outros fatores que possam vir a ser considerados relevantes dentro desta linha de pesquisa, após nova avaliação do comitê de ética. O paciente tem a total liberdade de não querer entrar no estudo, ou de sair do mesmo, quando quiser, sem que isso traga prejuízos no seu cuidado. Não há formas de ressarcimento ou de indenização decorrentes da participação na pesquisa. Você tem o direito de solicitar informações e esclarecer dúvidas sobre a pesquisa que venha a participar. A sua identidade será mantida em sigilo. Os resultados do estudo serão sempre apresentados como o retrato de um grupo e não de uma pessoa. A sua participação neste estudo é muito importante e voluntária. Caso haja a necessidade de maiores explicações, O Sr. poderá telefonar para 3359-8020 (Serviço de Imunologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre). Contato: Pesquisadora executora: Mariana Jobim

Esse documento se encontra em duas vias de igual conteúdo e valor.

Eu, \_\_\_\_\_, (responsável legal) abaixo assinado(a), ciente dos termos acima descritos, permito a coleta do sangue para a pesquisa: **“Estudo de polimorfismos dos genes CXCR2 e IL-8 em pacientes com Câncer de Próstata e Grupo Controle”**.

---