

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**EXPRESSÃO DO RECEPTOR DO PEPTÍDEO
LIBERADOR DA GASTRINA EM CÂNCER DE
COLO DE ÚTERO**

Daniela Baumann Cornélio

Orientador: Dr. Rafael Roesler

Porto Alegre, Julho de 2007.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**EXPRESSÃO DO RECEPTOR DO PEPTÍDEO LIBERADOR DA
GASTRINA EM CÂNCER DE COLO DE ÚTERO**

Daniela Baumann Cornélio

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Dr. Rafael Roesler

Porto Alegre, Julho de 2007.

Este trabalho foi desenvolvido no Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico número 400839/2005-9, pela Fundação South American Office for Anticancer Drug Development e pelo FIPE do Hospital de Clínicas de Porto Alegre projeto número 05397.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Rafael Roesler pelos ensinamentos, confiança e amizade.

À minha comissão de acompanhamento, Dr. Guido Lenz, pelas críticas e sugestões, e em especial o Dr. Gilberto Schwartzmann pelo grande incentivo, apoio e oportunidades geradas durante este trabalho.

À Dra. Luise Meurer por todo o auxílio na técnica da imunohistoquímica e na análise dos resultados.

À banca examinadora pela disposição de avaliar este trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Pesquisas em Câncer pela imensa ajuda nos mais variados momentos, em especial à Caroline Brunetto de Farias, grande amiga que conquistei neste período. Agradeço a todos, não só pelo companheirismo científico, mas também pelos ótimos momentos nas festas do nosso grupo.

À Sílvia Centeno e Luciano Saucedo pelo tratamento amável que recebi neste período.

À minha amiga Ana, pelo incondicional apoio em todos os momentos.

Aos meus irmãos, meu pai e principalmente minha mãe, pelo exemplo de força e por ter me ajudado a ser o que sou.

Ao meu marido Flávio, pelo amor, companheirismo e por me ajudar a concretizar este sonho.

Aos meus amados filhos Pedro e Vitória que são o maior presente que já recebi.
Dedico este trabalho a vocês.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	IV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	VIII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	XI
1 - INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Peptídeo Liberador da Gastrina.....	01
1.1.1 Descoberta do GRP.....	01
1.1.2 Receptor Preferencial do GRP, GRPR.....	02
1.1.3 Funções do GRP.....	04
1.1.4 GRP, GRPR e Câncer.....	05
1.1.5 Análogos e Antagonistas de GRPR.....	06
1.1.6 Expressão de GRPR em tumores.....	08
1.2 Câncer de Colo Uterino.....	10
1.2.1 Incidência.....	10
1.2.2 Patologia, História Natural e Prognóstico.....	11
1.2.3 Papel do HPV.....	13
2 – OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1 Seleção da amostra.....	16
3.2 Técnica da Imunohistoquímica.....	16

3.3	Quantificação dos resultados.....	17
3.4	Análise estatística.....	17
4	– RESULTADOS.....	18
5	– DISCUSSÃO.....	22
6	– PERSPECTIVAS.....	28
7	– REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
8	-ANEXOS.....	42
8.1	<i>Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy.....</i>	<i>42</i>
8.2	Curriculum Vitae.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

BB3R	receptor órfão da bombesina subtipo 3
BB4R	receptor de bombesina subtipo 4
BLP	peptídeo semelhante à bombesina
COX2	cicloxigenase 2
DNA	ácido desoxirribonucléico
EGF	fator de crescimento epidérmico
EGFR	receptor do fator de crescimento epidérmico
FAK	quinase de adesão focal
GRP	peptídeo liberador da gastrina
GRPR	receptor do peptídeo liberador da gastrina
GTPase	enzima que hidrolisa guanosina trifosfato
HPV	papilomavírus humano
IGF	fator de crescimento insulínico
MAPK	proteína quinase mitógeno-ativada
NIC	neoplasia intraepitelial cervical
NMBR	receptor de neuromedina B
PGE2	prostaglandina E2
PKC	proteína quinase C
PLA2	fosfolipase A2
RNAm	ácido ribonucléico mensageiro
Rt-PCR	reação em cadeia da polimerase em tempo real
VGF	fator de crescimento vascular

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Seqüências de bombesina e GRP.

Figura 2: Estrutura molecular de GRPR.

Figura 3: Modelo de secreção mediada por GRPR.

Figura 4: Vias de sinalização ativadas pelo GRPR.

Figura 5: Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100.000 mulheres estimada para o ano de 2006, segundo a Unidade da Federação.

Figura 6: Incidências idade-específicas de câncer de colo de útero invasor no Brasil e Reino Unido.

Figura 7: Progressão do câncer de colo uterino.

Figura 8: Imunoexpressão de GRPR em NIC I: coloração fortemente positiva com ceratose adjacente negativa.

Figura 9: Imunoexpressão forte e difusa em NIC III contrastando com endocérvice negativa.

Figura 10: Expressão geral de GRPR no cancer de colo de útero e tecidos adjacentes normais.

Tabela 1: Expressão de GRPR em tecidos neoplásicos humanos.

Tabela 2: Incidência, distribuição e densidade do GRPR nas lesões neoplásicas do colo do útero e tecidos adjacentes.

RESUMO

O peptídeo liberador da gastrina (GRP) está estabelecido como um fator de crescimento no câncer. Os fatores de crescimento desempenham um papel importante na proliferação das células neoplásicas e progressão do câncer, estando envolvidos na invasão local, angiogênese, metástases à distância e apoptose. A superexpressão de receptores para fatores de crescimento em células malignas é geralmente um marcador de agressividade e está associada a um prognóstico reservado. Na busca por novas estratégias no tratamento do câncer, muitos esforços têm sido feitos para se identificar quais são esses receptores e desenvolver terapias dirigidas contra eles, explorando a especificidade molecular.

O GRPR já foi identificado em diversas neoplasias humanas, mas até o presente momento não havia nenhum dado na literatura quanto à sua expressão no câncer de colo de útero. Considerando que esta neoplasia é uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo, objetivamos avaliar neste estudo o perfil de expressão de GRPR em lesões pré-invasivas e invasivas de colo de útero.

Através da técnica da imunistoquímica, lesões cervicais e tecidos não neoplásicos circundantes de 88 mulheres foram selecionados do arquivo de patologia do HCPA e avaliados quanto à expressão de GRPR. O receptor foi detectado em 99% das amostras tumorais, na maioria das vezes exibindo padrão de coloração difuso; moderado ou forte. Os GRPRs foram menos intensamente expressos em ectocervices adjacentes às lesões e praticamente não foram detectados nas endocérvices. Não foram encontradas diferenças na expressão de GRPR entre as formas pré-invasivas e invasivas de neoplasias cervicais.

Este estudo demonstrou pela primeira vez a expressão aberrante de GRPRs em neoplasias cervicais humanas. A presença de receptores nos tecidos não neoplásicos circundantes pode ser associada a um papel fisiológico do GRP na renovação epitelial ou representar um processo carcinogênico incipiente.

ABSTRACT

Gastrin-releasing peptide (GRP) is already established as a growth factor in cancer. Growth factors are involved in cell proliferation and cancer progression, enhancing local invasion, angiogenesis, distant metastasis and apoptosis. Furthermore, the overexpression of growth factor receptors on the cell surface of malignant cells might be associated with a more aggressive behavior and a poor prognosis. Searching for new strategies for cancer treatment, much effort has been done to identify these receptors and to develop targeted therapies exploring their molecular specificity.

The GRPR has been identified in many human malignancies, but to date, no information regarding its expression in cervical cancer was found in the literature. Considering that cervical cancer is a very important cause of morbidity and mortality worldwide, we aimed to evaluate the GRPR expression profile in preinvasive and invasive cervical lesions.

Cervical lesions and surrounding nonneoplastic tissues from 88 women were selected from the pathology archive of HCPA and evaluated through immunohistochemistry. GRPR was detected in 99% of the neoplastic lesions, mostly exhibiting a diffuse strong staining. The receptors were less intensely expressed in ectocervix surrounding the lesions and were seldom detected in the endocervix. No correlation between GRPR expression and preinvasive and invasive neoplasms was found.

This study demonstrated for the first time the aberrant GRPR expression in human cervical cancer. The presence of receptors in nonneoplastic surrounding tissues can be either associated with a physiological role of GRP on epithelium renewal or be related to an incipient carcinogenic processes.

I - INTRODUÇÃO

1.1 Peptídeo Liberador da Gastrina (GRP)

1.1.1 Descoberta do GRP

O tetradecapeptídeo bombesina foi primeiramente isolado e caracterizado a partir da pele do anfíbio *Bombina bombina* (ANASTASI *et al.*, 1971). Posteriormente, peptídeos semelhantes à bombesina (BLPs) foram identificados em mamíferos, sendo os maiores níveis observados em células pulmonares neuroendócrinas (JOHNSON *et al.*, 1982). O principal BLP foi chamado de peptídeo liberador da gastrina devido à sua primeira atividade conhecida de indução da secreção de gastrina a partir das células G do antro gástrico. O GRP possui 27 aminoácidos e compartilha com a bombesina uma seqüência altamente conservada de 7 aminoácidos C-terminal, o que é essencial para a imunogenicidade e para uma ligação de alta afinidade ao receptor preferencial do GRP (SUNDAY *et al.*, 1988) (Figura 1). Assim, GRP e bombesina apresentam essencialmente efeitos fisiológicos idênticos.

Bombesina

Pyr-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-**Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂**

GRP

Ala-Pro-Val-Ser-Val-Gly-Gly-Gly-Thr-Val-Leu-Ala-Lys-Met-

Tyr-Pro-Arg-Gly-Asn-His-**Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂**

Figura 1: Seqüências de bombesina e GRP. As porções C-terminais de bombesina e GRP, marcadas em negrito, são idênticas.

1.1.2 Receptor Preferencial do GRP, GRPR

Os receptores de GRP pertencem ao grupo de receptores acoplados à proteína G, considerada a maior família de moléculas de superfície celular envolvida na transmissão de sinais e que contribui com mais de 2% dos genes codificados pelo genoma humano (DORSAM & GUTKIND, 2007). Uma característica central deste grupo é a estrutura comum de sete domínios α -hélices transmembrana, sendo que a ligação à proteína G se dá através do domínio intracelular (Figura 2). De uma maneira geral, a natureza da cascata de sinalização gerada depende da especificidade de ligação de cada receptor à proteína G.

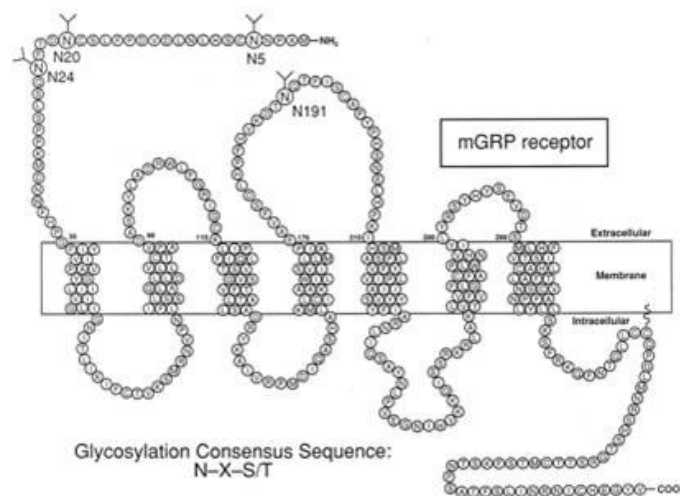


Figura 2: Estrutura molecular do GRPR (BENYA *et al.*, 2000).

Até o presente momento já foram descritos quatro subtipos de receptores para a família dos BLPs; o receptor preferencial do GRP, GRPR (SPINDEL *et al.*, 1990; BATTEY *et al.*, 1991), receptor de neuromedina B, NMBR (WADA *et al.*, 1991), receptor órfão da bombesina subtipo 3, BB3R (FATHI *et al.*, 1993) e receptor de bombesina subtipo 4, BB4R (NAGALLA *et al.*, 1995), este último limitado aos anfíbios. Estes receptores podem ser distinguidos com base na sua afinidade pelos agonistas e antagonistas. O GRPR possui alta afinidade por bombesina e GRP, enquanto

que praticamente não se liga à neuromedina B, outro conhecido membro dos BLPs (GILADI *et al.*, 1993).

Quando um agonista se liga ao GRPR, ocorre ativação da fosfolipase C e aumento das concentrações de inositol trifosfato, diacilglicerol e cálcio (HELLMICH *et al.*, 1999). A liberação de cálcio se dá inicialmente por uma liberação dos estoques intracelulares e é posteriormente sustentada pelo influxo deste cátion através da membrana celular (Figura 3).

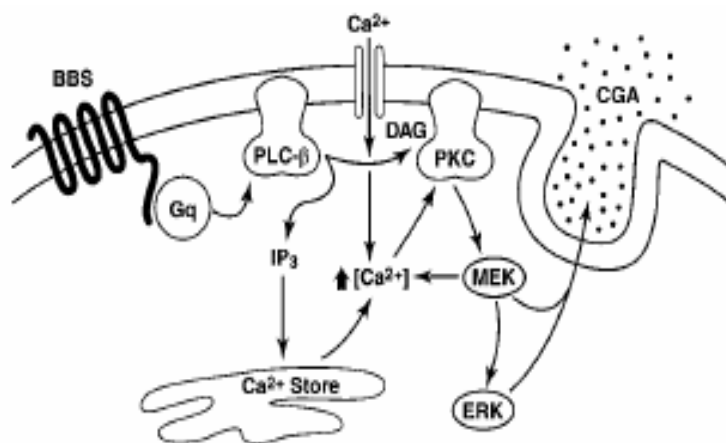


Figura 3: modelo de sinalização mediada por GRPR (HELLMICH *et al.*, 1999).

Entre as vias de sinalização celular ativadas pelos GRPRs já foram caracterizadas a da proteína quinase mitógeno-ativada (MAPK), proteína quinase C (PKC) e quinase de adesão focal (FAK) (APRIKIAN *et al.*, 1997). Além de promover crescimento e proliferação, estes receptores também estão envolvidos na migração celular e angiogênese. Eles estimulam a pequena GTPase Rho, que tem um papel central na migração celular através do estímulo da ROCK (MARINISSEN & GUTKIND, 2001) e ativam a fosfolipase A2 (PLA2) e cicloxigenase 2 (COX2), aumentando a produção de prostaglandina E2 (PGE2) (ROZENGURT *et al.*, 2002) (Figura 4).

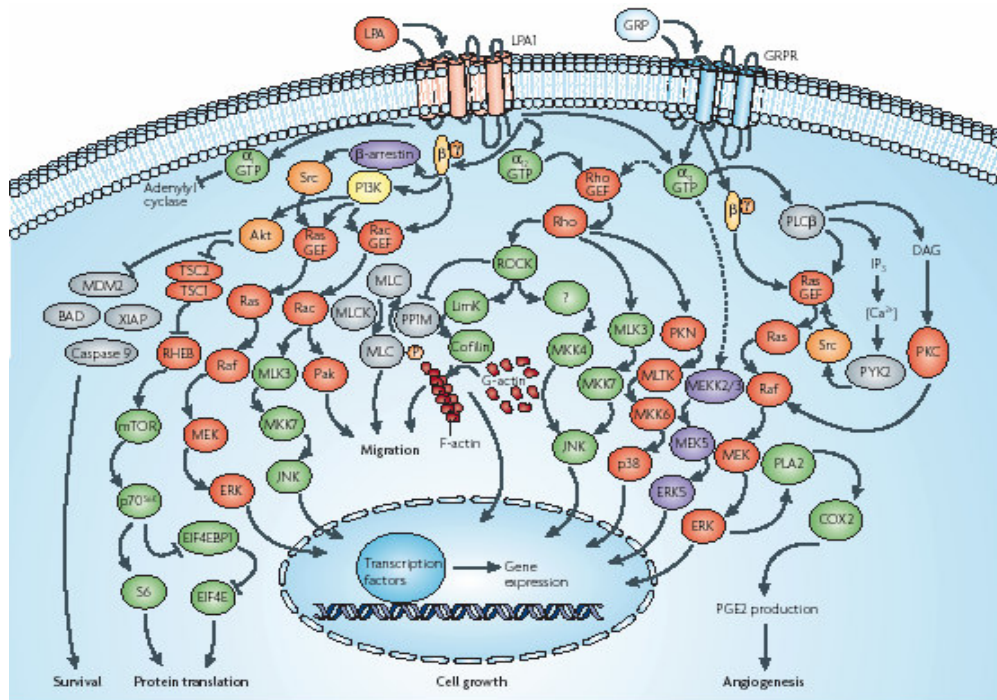


Figura 4: Vias de sinalização ativadas pelo GRPR (DORSAM & GUTKIND, 2007).

1.1.3 Funções do GRP

O GRP desempenha diversos papéis fisiológicos além do estímulo à secreção ácida gástrica. Os BLPs são responsáveis por promover a liberação de vários hormônios no trato gastrointestinal, incluindo gastrina, somatostatina e colecistoquinina, e de estimular a secreção de enzimas pancreáticas. Além disso, participam da contração da musculatura lisa em diversos tecidos e atuam como neurotransmissores no sistema nervoso central (BUNNET, 1994).

Entre os efeitos neurológicos dos BLPs já foram descritas alterações comportamentais, anorexia e melhora da consolidação da memória em modelos animais (ROESLER *et al.*, 2006a). Estes peptídeos podem estar envolvidos na patogênese de diversas desordens do sistema nervoso central, como a doença de Parkinson, a esquizofrenia e a doença de Alzheimer (ROESLER *et al.*, 2006b).

Os BLPs também parecem participar de processos imunológicos e inflamatórios. O GRP modula, estimulando ou inibindo, a função de linfócitos (MEDINA *et al.*, 1999), fagócitos (DE LA FUENTE *et al.*, 1991) e mastócitos, estando implicado na patologia de doenças pulmonares (SUBRAMANIAM *et al.*, 2003) e artrite reumatóide (GRIMSHOLM *et al.*, 2005). O uso de um antagonista seletivo de GRPR em um modelo de sepsis provou aumentar a sobrevivência de roedores, demonstrando um efeito protetor aos danos teciduais e atenuando a liberação de citocinas inflamatórias (DALPIZZOL *et al.*, 2006).

1.1.4 GRP, GRPR e Câncer

O GRP e a bombesina possuem efeitos mitogênicos já bem estabelecidos. Estes peptídeos estimulam o crescimento de tecidos normais, como pâncreas (PAREKH *et al.*, 1994), mucosa gastrointestinal (CHU *et al.*, 1995) e epitélio brônquico (WILLEY *et al.*, 1984). O primeiro estudo em neoplasias mostrou que o emprego de um anticorpo monoclonal dirigido ao GRP, impedindo a ligação ao seu receptor, inibiu o crescimento de câncer de pulmão de pequenas células *in vitro* e *in vivo* (CUTTITTA *et al.*, 1985). Desde então, muitos grupos de pesquisa passaram a investigar o papel do GRP no desenvolvimento e progressão do câncer. Através de estudos com linhagens celulares e modelos animais, o tratamento com bombesina/GRP promoveu proliferação em diversas neoplasias, incluindo próstata (BOLOGNA *et al.*, 1989), cólon (NARAYAN *et al.*, 1990), estômago (KIM *et al.*, 1996) e mama (BURNS *et al.*, 1999). A detecção simultânea de GRP e seu receptor nos tecidos, bem como os efeitos antiproliferativos dos anticorpos anti-GRP, levaram ao reconhecimento deste peptídeo como um fator de crescimento autócrino no câncer. Mais recentemente, demonstrou-se que o GRP também é capaz de estimular os receptores de forma parácrina (HEASLEY, 2001).

A ampla expressão de receptores de fatores de crescimento na superfície das células malignas reconhecidamente confere maior agressividade biológica aos tumores. Além de promover proliferação celular, os fatores de crescimento estão envolvidos em processos de invasão local, metastatização, angiogênese e apoptose (PERONA, 2006). Estes parâmetros também vêm sendo investigados nos estudos com GRPRs. Analisando neoplasias de cólon, alguns autores relacionaram invasão linfática e perda de diferenciação celular à maior expressão de GRPRs (SAURIN *et al.*, 1999). Similarmente, outros pesquisadores foram capazes de associar níveis superiores de GRPRs a tumores de ovário mais indiferenciados (SUN *et al.*, 2000a), bem como a neuroblastomas mais agressivos (KIM *et al.*, 2002). GUGGER & REUBI (1999) avaliaram tumores de mama metastáticos para linfonodos axilares e relataram 100% de expressão de GRPR nas metástases de tumores primariamente positivos para este receptor. Em estudo com carcinomas renais implantados em ratos, receptores GRP foram encontrados na microcirculação tumoral, enquanto que a neoangiogênese foi significativamente inibida com o emprego de um antagonista GRPR (HEUSER *et al.*, 2005).

1.1.5 Análogos e Antagonistas de GRPR

A estratégia de tratamentos dirigidos a receptores de fatores de crescimento progrediu significativamente na última década. Os resultados obtidos na prática clínica com terapias-alvo, a exemplo das terapias anti-EGFR (VOKES & CHU, 2006), vêm encorajando pesquisadores a desenvolver compostos capazes de interagir com estes receptores, através de biomarcadores para detecção e estadiamento de neoplasias, ou de análogos e antagonistas para tratamento das mesmas. Muitos estudos têm explorado o GRPR como alvo diagnóstico e terapêutico.

Na área de diagnóstico por imagem já foram desenvolvidos diversos conjugados com análogos de GRP. Um radionuclídeo bastante utilizado é o tecnécio, que em combinação com análogos de bombesina demonstrou alta afinidade por GRPRs (BAIDOO *et al.*, 1998), com elevada absorção por tumores gastro-entero-pancreáticos, mamários, pulmonares e prostáticos (VARVARIGOU, *et al.*, 2004). Em estudo fase I realizado em pacientes com câncer de próstata, o uso de um conjugado de bombesina com tecnécio não provocou efeitos colaterais relevantes e os tumores foram bem visualizados já nos primeiros minutos de imagens tomográficas e planas. Com base nestes resultados, foi proposto que este radiofármaco poderia ser utilizado como marcador em cirurgias guiadas por radioisótopos (DE VICENTIS *et al.*, 2002). Além do tecnécio, muitos outros radionuclídeos estão sendo combinados com análogos de GRP, como o gálio, índio, lutécio e rênio (revisado por SMITH *et al.*, 2005). Outro composto que está sendo avaliado em estudo fase I é o conjugado de bombesina e ¹⁷⁷Lu-Amba, como método diagnóstico e radioterapia sistêmica, após excelente desempenho em estudos pré-clínicos (LANTRY *et al.*, 2006). Com finalidades terapêuticas, análogos de bombesina têm sido combinados a diversos agentes citotóxicos, atuando como veículos carreadores de drogas. Ainda em fase experimental, muitos compostos têm se mostrado eficientes na inibição do crescimento de diversos tumores *in vitro* e *in vivo* (revisado por SCHALLY & NAGY, 1999).

A abordagem com anticorpos monoclonais também já está sendo testada em estudos clínicos. O anticorpo 2A11, que se liga com alta afinidade ao GRP, já se encontra em estudo fase II para o tratamento de pacientes com câncer de pulmão, após demonstrar perfil de toxicidade aceitável (CHAUDHRY *et al.*, 1999).

Outra classe de drogas utilizadas em terapias-alvo são os antagonistas. Idealmente, estes compostos devem possuir elevada afinidade pelos receptores para

bloquear a cascata de sinalização celular que seria desencadeada pelo acoplamento do ligante. Na última década foram desenvolvidos diversos antagonistas GRPR com capacidade de inibir o crescimento de tumores (AZAY *et al.*, 1996; MARQUEZ *et al.*, 2000; MOODY *et al.*, 2003). Um composto que tem demonstrado notável atividade antitumoral é o antagonista RC-3095, já testado em diversas neoplasias. Este agente já provou ser ativo contra câncer de mama (SZEPESHAZI *et al.*, 1997; MIYAZAKI *et al.*, 1998), pulmão (KOPPAN *et al.*, 1998), ovário (CHATZISTAMOU *et al.*, 2000), próstata (STANGELBERGER *et al.*, 2005), glioblastomas (KIARIS *et al.*, 1999), entre outros. Seu efeito parece interferir com importantes vias de sinalização como a do EGF e IGF (PLONOWSKI *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007). Em nosso centro, o RC-3095 está sendo avaliado em linhagens celulares de tumores e modelos animais, bem como em estudos clínicos. Recentemente foi realizado um estudo fase I com vinte e cinco pacientes portadores de neoplasias sólidas avançadas, em que este antagonista GRPR demonstrou perfil de toxicidade favorável, após aplicações subcutâneas diárias. Neste mesmo ensaio, uma única dose de RC-3095 administrada a um paciente hipergastrinêmico, portador da Síndrome de Zollinger-Ellison, produziu decréscimo superior a 50% nos níveis plasmáticos de gastrina (SCHWARTSMANN *et al.*, 2006).

1.1.6 Expressão de GRPR em Tumores

A caracterização do perfil de expressão dos receptores de fatores de crescimento nos processos neoplásicos é fundamental para que se identifiquem aqueles tumores passíveis de serem diagnosticados ou tratados com abordagens mais seletivas. A expressão aberrante de GRPRs já está documentada em diversas neoplasias humanas através de diferentes técnicas de ligação ao receptor, imunohistoquímica, ou rt-PCR,

provando ser mais ampla no câncer em comparação aos tecidos normais (CORNELIO *et al.*, 2007). A tabela 1 sumariza os tipos tumorais já estudados até o presente momento. Em certos tumores, a taxa de expressão do GRPR chegou a ser 100%, incluindo próstata (BARTHOLDI *et al.*, 1998; MARKWALDER & REUBI, 1999), cólon (CHAVE *et al.*, 2000), rim (PANSKI *et al.*, 2000), neuroblastoma (SEBESTA *et al.*, 2001), cabeça e pescoço (LANGO *et al.*, 2002) e gastrinoma (REUBI *et al.*, 2002). Entre as neoplasias ginecológicas, já foram detectados GRPRs em carcinomas de ovário (SUN *et al.*, 2000a) e de corpo uterino (FLEISHMANN *et al.*, 2005), porém não existem dados referentes à expressão deste receptor em neoplasias de colo uterino até o presente momento.

Type of cancer	No. cases	No. positive	%	Method
Prostate	12	12	100	PCR
	30	30	100	Binding
	80	50	63	Binding
	22	20	91	PCR
	12	12	100	Binding
Gastrinoma	5	5	100	Binding
Breast	100	33	33	Binding
	71	44	62	Binding
	57	41	72	Binding
Ovarian	22	17	77	PCR
Pancreatic	12	2	17	Binding
	26	2	8	PCR
	29	0	0	Binding
Colon	21	5	24	Binding
	29	27	93	PCR
	50	38	76	IH
	23	23	100	PCR
Renal	4	4	100	PCR
	16	6	35	Binding
	18	13	72	PCR
Lung (SCLC)	7	2	29	PCR
	9	3	33	Binding
Head and Neck	25	25	100	PCR
Neuroblastoma	33	24	73	IH
	19	19	100	PCR
Esophageal	12	10	83	PCR
GI carcinoid	26	22	85	IH
Gastric	23	12	50	Binding
	20	8	40	PCR
Uterine	29	11	38	Binding

Tabela 1: expressão de GRPR em tecidos neoplásicos humanos (CORNELIO *et al.*, 2007).

1.2 Câncer de Colo Uterino

1.2.1 Incidência

O câncer de colo uterino é a segunda principal causa de morte em mulheres no mundo, constituindo um importante problema de saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento (JEMAL *et al.*, 2003). No Brasil, o câncer de colo de útero é considerado o terceiro mais comum entre as mulheres, principalmente aquelas com idades entre 40 e 60 anos, sendo superado apenas pelo câncer de pele e mama. As estimativas de incidência para 2006 eram de 19.260 novos casos (INCA, 2007). Entre os estados brasileiros, considera-se que o Rio Grande do Sul contribua com uma parcela significativa deste número, com 30,9 casos estimados para cada 100.000 mulheres (Figura 5).

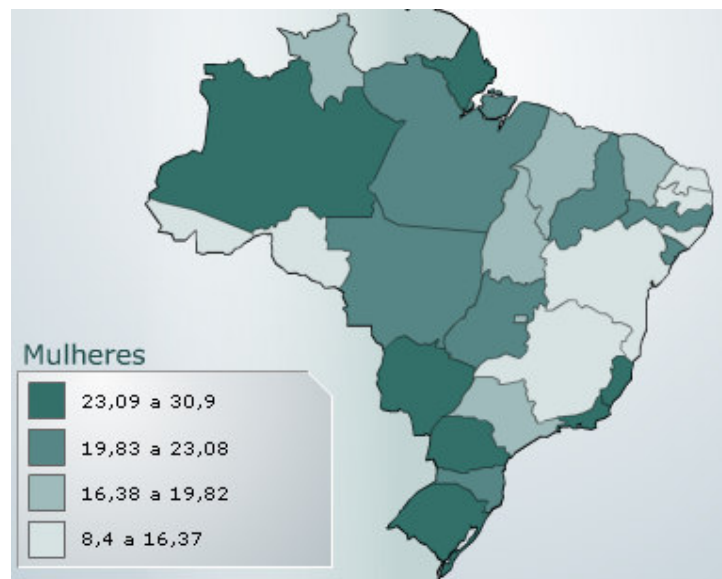


Figura 5: Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100.000 mulheres estimada para o ano de 2006, segundo a Unidade da Federação (INCA, 2007).

Quando diagnosticado nas fases iniciais, o câncer de colo de útero pode ter 100% de cura. Nas últimas décadas houve uma sensível redução na mortalidade e

incidência nos países com programas bem estabelecidos de rastreamento, especialmente através do exame Papanicolau (SHARMA & MENON, 2006). O impacto do rastreamento na progressão à doença invasiva pode ser verificado pelas diferenças nas incidências idade-específicas entre países desenvolvidos e em desenvolvimento. Comparando-se dados do Reino Unido e Brasil, por exemplo, observa-se que as taxas de incidência entre mulheres jovens são semelhantes, sugerindo níveis similares de exposição aos fatores de risco, enquanto que divergem rapidamente nas mulheres mais velhas, provavelmente refletindo as diferenças na disponibilidade de rastreamento de massa entre os dois países (BOSH & SANJOSE, 2003) (Figura 6).

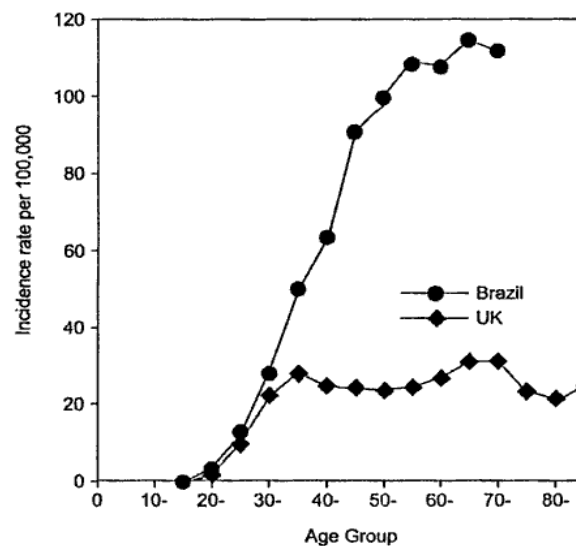


Figura 6: Incidências idade-específicas de câncer de colo de útero invasor no Brasil e Reino Unido (BOSH & SANJOSE, 2003).

1.2.2 Patologia, História Natural e Prognóstico

Cerca de 80% das neoplasias cervicais são carcinomas epidermóides, 20% são adenocarcinomas, enquanto que os sarcomas são raros (SMITH *et al.*, 2000). A história

natural do câncer de colo uterino já está bem entendida. De uma maneira geral, as lesões iniciam na junção escamo-colunar, entre o epitélio colunar da endocérvice e o epitélio escamoso da ectocérvice, e progridem lentamente de displasia a carcinoma in situ a câncer invasor. Uma pequena percentagem de lesões evolui em um período de tempo substancialmente mais curto. As lesões pré-malignas são denominadas neoplasia intraepitelial cervical (NIC) I, II e III conforme a proporção de espessura epitelial acometida por células displásicas (Figura 7). Enquanto na NIC I as alterações são limitadas à camada basal, na NIC III a população neoplásica chega a ocupar até o terço superior do epitélio, já constituindo um carcinoma in situ. Nesta fase a maioria das lesões são assintomáticas.

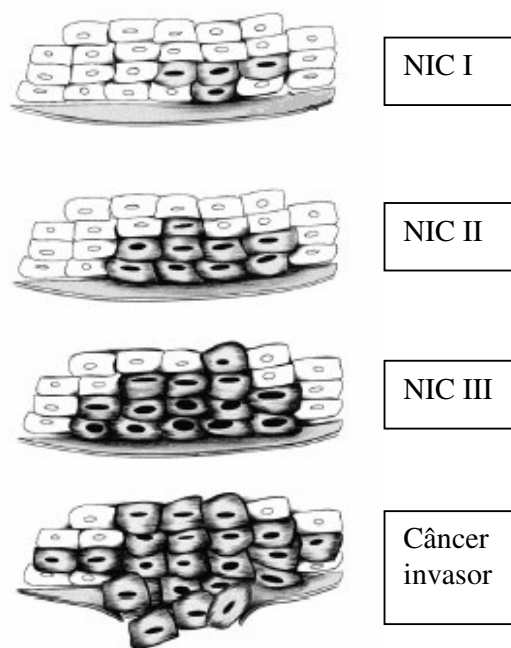


Figura 7: Progressão do câncer de colo uterino.

Após o rompimento da camada basal o tumor se dissemina primariamente por extensão local ao corpo do útero, vagina e outras estruturas pélvicas e seqüencialmente às cadeias de linfonodos. Nos pacientes com câncer localmente avançado as metástases

hematológicas são pouco comuns (ARENDS *et al.*, 1998). Estima-se que 60% das mulheres com NIC I vão apresentar regressão espontânea, 30% podem apresentar persistência da lesão como tal e menos de 10% vão evoluir para NIC III, sendo a chance de progressão a câncer invasor cerca de 1% (SYRJANEN, 1996). O prognóstico desta neoplasia é marcadamente afetado pela extensão da doença no momento do diagnóstico, sendo influenciado pelo volume e grau do tumor, tipo histológico, disseminação linfática e invasão vascular (DELGADO *et al.*, 1990; ZAINO *et al.*, 1992).

1.2.3 Papel do HPV

Estudos epidemiológicos convincentemente demonstram que o principal fator de risco para o desenvolvimento de lesões neoplásicas pré-invasivas e invasivas no colo do útero é a infecção pelo papiloma vírus humano (HPV), superando outros fatores como elevada paridade, maior número de parceiros sexuais, início precoce da atividade sexual, baixo nível sócio-econômico e tabagismo (SCHIFFMAN & CASTLE, 2003). Já foi demonstrado que o DNA do HPV está presente em mais de 95% dos carcinomas cervicais (MUNOZ *et al.*, 2003). Supostamente a integração do DNA do HPV ao genoma humano leva à transcrição persistente dos genes E6 e E7, que romperiam mecanismos de controle do ciclo celular através da inativação dos oncogenes p53 e Rb, respectivamente (SCHEFFNER *et al.*, 1990; TRINGLER *et al.*, 2004). Apesar de ser causa necessária para o desenvolvimento de câncer invasor, a especificidade e o valor preditivo positivo da detecção do HPV de alto risco são baixos. Diversos estudos demonstraram que grande parte das lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau são positivas para HPVs de alto risco (cerca de 80%) e, mesmo assim, regredem espontaneamente sem tratamento (ALTS GROUP, 2000; EVANS *et al.*, 2002). Dessa forma, são necessários outros métodos para detectar o potencial de infecção persistente

e de progressão a formas invasivas nas neoplasias cervicais. Além do importante papel na determinação de prognóstico e comportamento biológico das neoplasias, a identificação de novos marcadores biológicos pode contribuir para o rastreamento e tratamento do câncer de colo de útero.

2 – OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão de GRPR em neoplasias cervicais pré-invasivas e invasivas através de técnica imunoistoquímica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar por imunoistoquímica se existe diferença de expressão do GRPR entre as formas pré-invasivas (NIC I, II e III) e invasivas (carcinomas epidermóides e adenocarcinomas) de colo uterino.
- Avaliar por imunohistoquímica se existe diferença de expressão do GRPR entre as lesões neoplásicas e tecidos cervicais adjacentes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA

Foram selecionadas 88 lesões cervicais do arquivo de patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no período compreendido entre janeiro e dezembro do ano de 2004. As amostras constaram de 22 NIC I, 19 NIC II, 26 NIC III, 13 carcinomas epidermóides e 8 adenocarcinomas. Para cada lesão foi selecionado um bloco de parafina representativo, preferencialmente aquele em que os tecidos cervicais adjacentes estivessem presentes, o que não foi viável na totalidade das amostras.

3.2 TÉCNICA DA IMUNOHISTOQUÍMICA

A análise de expressão do GRPR foi feita através da técnica da imunohistoquímica, utilizando um anticorpo anti-GRPR policlonal de coelho correspondente à segunda alça extracelular (nº de catálogo OPA1-15619, Affinity Bioreagents, Golden, Co, USA), na diluição de 1:50.

Foram realizados cortes de 4 micra de espessura, que foram desparafinizados em estufa e reidratados em álcool. Foram procedidas a recuperação antigênica em forno de microondas, a inativação da peroxidase endógena através da imersão em peróxido de hidrogênio e o bloqueio das reações inespecíficas com soro normal. O anticorpo primário diluído em solução (1:50) foi encubado por 12 horas, a 4°C, seguido da aplicação do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB, Dako) e revelação com diaminobenzidina tetraidroclorido (Kit DAB, Dako). Um corte de carcinoma de pâncreas foi utilizado como controle positivo, e, para o controle negativo, foi omitida a

utilização do anticorpo primário. A avaliação da coloração imunoistoquímica foi realizada por dois patologistas cegos para o diagnóstico das lesões.

3.3 QUANTIFICAÇÃO DOS RESULTADOS

A coloração imunohistoquímica foi quantificada similarmente a SCOTT *et al.*, 2004, de acordo com intensidade e distribuição da seguinte forma:

- 0: sem coloração; 1: fraca; 2: moderada; 3: forte.
- 1: menos de 10% das células coradas (padrão focal); 3: mais de 10% das células coradas (padrão difuso).

Para apresentação dos dados as lesões classificadas da seguinte maneira:

- Negativas: lesões com soma de intensidade e distribuição ≤ 1 (negativo e fraco focal);
- Positivas fracas: lesões com soma de intensidade e distribuição entre 2 e 4 (difuso fraco e focal moderado e forte);
- Positivas fortes: lesões com soma de intensidade e distribuição ≥ 5 (difuso moderado e forte).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi realizada com o teste Kruskal Wallis, seguido do teste Mann-Whitney quando apropriado, para comparação de intensidade de expressão de GRPR entre as lesões e tecidos sadios circundantes. Em todas as comparações foram considerados significativos os valores de $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

A imunexpressão do GRPR demonstrou um padrão de coloração citoplasmático difuso entre as lesões neoplásicas (Figura 8). O marcador foi expresso em 99% dos tecidos tumorais, na maioria dos casos com coloração moderada a forte. De acordo com a análise de variância por Kruskal-Wallis, a expressão geral do GRPR foi significativamente diferente entre as lesões malignas e os tecidos saudios ($df=2$, $H=118,38$, $P<0,0001$). Análises subseqüentes com o teste Mann-Whitney confirmaram que a expressão do GRPR foi significativamente maior nos tecidos neoplásicos quando comparado tanto às endocérvices ($P<0,0001$), quanto às ectocérvices adjacentes às lesões ($P<0,0001$).

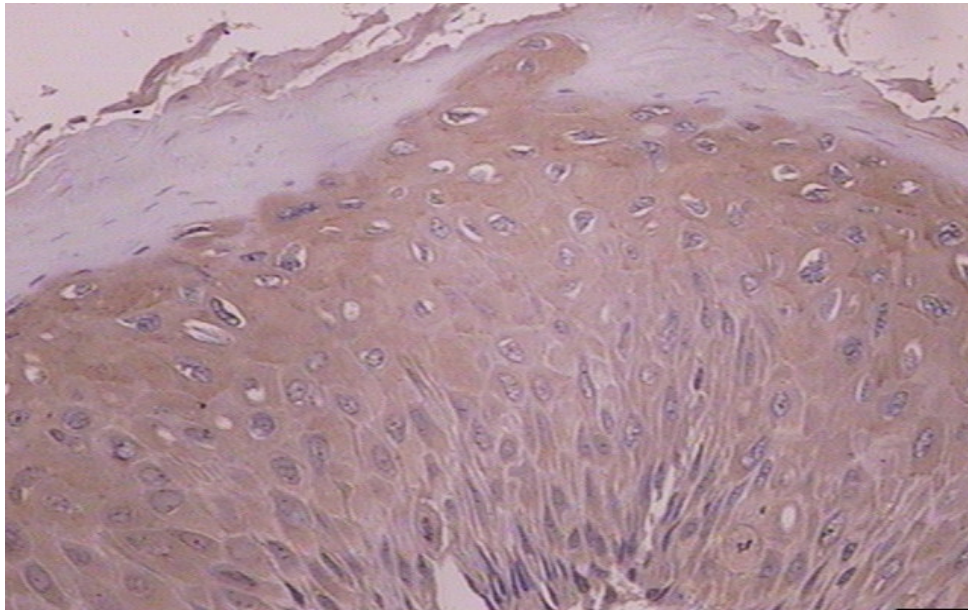


Figura 8: Imunoexpressão de GRPR em NIC I: coloração fortemente positiva com ceratose adjacente negativa (x 200).

Nas ectocérvices a expressão do GRPR foi negativa em 36,2% das amostras e fracamente positiva em outras 46,8%; os restantes 17% foram fortemente positivos para presença de GRPRs, embora nenhuma das amostras tenha exibido coloração forte difusa. Já nas endocérvices, raramente foram detectados receptores (Figura 9); 15% dos espécimes exibiram padrão fraco focal, sendo classificados como negativos e apenas um foi positivo. Os resultados entre endocérvices e ectocérvices também foram significativamente diferentes de acordo com o teste Mann-Whitney ($P < 0,0001$).

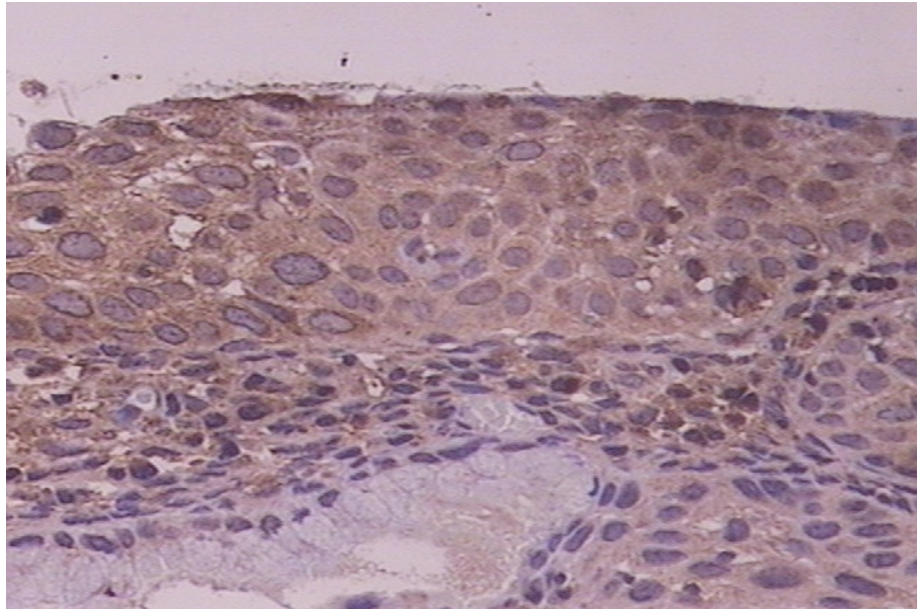


Figura 9: Imunoexpressão forte e difusa em NIC III contrastando com endocérvice negativa (x 200).

A distribuição dos receptores foi homogênea entre os processos neoplásicos. Não houve diferença estatística entre as formas pré-invasivas NIC I, II e III e os carcinomas invasores ($df=4$, $H=4,82$, $P=0,3$). Também não houve diferença na expressão do GRPR nas ectocérvices ($df=4$, $H=4,18$, $P=0,4$) e endocérvices ($df=3$, $H=1,38$, $P=0,7$) entre os

diferentes grupos de NIC e câncer invasivo. Os dados da imunoposição do GRPR entre as amostras estudadas estão descritos na tabela 2 e a expressão geral está ilustrada na figura 10.

Grau patológico	Imunoposição de GRPR				
	Negativo	Fraco focal	Fraco difuso	Moderado difuso	Forte difuso
NIC I	0	0	3 (13,6%)	10 (45,5%)	9 (40,9%)
Ectocérvice	2 (14,3%)	1 (7,1%)	8 (57,1%)	3 (21,4%)	0
Endocérvice	11 (84,6%)	2 (15,4%)	0	0	0
NIC II	1 (5,3%)	0	2 (10,5%)	12 (63,2%)	4 (21,1%)
Ectocérvice	2 (15,4%)	3 (23,1%)	5 (38,5%)	3 (23,1%)	0
Endocérvice	14 (100%)	0	0	0	0
NIC III	0	2 (7,7%)	7 (26,9%)	10 (38,5%)	7 (26,9%)
Ectocérvice	4 (26,7%)	2 (13,3%)	7 (46,7%)	2 (13,3%)	0
Endocérvice	15 (71,4%)	5 (23,8%)	0	1 (4,8%)	0
Carcinoma escamoso	0	0	3 (23,1%)	3 (23,1%)	7 (53,8%)
Ectocérvice	2 (100%)	0	0	0	0
Endocérvice	2 (100%)	0	0	0	0
Adenocarcinoma	0	1 (12,5%)	1 (12,5%)	4 (50,0%)	2 (25,0%)
Ectocérvice	0	1 (33,3%)	2 (66,7%)	0	0
Endocérvice	NA	NA	NA	NA	NA
Total lesões	1 (1,1%)	3 (3,4%)	16 (18,2%)	39 (44,3%)	29 (32,9%)
Total ectocérvice	10 (21,3%)	7 (14,9%)	22 (46,8%)	8 (17%)	0 (0%)
Total endocérvice	42 (84%)	7 (14%)	0 (0%)	1 (2%)	0 (0%)

Tabela 2: Incidência, distribuição e densidade do GRPR nas lesões neoplásicas do colo do útero e tecidos cervicais adjacentes. NA, Não Acessado.

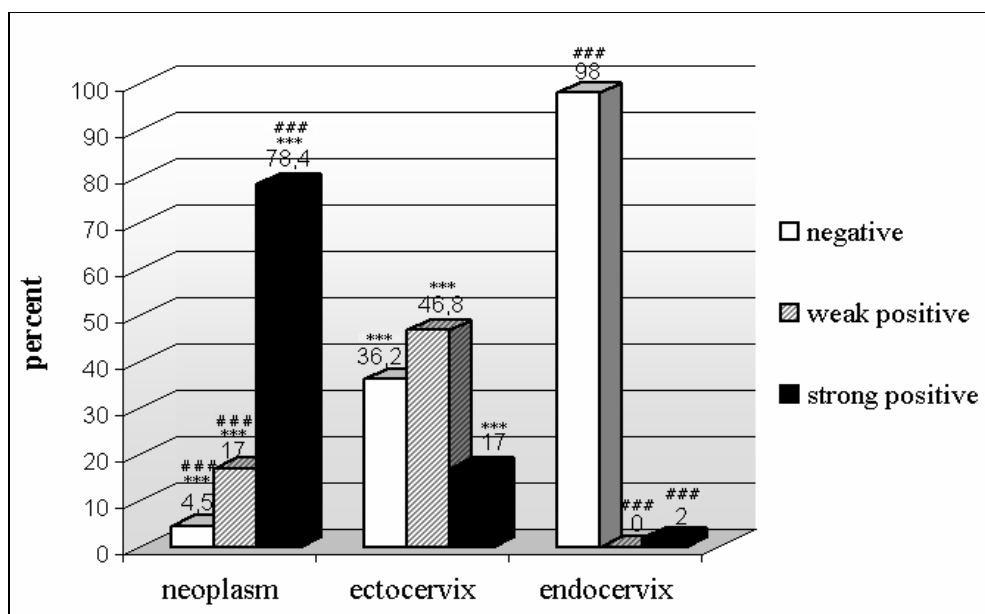


Figura 10: expressão geral de GRPR no cancer de colo de útero e tecidos cervicais adjacentes. *** $P < 0,000$ comparado à endocérvice; ### $P < 0,000$ comparado à ectocérvice.

5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem expressão aberrante de GRPRs nas neoplasias cervicais humanas. Estes receptores também foram encontrados, em menor densidade, nas ectocervices adjacentes às lesões neoplásicas, enquanto que praticamente não foram mensuráveis nas endocervices. De acordo com o nosso conhecimento, esta avaliação da expressão do GRPR em câncer de colo de útero não havia sido previamente descrita na literatura.

Os peptídeos semelhantes ao GRP podem ser encontrados em tecidos normais, desempenhando funções fisiológicas. Durante o desenvolvimento fetal, a presença de GRPRs já foi estabelecida em diversas localizações nos sistemas respiratório, nervoso, urogenital e gastrintestinal (BATTEY *et al.*, 1994). Em adultos, já foram demonstrados GRPRs em células sangüíneas periféricas de indivíduos sadios (SHINGYOJI *et al.*, 2003) e em muitos órgãos, como o estômago (FERRIS *et al.*, 1997) e o pâncreas (XIAO *et al.*, 2001). Alguns autores demonstraram a expressão ubiqüita destes receptores em lóbulos e dutos mamários sadios, sugerindo papel do GRP na fisiologia da mama (GUGGER & REUBI, 1999).

Quanto ao trato genital feminino, já foram encontradas elevadas concentrações de BLPs em tecidos vaginais de ratas (GHATEI *et al.*, 1985). Adicionalmente, já foram descritas funções fisiológicas do GRP em contrações da musculatura lisa uterina (STJERNQUIST *et al.*, 1986) e no crescimento de células do estroma endometrial humano (ENDO *et al.*, 1991). Também em humanos, diversas estruturas uterinas como miométrio, glândulas endometriais e vasos foram capazes de expressar GRPRs em condições fisiológicas. FLEISHMANN e colaboradores (2005) avaliaram recentemente tecidos uterinos sadios e neoplásicos e descreveram superexpressão de GRPRs no

miométrio normal, em todas as fases do ciclo menstrual e na pós-menopausa, bem como no endométrio funcional.

Histologicamente, a ectocérvice é recoberta por epitélio estratificado escamoso, que é essencialmente idêntico ao epitélio que recobre a vagina. Na medida em que GRPRs já foram descritos em tecidos vaginas sadios (GHATEI *et al.*, 1985), não ficamos surpresos em encontrar estes receptores em nossas amostras, salientando que a imunossinalização foi sempre menos intensa quando comparada às respectivas lesões neoplásicas. Em contraste, as endocérvices praticamente não exibiram GRPRs. Uma explicação possível é que este tecido apresenta uma taxa de “turnover” menor comparada à ectocérvice, a qual está constantemente exposta às injúrias do meio. Nas ectocérvices, então, o GRP poderia estar desempenhando um efeito trófico fisiológico, estimulando a renovação epitelial. Outra hipótese a ser considerada, é que a presença de GRPRs em tecidos adjacentes às lesões neoplásicas poderia representar um evento molecular precoce na carcinogênese cervical. Entretanto, seria de se esperar que os receptores fossem encontrados em ambas endocérvices e ectocérvices, e não limitados às últimas. Já que o câncer cervical se dissemina primariamente por extensão local, podendo invadir tanto a vagina quanto ao corpo do útero, o racional seria GRP estimular os tecidos adjacentes da mesma maneira. Esta questão não pôde ser adequadamente avaliada até o presente momento deste estudo, pois em muitas amostras de câncer invasivo não foi possível encontrar quantidades suficientes de tecidos normais circundantes para análise. A endocérvice estava ausente em 84,6% dos carcinomas escamosos e em 100% dos adenocarcinomas, enquanto que a ectocérvice não foi verificada em 84,6% e 62,5% das amostras, respectivamente. Assim, especialmente nas formas invasivas do câncer de colo uterino, onde seriam mais esperados eventos moleculares carcinogênicos, o perfil de expressão do GRPR no ambiente adjacente às

neoplasias ainda não pôde ser apropriadamente estudado. Pesquisas adicionais avaliando a expressão de GRPRs em tecidos cervicais não neoplásicos e em um maior número de carcinomas invasores são necessárias para esclarecer estas questões.

No câncer, o GRP já está estabelecido como fator de crescimento, com efeitos mitogênicos autócrinos e parácrinos, atuando também como morfogene e como agente proangiogênico (PATEL *et al.*, 2006). Os GRPRs já foram localizados em muitas neoplasias humanas através de diferentes métodos, mais comumente ensaios de ligação ao receptor, detecção de RNAm com rt-PCR, ou imunistoquímica (CORNELIO *et al.*, 2007). Com o emprego de técnicas tão distintas, os resultados na distribuição do receptor são variáveis entre os estudos. Mesmo quando utilizados métodos iguais, a quantificação dos resultados não é uniforme entre os autores. Neste estudo optamos pelo método da imunistoquímica, por ser uma tecnologia simples e acessível, sendo amplamente empregada em rotinas de patologia.. Além disso, a imunistoquímica preserva a arquitetura dos tecidos e a morfologia celular, de maneira que as imunoreações podem ser atribuídas a subpopulações específicas.

Os resultados encontrados neste estudo demonstraram imunopositividade difusa em 99% das lesões neoplásicas, com a grande maioria exibindo um forte padrão de coloração. Estes achados são concordantes com a expressão aberrante exibida em outros tipos de câncer já estudados. No câncer de próstata, as amostras se mostraram 100% positivas para expressão de GRPR por diferentes autores e diferentes métodos (BARTHOLDI *et al.*, 1998; MARKWALDER & REUBI, 1999; REUBI *et al.*, 2002). Quando foram avaliados os respectivos tecidos sadios adjacentes às lesões, eles raramente expressaram quantidades mensuráveis de GRPRs ou exibiram sinais fracos de coloração (BARTHOLDI *et al.*, 1998; MARKWALDER & REUBI, 1999). Baseado nestes achados foi proposto que estes receptores poderiam ser úteis na diferenciação

entre hiperplasia e neoplasia. CHAVE (2000) e colaboradores avaliaram tecidos coloretais normais e neoplásicos e detectaram GRPRs em todas as amostras, mas com superexpressão nas tumorais, reforçando o papel do GRP como fator de crescimento autócrino no processo carcinogênico. Outros pesquisadores também demonstraram expressão de GRPR no carcinoma de rim, mas não nos tecidos renais normais (PANSKY *et al.*, 2000). Resultados semelhantes foram obtidos analisando pacientes com neuroblastomas (SEBESTA *et al.*, 2001) e carcinomas escamosos de cabeça e pescoço (LANGO *et al.*, 2001), em que os receptores foram encontrados em todas as amostras avaliadas. Resumindo, a expressão de GRPRs é muito mais comumente encontrada em malignidades do que em tecidos humanos sadios. O que permanece incerto é se a expressão de GRPR é apenas um marcador tumoral ou se sinaliza um comportamento biológico agressivo destas neoplasias.

Na tentativa de responder esta questão, objetivou-se neste estudo correlacionar os níveis de expressão de GRPR com os diferentes graus do câncer de colo uterino, para verificar se haveria uma maior densidade de receptores em lesões mais invasivas. Alguns autores foram capazes de associar maior incidência de GRPRs em carcinomas mais agressivos ou pobremente diferenciados (SAURIN *et al.*, 1999; SUN *et al.*, 2000a; KIM *et al.*, 2002). Em nossa análise, entretanto, não foram encontradas diferenças significativas entre os diferentes graus patológicos; os receptores estavam quantitativamente presentes em todas as amostras, de NIC I a câncer invasor. Estes resultados são consistentes com outros estudos, onde a expressão de GRPR não pôde ser associada a dados patológicos ou outros fatores prognósticos (SUN *et al.*, 2000b; SEBESTA *et al.*, 2001).

Novas tecnologias emergentes estão tendo grande impacto no rastreamento, detecção, tratamento e prevenção do câncer. O exame de esfregaço cervical

Papanicolau, embora seja a principal ferramenta no rastreamento do câncer de colo de útero, não é um teste ideal por não possuir elevada sensibilidade (SHARMA & MENON, 2006). Nos últimos anos, baseado na evidente relação causal com a carcinogênese cervical, tem sido proposta a detecção de HPV de alto risco como rastreamento primário, bem como na triagem de exames Papanicolau suspeitos e no seguimento pós-tratamento de lesões NIC de alto grau e invasivas (NIEMINEN *et al.*, 2004). A principal desvantagem deste teste no rastreamento primário é a baixa especificidade em identificar as lesões com maior probabilidade de evolução para câncer invasor (SASIENI, 2000). Potenciais alternativas para melhorar a acurácia do teste do HPV são associações de outros marcadores, como as proteínas reguladoras de proliferação e do ciclo celular. A atividade da telomerase, uma enzima transcriptase reversa, está sendo bastante estudada no diagnóstico de lesões pré-malignas e malignas do colo de útero, com resultados contrastantes até o presente momento (REDDY *et al.*, 2001; NGAN *et al.*, 2002). O marcador de proliferação KI-67 também está sendo proposto para auxiliar na detecção de processos neoplásicos. Expresso normalmente nas células parabasais do epitélio escamoso maduro, quando presente nos 2/3 epiteliais superiores demonstrou maior especificidade em identificar NIC do que a detecção do HPV por PCR (KEATING *et al.*, 2001), podendo ser útil na diferenciação entre atrofia cervical e displasia de alto grau (LORENZATTO *et al.*, 2005). Outro marcador que vem sendo utilizado para distinguir displasias cervicais de alto grau de processos benignos é o inibidor de ciclo celular p16INK4a (O'NEILL & McCLUGGAGE, 2006). Além disso, sua imunodeteção já demonstrou correlação positiva com graus mais avançados de neoplasia cervical (AGOFF *et al.*, 2003). Finalmente, fatores de crescimento tais como EGF e VEGF também estão sendo propostos como marcadores biológicos no câncer de colo uterino (OH *et al.*, 2000; MATHUR *et al.*, 2005). Sua expressão

aumentada em tumores cervicais é associada à progressão de doença e pior prognóstico (KIM *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2005). Mais do que ferramentas diagnósticas, os receptores de fatores de crescimento podem ser alvos potenciais de tratamento, a exemplo de inibidores de EGFR que já estão sendo avaliados em estudos fase II em pacientes com neoplasias de colo uterino (VAIDYA *et al.*, 2005). À semelhança do EGF, o GRP também é reconhecido como um fator de crescimento para o câncer, portanto o mesmo racional poderia ser aplicado explorando os GRPRs como alvos diagnósticos e terapêuticos no câncer cervical.

Considerando que o câncer de colo de útero é uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo, e dada a ampla expressão de GRPRs encontrada neste estudo, propomos que estas neoplasias também sejam consideradas para potenciais aplicações clínicas com análogos e antagonistas de GRPR.

6. PERSPECTIVAS

- Avaliar expressão de GRPR em tecidos de colo uterino saudáveis.
- Avaliar expressão de GRPR e tecidos saudáveis adjacentes em maior número de neoplasias cervicais avançadas.
- Comparar expressão de GRPR com outros marcadores biológicos como Ki-67, p16 e EGFR em neoplasias cervicais.
- Avaliar expressão de GRPR em linhagens celulares de carcinoma de colo uterino SiHa e HeLa.
- Avaliar ação de GRP e do antagonista GRPR (RC-3095) em linhagens celulares de carcinoma de colo uterino, bem como seu possível sinergismo com outras drogas, a exemplo de cisplatina e inibidores de EGFR.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOFF, S.N.; LIN, P.; MORIHARA, J., et al. p16(INK4a) expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with KI-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod. Pathol.*, v. 16, p. 665-673, 2003.

ALTS GROUP. Human papilloma virus testing for triage of women with cytologic evidence of low-grade squamous intraepithelial lesions: baseline data from a randomized trial. The Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low Grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study (ALTS) Group. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 92, p. 397-402, 2000.

ANASTASI, A.; ERSPAMER, V. & BUCCI, M. Isolation and structure of bombesin and alytesin, two analogous active peptides from the skin of the European amphibians *Bombesina* and *Alytes*. *Experimentia* v. 27, p. 166-169, 1971.

ARENDS, M. J.; BUCKLEY, C.H. & WELLS, M. Aetiology, pathogenesis, and pathology of cervical neoplasia. *J. Clin. Pathol.*, v. 51, p. 96, 1998.

AZAY, J.; GAGNE, D.; DEVIN, C., et al. JMV641: a potent bombesin receptor antagonist that inhibits Swiss 3T3 cell proliferation. *Reg. Pept.*, v. 65(1), p. 91-97, 1996.

BAIDOO, K.E.; LIN, K.S.; ZHAN, Y., et al. Design, synthesis, and initial evaluation of high affinity technetium bombesin analogues. *Bioconj. Chem.*, v. 9, p. 218-225, 1998.

BARTHOLDI, M.F.; WU, J.M.; PU, H. & TRONCOSO, P. In situ hybridization for gastrin-releasing peptide receptor (GRP receptor) expression in prostatic carcinoma. *Int. J. Cancer*, v. 79(1), p. 82-90, 1998.

BATTEY, J.F.; WAY, J.M.; CORJAY, M.H., et al. Molecular cloning of the bombesin/gastrin releasing peptide receptor from Swiss 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 88, p. 395-399, 1991.

BATTEY, J.F.; WADA, E. & WRAY, S. Bombesin receptor gene expression during mammalian development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 739, p. 244-252, 1994.

BOLOGNA, M.; FESTUTTIA, C.; MUZI, P., et al. Bombesin stimulates growth of human prostatic cancer cells in vitro. *Cancer*, v. 63, p. 1714-1720, 1989.

BOSCH, F.X. & DE SANJOSE, S. Human papillomavirus and cervical cancer—burden and assessment of causality. *J. Natl. Cancer. Inst. Monogr.*, v. 3, 2003.

BUNNETT, N. Gastrin releasing peptide. In: Walsh JH, Dockray GJ (editors): Gut Peptides: Biochemistry and Physiology. New York, Raven Press, p. 423-445, 1994.

BURNS, D.M.; WALKER, B.; GRAY, J.& NELSON, J. Breast cancer cell-associated endopeptidase EC 24.11 modulates proliferative responses to bombesin. *Br. J. Cancer* 1999; v. 79, p. 214-220, 1999.

CHAUDHRY, A. ; CARRASQUILLO, J.A. ; AVIS, I.L., et al. Phase I and imaging trial of a monoclonal antibody directed against gastrin-releasing peptide in patients lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, v. 5(11), p. 3385-3393, 1999.

CHATZISTAMOU, I.; SCHALLY, A.V.; SUN, B., et al. Inhibition of growth of OV-1063 human epithelial ovarian cancers and c- jun and c- fos oncogene expression by bombesin antagonists. *Br. J. Cancer*, v. 83(7), p. 906-913, 2000.

CHAVE, H.S.; GOUGH, A.C.; PALME, K., et al. Bombesin family receptor and ligand gene expression in human colorectal cancer and normal mucosa. *Br. J. Cancer* 2000; v. 82(1), p. 124-130, 2000.

CHU, K.U.; EVERS, B.M.; ISHIZUKA, J., et al. Role of bombesin on gut mucosal growth. *Ann. Surg.*, v. 222, p. 94-100, 1995.

CORNELIO, D.B.; ROESLER, R. & SCHWARTSMANN, G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy. *Ann. Oncol.*, v. 18 (9), p. 1457-1466, 2007.

CUTTITTA, F.; CARNEY, D.N.; MULSHINE, J., et al. Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. *Nature*, v. 316, p. 823-826, 1985.

DAL-PIZZOL, F.; DI LEONE, L.P.; RITTER, C., et al. Gastrin-releasing Peptide Receptor Antagonist Effects on an Animal Model of Sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, v. 173(1), p. 84-90, 2006.

DE LA FUENTE, M.; DEL RIO, M.; FERRANDEZ, M.D. & HERNANZ, A. Modulation of phagocytic function in murine peritoneal macrophages by bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C. *Immunology*, v. 73(2), p. 205-211, 1991.

DE VICENTIS, G.; SCOPINARO, F.; VARVARIGOU, A., et al. Phase I trial of technetium [Leu13] bombesin as cancer seeking agent: possible scintigraphic guide for surgery? *Tumori*, v. 88(3), s. 28-30, 2002.

DELGADO, G.; BUNDY, B.; ZAINO, R., et al.: Prospective surgical-pathological study of disease-free interval in patients with stage IB squamous cell carcinoma of the cervix: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol. Oncol.*, v. 38 (3), p. 352-357, 1990.

DORSAM, R.T. & GUTKIND, J.S. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nature Rev. Cancer*, v. 7, p. 79-94, 2007.

ENDO, T.; FUKUE, H.; KANAYA, M., et al. Bombesin and bradykinin increase inositol phosphates and cytosolic free Ca^{+2} , and stimulate DNA synthesis in human endometrial stromal cells. *J. Endocrinol.*, v. 131, p. 313-318, 1991.

EVANS, M.F.; MOUNT, S.L.; BEATTY, B.G, et al. Biotinyl-tyramide-based in situ hybridization signal patterns distinguish human papillomavirus types and grade of cervical intraepithelial neoplasia. *Mod. Pathol.*, v.15, p. 1339-1347, 2002.

FATHI, Z.; CORJAY, M.H.; SHAPIRA, H., et al. BRS-3: a novel bombesin receptor subtype selectively expressed in testis and lung carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, v. 268, p. 5979-5984, 1993.

FERRIS, H.A.; CARROLL, R.E.; LORIMER, D.L. & BENYA, R.V. Location and characterization of the human GRP receptor expressed by gastrointestinal epithelial cells. *Peptides*, v. 18, p. 663-72, 1997.

FLEISCHMANN, A.; WASER, B.; GEBBERS, J.O. & REUBI, J.C. Gastrin-releasing peptide receptors in normal and neoplastic human uterus: involvement of multiple tissue compartments. *The J. Clin. Endocrinol. & Metabol.*, v. 90(8), p. 4722-4729, 2005.

GHATEI, M.A.; GU, J.; ALLEN, J.M., et al. Bombesin-like immunoreactivity in female rat genito-urinary tract. *Neurosc. Lett.*, v. 54(1), p. 13-19, 1995.

GILADI, E.; NAGALLA, S.R.; SPINDEL, E.R. Molecular cloning and characterization of receptors for the mammalian bombesin-like peptides. *J. Mol. Neurosci.*, v. 4, p. 41-54, 1993.

GRIMSHOLM, O.; RANTAPAA-DAHLQVIST, S. & FORSGREN, S. Levels of gastrin-releasing peptide and substance P in synovial fluid and serum correlate with levels of cytokines in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, v. 7, p. R416-R426, 2005.

GUGGER, M. & REUBI, J.C. Gastrin-releasing peptide receptors in non-neoplastic and neoplastic human breast. *Am. J. Pathol.*, v. 155(6), p. 2067-2076, 1999.

HEASLEY, L.E. Autocrine and paracrine signaling through neuropeptide receptors in human cancer. *Oncogene*, v. 20, p. 1563-1569, 2001.

HEUSER, M. ; SCHLOTT, T. ; SCHALLY, A.V., et al. Expression of gastrin releasing peptide receptor in renal cell carcinomas: a potential function for the regulation of neoangiogenesis and microvascular perfusion. *J. Urol.*, v. 173, p. 2154-2159, 2005.

INCA: www.inca.gov.br

JEMAL, A.; MURRAY, T.; SAMUELS, A., et al. Cancer statistics, 2003. *CA. Cancer J. Clin.*, v. 53, p. 5, 2003.

JOHNSON, D.E.; LOCK, J.E. ; ELDE, R.P. & THOMPSON, T.R. Pulmonary neuroendocrine cells in hyaline membrane disease and bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr. Res.*, v. 16, p. 446-454, 1982.

KEATING, J.T.; CVIKO, A.; RIETHDORF, S., et al. KI-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am. J. Surg. Pathol.*, v. 25, p. 884-891, 2001.

KIARIS, H.; SCHALLY, A.V.; SUN, B., et al. Inhibition of growth of human malignant glioblastoma in nude mice by antagonists of bombesin/gastrin-releasing peptide. *Oncogene*, v. 18(50), p. 7168-7173, 1999.

KIM, G.E.; KIM, Y.B.; CHO, N.H., et al. Synchronous Coexpression of Epidermal Growth Factor Receptor and Cyclooxygenase-2 in Carcinomas of the Uterine Cervix: a Potential Predictor of Poor Survival. *Clin. Cancer Res.*, v. 10, p.1366-1374, 2004.

KIM, H.J.; EVERS, B.M.; GUO, Y., et al. Bombesin-mediated AP-1 activation in a human gastric cancer (SIIA). *Surgery*, v. 120, p. 130-136, 1996.

KIM, S.; HU, W.; KELLY, D.R., et al. Gastrin-releasing peptide is a growth factor for human neuroblastomas. *Ann. Surg.*, v. 235(5), p. 621-629, 2002.

KOPPAN, M., HALMOS, G.; ARENCIBIA, J.M., et al. Bombesin/gastrin-releasing peptide antagonists RC-3095 and RC-3940-II inhibit tumor growth and decrease the levels and mRNA expression of epidermal growth factor receptors in H-69 small cell lung carcinoma. *Cancer*, v. 83(7), p. 1335-1343, 1998.

LANGER, C.J. & NATALE, R.B. The emerging role of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Semin. Oncol.*, v. 32(6 Supl. 10), p. S23-29, 2005.

LANGO, M.N.; DYER, K.F ; LUI, V.W., et al. Gastrin-releasing peptide receptor-mediated autocrine growth in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J. Nat. Canc. Inst.*, v. 94(5), p. 375-383, 2002.

LANTRY, L.E.; CAPELETTI, E.; MADDALENA, M.E., et al. ¹⁷⁷Lu-AMBA: Synthesis and characterization of a selective ¹⁷⁷Lu-labeled GRP-R agonist for systemic radiotherapy of prostate cancer. *J. Nucl. Med.*, v. 47(7), p. 1144-1152, 2006.

LEE, C.M., SHRIEVE, D.C.; ZEMPOLICH, K.A., et al. Correlation between human epidermal growth factor receptor family (EGFR, HER2, HER3, HER4), phosphorylated Akt (P-Akt), and clinical outcomes after radiation therapy in carcinoma of the cervix. *Gynecol. Oncol.*, v. 99(2), p. 415-421, 2005.

LIU, X.; CARLISLE, D.L.; SWICK, M.C.; et al. Gastrin-releasing peptide activates Akt through the epidermal growth factor receptor pathway and abrogates the effect of gefitinib. *Exp. Cell. Res.*, v. 313(7), p. 1361-1372, 2007.

LORENZATTO, M.; CAUDROY, D.; BRONNER, C., et al. Cell cycle and/or proliferation markers: what is the best method to discriminate cervical high-grade lesions? *Hum. Pathol.*, v. 36, p. 1101-1107, 2005.

MARINISSEN, M.J. & GUTKIND, J.S. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 22, p. 368-376, 2001.

MARKWALDER, R. & REUBI, J.C. Gastrin-releasing Peptide Receptors in the Human Prostate: Relation to Neoplastic Transformation. *Cancer Res.*, v. 59, p. 1152-1159, 1999.

MARQUEZ, C.; TRESTON, A.; MOODY, E., et al. The metabolism of BW2258U89, a GRP receptor antagonist. *Neuropeptides*, v. 34(2), p. 108-115, 2000.

MATHUR, R.S. & MATHUR, S.P. Vascular endothelial growth factor (VEGF) up-regulates epidermal growth factor receptor (EGF-R) in cervical cancer in vitro: this action is mediated through HPV-E6 in HPV-positive cancers. *Gynecol. Oncol.*, v. 97(1), p. 206-213, 2005.

MEDINA, S.; DEL RIO, M.; DE LA CUADRA, B., et al. Age-related changes in the modulatory action of gastrin-releasing peptide, neuropeptide Y and sulfated cholecystokinin octapeptide in the proliferation of murine lymphocytes. *Neuropeptides*, v. 33, p. 173– 179, 1999.

MIYAZAKI, M.; LAMHARZI, N.; SCHALLY, A.V., et al. Inhibition of growth of MDA-MB-231 human breast cancer xenografts in nude mice by bombesin/gastrin-releasing peptide (GRP) antagonists RC-3940-II and RC-3095. *Eur. J. Cancer*, v. 34(5), p. 710-717, 1998.

MOODY, T.W.; LEYTON, J.; GARCIA-MARIN, L.J. & JENSEN, R.T. Nonpeptide gastrin releasing peptide receptor antagonists inhibit the proliferation of lung cancer cells. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 474, p. 21-29, 2003.

MUNOZ, N.; BOSCH, F.X.; DE SANJOSE, S., et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.*, v. 348, p. 518, 2003.

NAGALLA, S.R.; BARRY, K.C.; CRESWICK, P., et al. Cloning of a receptor for amphibian [Phe13]bombesin distinct from the receptor for gastrin-releasing peptide:

identification of a fourth bombesin receptor subtype (BB4). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 92, p. 6205-6209, 1995.

NARAYAN, S.; GUO, Y.S.; TOUWSEND, C.M. Jr., et al. Specific binding and growth effects of bombesin-related peptides on mouse colon cancer cells in vitro. *Cancer Res.*, v. 50, p. 6772-6778, 1990.

NGAN, H.I.; CHEUNG, A.N.; LIU, S.S., et al. Telomerase assay and HPV 16/18 typing as adjunct to conventional cytological cervical cancer screening. *Tumour Biol.*, v. 23, p. 87-92, 2002.

NIEMINEN, P.; VUORMA, S.; VIKKI, M., et al. Comparison of HPV test versus conventional and automation-assisted Pap-screening as potential screening tools for preventing cervical cancer. *B. J. O. G.*, v. 111, p. 842-848, 2004.

OH, M.J.; CHOI, J.H.; KIM, I.H., et al. Detection of Epidermal Growth Factor Receptor in the Serum of Patients with Cervical Carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, v. 6, p. 4760-4763, 2000.

O'NEILL, C.J. & McCLUGGAGE, W.G. p16 expression in the female genital tract and its value in diagnosis. *Adv. Anat. Pathol.*, v. 13, p. 8-15, 2006.

PANSKY, A.; DE WEERTH, A.; FASLER-KAN, E., et al. Gastrin releasing peptide-preferring bombesin receptors mediate growth of human renal cell carcinoma. *J. Am. Soc. Nephrol.*, v. 11(8), p. 1409-1418, 2000.

PAREKH, D.; ISHIZUKA, J.; TOWNSEND, C.M. Jr., et al. Characterization of a human pancreatic carcinoid in vitro: morphology, amine and peptide storage, and secretion. *Pancreas*, v. 9, p. 83-90, 1994.

PATEL, O.; SHULKES, A. & BALDWIN, G.S. Gastrin-releasing peptide and cancer. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1766, p. 23-41, 2006.

PERONA, R. Cell signaling: growth factors and tyrosine kinase receptors. *Clin. Transl. Oncol.*, v. 8(2), p. 77-82, 2006.

PLONOWSKI, A.; SCHALLY, A.V.; VARGA, J.L., et al. Potentiation of the inhibitory effect of growth hormone-releasing hormone antagonists on PC-3 human prostate cancer by bombesin antagonists indicative of interference with both IGF and EGF pathways. *Prostate*, v. 44(2), p. 172-180, 2000.

REDDY, V.G.; KHANNA, N.; JAIN, S.K., et al. Telomerase – a molecular marker for cervical cancer screening. *Int. J. Gynecol. Cancer*, v.11, p. 100-106, 2001.

REUBI, J.C. ; WENGER, S. ; SCHMUCKLI-MAURER, J., et al. Bombesin receptor subtypes in human cancers: detection with the universal radioligand (125)I-[D-TYR(6), beta-ALA(11), PHE(13), NLE(14)] bombesin(6-14). *Clin. Cancer Res.*, v. 8(4), p. 1139-1146, 2002.

ROESLER, R.; LUFT, T.; OLIVEIRA, S.H., et al. Molecular mechanisms mediating gastrin-releasing peptide receptor modulation of memory consolidation in the hippocampus. *Neuropharmacology*, v. 51(2), p. 350-357, 2006a.

ROESLER, R.; HENRIQUES, J.A. & SCHWARTSMANN, G. Gastrin-releasing Peptide receptor as a molecular target for psychiatric and neurological disorders. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, v. 5(2), p. 197-204, 2006b.

ROZENGURT, E.; GUHA, S. & SINNETT-SMITH, J. Gastrointestinal peptide signaling in health and disease. *Eur. J. Surg. Suppl.*, v. 587, p. 23-38, 2002.

SASIENI, P.D. Human Papillomavirus screening and cervical cancer prevention. *J. Am. Med. Womens Assoc.*, v.55, p. 216-219, 2000.

SAURIN, J.C. ; ROUALT, J.P. ; ABELLO, J., et al. High gastrin-releasing peptide receptor mRNA level is related to tumor dedifferentiation and lymphatic vessel invasion in human colon cancer. *Eur. J. Cancer*, v. 35(1), p. 125-132, 1999.

SCHALLY, A.V. & NAGY, A. Cancer chemotherapy based on targeting of cytotoxic peptide conjugates to their receptors on tumors. *Eur. J. Endocrinol.*, v. 141, p. 1-14, 1999.

SCHEFFNER, M.; WERNESS, B.A.; HUIBREGTSE, J.M., et al. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p 53. *Cell*, v. 63, p. 1129, 1990.

SCHIFFMANN, M.H. & CASTLE, P. Epidemiologic studies of a necessary causal risk factor: human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 95(6), E2, 2003.

SCHWARTSMANN, G.; DI LEONE L.P.; HOROWITZ, M., et al. A phase I trial of the bombesin/gastrin-releasing peptide (BN/GRP) antagonist RC3095 in patients with advanced solid malignancies. *Invest. New Drugs*, v. 24(5), p. 403-412, 2006.

SCOTT, N.; MILLWARD, E.; CARTWRIGHT, E.J, et al. Gastrin releasing peptide and gastrin releasing peptide receptor expression in gastrointestinal carcinoid tumors. *J. Clin. Pathol.*, v. 57, p. 189-192, 2004.

SEBESTA, J.A.; YOUNG, A.; BULLOCK, J., et al. Gastrin-releasing peptide: a potential growth factor expressed in human neuroblastoma tumors. *Curr. Surg.*, v. 58(1), p. 86-89, 2001.

SHARMA, A. & MENON, U. Screening for gynecological cancers. *Eur. J. Surg. Oncol.*, v. 32, p. 818-824, 2006.

SHINGYOGI, M.; TAKIGUSHI, Y.; WATANABE, R., et al. Detection of tumor specific gene expression in bone marrow and peripheral blood from patients with small cell lung carcinoma. *Cancer*, v. 97(4), p. 1057-1062, 2003.

SMITH, C.J.; VOLKERT, W.A. & HOFFMANN, T.J. Radiolabeled peptide conjugates for targeting of the bombesin receptor superfamily subtypes. *Nucl. Med. Biol.*, v. 32(7), p. 733-740, 2005.

SMITH, H.O.; TIFFANY, M.F.; QUALLS, C.R., et al. The rising incidence of adenocarcinoma relative to squamous cell carcinoma of the uterine cervix in the United States—a 24-year population-based study. *Gynecol. Oncol.*, v. 78, p. 97, 2000.

SPINDEL, E.R.; GILADI, E.; BREHM, P., et al. Cloning and functional characterization of a complementary DNA encoding the murine fibroblast bombesin/gastrin releasing peptide receptor. *Mol. Endocrinol.*, v. 4, p. 1956-1963, 1990.

STANGELBERGER, A.; SCHALLY, A.V., VARGA, J.L., et al. Inhibitory effect of antagonists of bombesin and growth hormone-releasing hormone on orthotopic and intraosseous growth and invasiveness of PC-3 human prostate cancer in nude mice. *Clin. Cancer Res.*, v. 11(1), p. 49-57, 2005.

STJERNQUIST, M.; EKBLAD, E.; OWMAN, C. & SUNDLER, F. Neuronal localization and motor effects of gastrin-releasing peptide (GRP) in rat uterus. *Regul. Pept.*, v. 13, p. 197-205, 1986.

SUBRAMANIAN, M.; SUGIYAMA, K.; COY, D.H., et al. Bombesin-like peptides and mast cell responses: relevance to bronchopulmonary dysplasia? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, v. 168, p. 601–611, 2003.

SUN, B.; SCHALLY, A.V. & HALMOS, G. The presence of receptors for bombesin/GRP and mRNA for three receptor subtypes in human ovarian epithelial cancers. *Reg. Pept.*, v. 90(1-3), p. 77-84, 2000. a

SUN, B.; HALMOS, G.; SCHALLY, A.V., et al. Presence of receptors for bombesin/gastrin-releasing peptide and mRNA for three receptor subtypes in human prostate cancers. *Prostate*, v. 42(4), p. 295-303, 2000. b

SUNDAY, M.E.; KAPLAN, L.M.; MOTOYAMA, E., et al. Biology of disease: gastrin-releasing peptide (mammalian bombesin) gene expression in health and disease. *Lab. Invest.*, v. 59, p. 5-24, 1988.

SYRJANEN, K.J. Spontaneous evolution of intraepithelial lesions according to the grade and type of the implicated human papillomavirus (HPV). *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod.Biol.*, v. 65, p. 45, 1996.

SZEPESHAZI, K.; SCHALLY, A.V.; HALMOS, G., et al. A single in vivo administration of bombesin antagonist RC-3095 reduces the levels and mRNA expression of epidermal growth factor receptors in MXT mouse mammary cancers. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 94(20), p. 10913-10918, 1997.

TRINGLER, B.; GUP, C.J.; SINGH, M., et al. Evaluation of p16INK4a and pRB expression in cervical squamous and glandular neoplasia. *Hum. Pathol.*, v. 35, p. 689-696, 2004.

VAIDYA, A.P.; PARNES, A.D. & SEIDEN, M.V. Rationale and clinical experience with epidermal growth factor receptor inhibitors in gynecological malignancies. *Curr. Treat. Options Oncol.*, v. 6(2), p. 103-114, 2005.

VARVARIGOU, A.; BOUZIOTIS, P.; ZIKOS, C., et al. Gastrin-releasing peptide (GRP) analogues for cancer imaging. *Cancer Biother. Radiopharm.*, v. 19(2), p. 219-229, 2004.

VOKES, E.E. & CHU, E. Anti-EGFR therapies: clinical experience in colorectal, lung, and head and neck cancers. *Oncology*, v. 20(5 Sup.l 2), p. 15-25, 2006.

WADA, E.; WAY, J.; SHAPIRA, H., et al. cDNA cloning, characterization, and brain region-specific expression of a neuromedin-B-preferring bombesin receptor. *Neuron.*, v. 6, p. 421-430, 1991.

WILLEY, J.C.; LECHNER, J.F. & HARRIS, C.C. Bombesin and the C-terminal tetradecapeptide of gastrin releasing peptide are growth factors for normal human bronchial epithelial cells. *Exp. Cell Res.*, v. 153, p. 245-248, 1984.

XIAO, D.; WANG, J.; HAMPTON, L.L. & WEBER, H.C. The human gastrin-releasing peptide receptor gene structure, its tissue expression and promoter. *Gene*, v. 264, p. 95-103, 2001.

ZAINO, R.J.; WARD, S.; DELGADO, G., et al.: Histopathologic predictors of the behavior of surgically treated stage IB squamous cell carcinoma of the cervix. A Gynecologic Oncology Group study. *Cancer*, v. 69 (7), p. 1750-1758, 1992.

ZHANG, Q.; BHOLA, N.E.; LUI, V.W.; et al. Antitumor mechanisms of combined gastrin-releasing peptide receptor and epidermal growth factor receptor targeting in head and neck cancer. *Mol. Cancer Ther.*, v. 6(4), p. 1414-1424, 2007.

ANEXO 1

**Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in
experimental anticancer therapy**

Annals of Oncology

v. 18 (9), p. 1457-1466, 2007

D.B. Cornelio, R. Roesler, G. Schwartzmann

Submetido em 18 de setembro de 2006.

Revisado em 18 de janeiro de 2007.

Aceito para publicação em 19 de janeiro.

Publicado online em 09 de março de 2007.

ANEXO 2

CURRICULUM VITAE

CORNELIO, D.B.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Daniela Baumann Cornelio

Local e data de nascimento: Porto Alegre, RS, Brasil, 29 de setembro de 1973.

Endereço profissional: Laboratório de Pesquisas em Câncer – Hospital de Clínicas de Porto Alegre - R. Ramiro Barcelos, 2350, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

Telefone profissional: 51 2101 7616 ; 51 9113 8123

e-mail: danicornelio@terra.com.br

2. FORMAÇÃO

Graduação em Medicina

Fundação Faculdade Federal de Ciências médicas de Porto Alegre, RS, Brasil

Período: 2001-2006.

Graduação em Odontologia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil

Período: 1992-1996.

3. ESTÁGIOS

Hospital de Pronto Socorro de Porto Alegre

Estágio de emergência em cirurgia, traumatologia, politraumatizados, clínica médica e ambulância

Período: 07/2004-12/2004

Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

Estágio extra-curricular de férias em cirurgia cardiovascular

Período: 01/2004-02/2004

Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre

Estágio extra-curricular de férias em nefrologia

Período: 01/2003-02/2003

4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

1º lugar em concurso público para cirurgião-dentista, Prefeitura Municipal de Igrejinha, 1997.

5. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

CORNELIO, D.B.; ROESLER, R. & SCHWARTSMANN, G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy. *Annals of Oncology*, doi: 10.1093/annonc/mdm058, 2007.

CORNELIO, D.B; MOREIRA, L.F.; SCHWARTSMANN, G. Neoplasias Gastrointestinais. *Âmbito Hospitalar*, v. 181, p. 13-28, 2006.

CORNELIO, D.B; LEAL, F. & SCHWARTSMANN, G. Novas Drogas em Tumores de Cabeça e Pescoço. Em: Parise Jr, O.; Kowalski, L.P. & Neupzlingen, C. **CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO: DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO**. 1ª ed., Ed. Âmbito, São Paulo, p. 44-48, 2006.

CORNELIO, D.B. & SCHWARTSMANN, G. Imunoterapia e Câncer. Em: Guimarães, J. R. Q. **MANUAL DE ONCOLOGIA**. 2ª ed., Ed. BBS, São Paulo, v.1, p. 1187-1194, 2006.